

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
und
dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs und der Status
der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase als potenzielle
prädiktive Biomarker bei gut differenzierten pankreatischen
neuroendokrinen Neoplasien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Adrian Constantin Lock

Datum der Promotion: 25.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Kurzzusammenfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
1.1 Neuroendokrine Neoplasien	5
1.2 Historische Entwicklung	5
1.3 Epidemiologie und Ätiologie	6
1.4 Symptomatik und Diagnostik	8
1.5 Therapie gut differenzierter pankreatischer neuroendokriner Neoplasien	11
1.6. Prädiktive und prognostische Marker bei pNEN	15
1.7 Everolimus und der mTOR-Signalweg	16
1.7.1 Der mTOR-Signalweg	17
1.8 Temozolomid und die O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase	21
1.8.1 Die O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)	22
1.9 Fragestellung und Zielsetzung	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1. Laborequipment	27
2.1.2 Verbrauchs- und Labormaterial	28
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.4 Puffer und Lösungen	30
2.1.5 Kits	30
2.1.6 Enzyme	31
2.1.7 Antikörper	31
2.1.8 Genexpressionsassays	31
2.1.9 Software	32
2.2 Patientenkollektiv	32
2.3 Färbeverfahren/ Immunhistochemie	33
2.3.1 Immunfärbung nach der APAAP-Methode zur Bestimmung des Ki-67-Index	33
2.3.2 Immunfärbung nach der Avidin-Biotin-Methode zur Bestimmung der MGMT-Expression	33
2.4 Methoden für die Analyse des mTOR-Signalwegs	35
2.4.1 RNA-Extraktion	35
2.4.2 Quantifizierung des gesamten RNA-Gehalts	36
2.4.3 Quantifizierung der mRNA-Expression von elf Genen des mTOR-Signalwegs durch die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	36
2.5 MGMT-Promotormethylierungsanalysen mittels Pyrosequenzierung	38
2.5.1 DNA-Extraktion	38
2.5.2 Quantifizierung des gesamten DNA-Gehalts	39

2.5.3 Bisulfitbehandlung der DNA	39
2.5.4 PCR-Amplifikation	40
2.5.5 Pyrosequenzierung	41
2.6 Statistische Auswertung und Software	42
3. Ergebnisse	44
3.1 Klinische Charakteristika der „Patientenkollektive mTOR und MGMT“	45
3.2 Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs in G1/2 pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien	51
3.2.1 mRNA-Expressionsanalysen des mTOR-Signalwegs in pankreatischem Normalgewebe	51
3.2.2 mRNA-Expressionsanalysen des mTOR-Signalwegs in G1/2 pNEN	55
3.2.3 mRNA-Expressionsanalysen des mTOR-Signalwegs: Vergleich des pankreatischen Normalgewebes mit G1/2 pNEN	58
3.2.4 Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs in G1/2 pNEN und Assoziation zu den klinischen Charakteristika	60
3.2.5 Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs als prädiktiver Biomarker	64
3.3 Der MGMT-Status in G1/2 pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien	66
3.3.1 Die Promotormethylierung des <i>MGMT</i> -Gens in G1/2 pNEN	66
3.3.2 Die <i>MGMT</i> -Promotormethylierung in G1/2 pNEN und Assoziation zu den klinischen Charakteristika	67
3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von MGMT in G1/2 pNEN	69
3.3.4 Korrelation zwischen der <i>MGMT</i> -Promotormethylierung und der MGMT-Expression in G1/2 pNEN	71
3.3.5 MGMT als prädiktiver Biomarker in G1/2 pNEN	74
4. Diskussion	77
4.1 Beurteilung der Methodik und Auswertung	77
4.2 mRNA-Expressionsanalysen des mTOR-Signalwegs in G1/2 pNEN	79
4.2.1 Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs in pankreatischem Normalgewebe und bei G1/2 pNEN	79
4.2.2 Unterschiede zwischen G1/2 pNEN und pankreatischem Normalgewebe hinsichtlich der mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs	81
4.2.3 Die mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene als prognostischer oder prädiktiver Biomarker in G1/2 pNEN	84
4.3 Der MGMT-Status in G1/2 pNEN	85
4.3.1 Analyse der <i>MGMT</i> -Promotormethylierung und der MGMT-Expression in G1/2 pNEN	85
4.3.2 MGMT als prognostischer und prädiktiver Marker	88
4.4 Mögliche Therapiestratifizierung anhand der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene und der <i>MGMT</i>-Promotormethylierung	93
4.5. Zusammenfassende Schlussfolgerungen und Ausblick	96
5. Literaturverzeichnis	98
Eidesstattliche Versicherung	110
Lebenslauf	111
Publikationsliste	112
Danksagung	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Therapie bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien ohne Hinweis auf eine multiple endokrine Neoplasie Typ 1.	12
Abbildung 2. Vorgehen bei metastasierten oder lokal fortgeschrittenen und nicht resektablen pNEN G1/G2.	13
Abbildung 3. Der PI3K/mTOR-Signalweg.	17
Abbildung 4. Wirkmechanismus von Temozolomid und MGMT.	23
Abbildung 5. Vorbereitung der Proben zur Quantifizierung des DNA und RNA-Gehaltes mittels Qubit®-Fluorometer.	36
Abbildung 6. Schematische Darstellung der chemischen Prozesse zur Analyse der DNA-Methylierung.	40
Abbildung 7. Patientenkollektiv zur Evaluation des mTOR-Signalwegs.	44
Abbildung 8. Patientenkollektiv zur Evaluation des MGMT-Status.	44
Abbildung 9. Tumorstadien nach UICC bei Erstdiagnose des „Patientenkollektivs mTOR“ (A) und des „Patientenkollektivs MGMT“ (B).	46
Abbildung 10. Verschiedene Syndrome der funktionell aktiven G1/2 pNEN des „Patientenkollektivs mTOR“ (A) und des „Patientenkollektivs MGMT“ (B).	47
Abbildung 11. Korrelation zwischen dem UICC-Stadium und dem Ki-67-Index in dem „Patientenkollektiv mTOR“ (A) und dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B).	49
Abbildung 12. Gesamtüberleben in Abhängigkeit des UICC-Stadiums in dem „Patientenkollektiv mTOR“ (A) und dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B).	50
Abbildung 13. Gesamtüberleben in Abhängigkeit des UICC-Stadiums in dem „Patientenkollektiv mTOR“ (A) und dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B): Vergleich Stadium I und II gegen III und IV. 50	
Abbildung 14. Gesamtüberleben nach histopathologischem Grading in dem „Patientenkollektiv mTOR“ (A) und dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B).	51
Abbildung 15. Beispielhafte lineare Regressionsanalysen der mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene in pankreatischem Normalgewebe.	54
Abbildung 16. Die mRNA-Expression elf verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene bei G1/2 pNEN.	56
Abbildung 17. Streudiagramme der mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene mit linearer Regressionsanalyse bei G1/2 pNEN.	57
Abbildung 18. Die mRNA-Expression elf verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene: Vergleich zwischen G1/2 pNEN und pankreatischem Normalgewebe.	59
Abbildung 19. Die mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene in Abhängigkeit von den klinischen Charakteristika bei G1/2 pNEN.	61
Abbildung 20. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der mRNA-Expression von RAPTOR in G1/2 pNEN.	62
Abbildung 21. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der mRNA-Expression von IGF-1 in G1/2 pNEN.	63
Abbildung 22. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der mRNA-Expression von IGFBP-3 in G1/2 pNEN.	63
Abbildung 23. Therapieansprechen auf Everolimus innerhalb eines Jahres.	64
Abbildung 24. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von dem Therapieansprechen auf Everolimus. 65	
Abbildung 25. Verhältnis von methylierten und unmethylierten Allelen der MGMT-Promotorregion bei unterschiedlichen Grenzwerten bei G1/2 pNEN.	67
Abbildung 26. Anzahl methylierter Allele in Abhängigkeit vom UICC-Stadium und Grading bei G1/2 pNEN.	68
Abbildung 27. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Anzahl methylierter Allele der MGMT-Promotorregion nach Dichotomisierung anhand verschiedener Trennwerte bei G1/2 pNEN.	69
Abbildung 28. Immunhistochemischer Nachweis von MGMT bei G1/2 pNEN.	70
Abbildung 29. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Expression von MGMT in G1/2 pNEN. .	71

Abbildung 30. Proteinexpression von MGMT mit zugehöriger Pyrosequenzierung der MGMT-Promotorregion bei G1/2 pNEN.	72
Abbildung 31. Anzahl methylierter Allele im Bereich der MGMT-Promotorregion in Abhängigkeit von der MGMT-Expression bei G1/2 pNEN.	73
Abbildung 32. Wechselbeziehung der immunhistochemischen Expression von MGMT mit der MGMT-Promotormethylierung bei unterschiedlichen Dichotomisierungswerten bei G1/2 pNEN. ...	74
Abbildung 33. Therapieansprechen auf Temozolomid.	75
Abbildung 34. Therapieansprechen auf Temozolomid in Abhängigkeit von dem Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion bei unterschiedlichen Dichotomisierungswerten.	76
Abbildung 35. Die mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene bei einem Vergleich zwischen G1/2 pNEN und pankreatischem Normalgewebe mit Einordnung in den PI3K/mTOR-Signalweg.	83
Abbildung 36. Geeignete Patienten für die Therapieoptionen EVE oder TEM bei einer unterschiedlichen Anzahl methylierter Allele der MGMT-Promotorregion bei einer mRNA-Expression von MTOR und AKT-1 oberhalb der 75. Perzentile bei G1/2 pNEN.	94
Abbildung 37. Geeignete Patienten für die Therapieoptionen EVE oder TEM bei einer unterschiedlichen Anzahl methylierter Allele der MGMT-Promotorregion bei einer mRNA-Expression von MTOR und AKT-1 oberhalb des Medians bei G1/2 pNEN.	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hypersekretionssyndrome bei pNEN.	9
Tabelle 2. TNM-Stadien neuroendokriner gut differenzierter Neoplasien des Pankreas nach UICC/ENETS.	10
Tabelle 3. Grading pankreatischer neuroendokriner Neoplasien gemäß Klassifikation der WHO von 2010 und 2017.	11
Tabelle 4. Bestandteile des mTOR-Komplex 1 und 2.	20
Tabelle 5. Laborequipment.	27
Tabelle 6. Labormaterial.	28
Tabelle 7. Chemikalien und Reagenzien.	29
Tabelle 8. Puffer und Lösungen.	30
Tabelle 9. Kits.	30
Tabelle 10. Enzyme.	31
Tabelle 11. Antikörper.	31
Tabelle 12. TaqMan Genexpressionsassays der Firma STRATIFYER Molecular Pathology GmbH.	31
Tabelle 13. Software.	32
Tabelle 14. Kategoriale Einteilung der Tumorproben in Abhängigkeit von der prozentualen Expression von MGMT.	34
Tabelle 15. Zusammensetzung der verschiedenen Reagenzien zur PCR-Amplifikation.	41
Tabelle 16. Protokoll der PCR-Amplifikation.	41
Tabelle 17. Verwendete Reagenzien für die Pyrosequenzierung.	42
Tabelle 18. Klinische Daten der „Patientenkollektive mTOR und MGMT“.	46
Tabelle 19. Verschiedene medikamentöse und interventionelle Therapien der „Patientenkollektive mTOR und MGMT“.	48
Tabelle 20. Intergenetische Korrelationen der mRNA-Genexpression von elf Mitgliedern des mTOR-Signalwegs in pankreatischem Normalgewebe.	52
Tabelle 21. Intergenetische Korrelationen der mRNA-Genexpression von elf Mitgliedern des mTOR-Signalwegs bei G1/2 pNEN.	57
Tabelle 22. Klinische Daten der mit Everolimus behandelten Patienten.	65
Tabelle 23. Klinische Daten der mit Temozolomid behandelten Patienten.	75

Abkürzungsverzeichnis

4EBP1	„Eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1“
5-FU	5-Fluoruracil
Akt-1	AKT Serin/Threonin Kinase 1 oder Proteinkinase B Alpha
AP-1	Aktivator-Protein-1
APUD	„Amine precursor uptake and decarboxylation“
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	„ATP-Dependent Helicase ATRX“
CALM2	Calmodulin 2
CAP	Capecitabin
CEBP	„CCAAT-Enhancer-Binding-Proteine“
Ct	Zyklusschwelle (englisch: „Cycle threshold“)
DAXX	„Death Domain Associated Protein“
Deptor	„DEP Domain Containing mTOR Interacting Protein“
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: Deoxyribonucleic acid)
ENETS	„European Neuroendocrine Tumor Society“
eIF-4E	„Eukaryotic initiation factor 4E“
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
G	Grading
GEP-NEN	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 (englisch: „Insulin-like growth factor 1“)
IGF-1R	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (englisch: „Insulin-like growth factor 1 receptor“)
IGFBP-3	Insulinähnliches Wachstumsfaktor-Bindungsprotein-3 (englisch: „Insulin-like growth factor-binding protein 3“)
IRS-1	Insulin-Rezeptor Substrat 1
Kat. Nr.	Katalognummer
Ki-67	Antikörper gegen das Antigen Ki-67
MEN-1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mLST8	„Mammalian Lethal with SEC13 protein 8“
mM	Millimol
mRNA	„Messenger ribonucleic acid“
mSin1	„Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein“

MTIC	5-(3-Methyltriazin-1-yl) Imidazole-4-Carboxamid
mTOR	„Mammalian target of rapamycin“
mTORC1	mTOR Komplex 1 (englisch: „mTOR complex 1“)
mTORC2	mTOR Komplex 2 (englisch: „mTOR complex 2“)
NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NF-KappaB	„Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung (englisch: „Phosphate buffered saline“)
PKD-1	„3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1“
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase katalytische Untereinheit alpha
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
pNEN	Pankreatische neuroendokrine Neoplasie
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
PRAS40	„Proline rich Akt substrate 40 kDa“
PTEN	„Phosphatase and tensin homolog“
PROTOR-1	„Protein observed with Rictor-1“
PRR5	„Proline-rich protein 5“
PRRT	Peptid-Radio-Rezeptor-Therapie
Raptor	„Regulatory associated protein of mTOR“
Rictor	„Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin“
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: „Ribonucleic acid“)
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (englisch: „Real-time polymerase chain reaction“)
Sp1	Spezifitätsprotein 1
SSA	Somatostatinanaloga
STZ	Streptozotocin
TEM	Temozolomid
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TSC 1	„Tuberous sclerosis 1“
TSC 2	„Tuberous sclerosis 2“
UICC	„Union internationale contre le cancer“ (französisch)

VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>englisch: „Vascular endothelial growth factor“</i>)
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>englisch: „World Health Organisation“</i>)

Kurzzusammenfassung

Einleitung:

Pankreatische neuroendokrine Neoplasien (pNEN) sind eine seltene heterogene Tumorentität mit steigender Inzidenz. Bei gut differenzierten pNEN werden verschiedene medikamentöse Therapieoptionen wie der mTOR-Inhibitor Everolimus oder das alkylierende Zytostatikum Temozolomid eingesetzt. Zum aktuellen Zeitpunkt existieren wenige prognostische Biomarker und eine Möglichkeit, das Therapieansprechen bei pNEN vorherzusagen, fehlt. Bei Glioblastomen korreliert das Therapieansprechen auf Temozolomid mit der Promotormethylierung des Gens der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Bei pNEN zeigten sich Hinweise auf eine Dysregulation des mTOR-Signalwegs. Ziel der Arbeit war eine Analyse der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene und des MGMT-Status bei Patienten mit gut differenzierten pNEN zur Identifizierung potenzieller Biomarker.

Materialien und Methoden:

Im Rahmen dieser retrospektiven multizentrischen Untersuchung wurde bei 75 Patienten mit gut differenzierten pNEN die mRNA-Expression elf verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene (*IGF-1*, *IGFBP-3*, *PIK3CA*, *AKT-1*, *MTOR*, *MLST8*, *DEPTOR*, *RAPTOR*, *RICTOR*, *4EBP1* und *VEGF-A*) via quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion analysiert. Als Kontrollgruppe wurde die mRNA-Expression in pankreatischem Normalgewebe gegenübergestellt. Außerdem wurde bei 76 größtenteils identischen Patienten die Promotormethylierung des *MGMT*-Gens mittels Pyrosequenzierung evaluiert. Abhängig von der Anzahl der methylierten Allele erfolgte eine Dichotomisierung bei unterschiedlichen Trennwerten. Bei 57 Patienten wurde ergänzend die immunhistochemische Expression von MGMT betrachtet.

Ergebnisse:

Die mRNA-Expression von Genen, die für den mTOR-Signalweg kodieren, deutete auf eine vermehrte Aktivität dieses Signalwegs in pNEN hin. Die mRNA-Expression dieser Gene zeigte in pNEN oftmals intergenetische Korrelationen. Eine ausgeprägte lineare Korrelation stellte sich jedoch ausschließlich für *MTOR* und *AKT-1* dar. Eine Assoziation zwischen der mRNA-Expression und den klinischen Charakteristika oder dem Gesamtüberleben präsentierte sich nur in Ausnahmefällen. In einer Subgruppe ließ sich das Therapieansprechen auf Everolimus anhand der mRNA-Expression nicht vorhersagen.

In 18,4 - 63,2 % der pNEN zeigte sich eine Hypermethylierung der *MGMT*-Promotorregion. Die *MGMT*-Expression korrelierte nicht mit der Promotormethylierung. Weder die Proteinexpression noch die Promotormethylierung von *MGMT* zeigte eine signifikante Assoziation zu den klinischen Charakteristika oder dem Gesamtüberleben. In einer sehr kleinen Subgruppe korrelierte das Therapieansprechen auf Temozolomid nicht mit dem *MGMT*-Status.

Diskussion:

In pNEN zeigten sich Hinweise auf eine vermehrte Aktivität des mTOR-Signalwegs, jedoch eignete sich die mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene nicht für eine Prognoseabschätzung. Bezüglich der prognostischen oder prädiktiven Relevanz des *MGMT*-Status in pNEN lieferten verschiedene vorherige Studien kontroverse Ergebnisse. Hier konnte keine Assoziation zu den klinischen Charakteristika identifiziert werden.

Hinsichtlich der prädiktiven Wertigkeit ist die Aussagekraft der Arbeit auf Grund der geringen Patientenzahl, welche eine Therapie mit Everolimus oder Temozolomid erhielten, begrenzt. Weitergehende prospektive Studien, welche anhand des *MGMT*-Status oder der mRNA-Expression von *MTOR* und *AKT-1* das Therapieansprechen analysieren, wären wünschenswert.

Abstract

Introduction:

Pancreatic neuroendocrine neoplasias (pNEN) are rare and heterogeneous tumours with rising incidence. For well-differentiated pNEN different therapeutic options as the mTOR-inhibitor everolimus or the alkylating cytostatic drug temozolomide exist. Yet, only limited options to assess prognosis are available, while biomarkers to predict the response in pNEN are absent. In glioblastomas the response to temozolomide correlates with the methylation-status of the promoter region of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). Moreover, in several studies a dysregulation of the mTOR pathway in pNEN was shown. The aim of this study was to analyse the mRNA expression of genes encoding for the mTOR pathway and the MGMT-status in patients with well differentiated pNEN to identify potential biomarkers.

Materials and methods:

In this retrospective multicentric study the mRNA expression of eleven genes, encoding for different members of the mTOR-pathway (*IGF-1*, *IGFBP-3*, *PIK3CA*, *AKT-1*, *MTOR*, *MLST8*, *DEPTOR*, *RAPTOR*, *RICTOR*, *4EBP1* und *VEGF-A*), was analysed via quantitative real-time polymerase chain reaction in 75 patients with well-differentiated pNEN. Normal pancreatic tissue served as the reference group. Furthermore, in 76 mostly identical patients the methylation of the promoter region of *MGMT* was evaluated by pyrosequencing. Depending on the number of methylated alleles, dichotomization took place with different cut-off values. Additionally, in 57 cases the expression of MGMT was analysed by immunohistochemistry.

Results:

The mRNA expression of genes encoding for the mTOR pathway indicated an increased activity of this pathway in pNEN. mRNA expression of these genes frequently showed intergenetic correlation in pNEN, but a distinct linear correlation only occurred between *MTOR* und *AKT-1*. An association between mRNA expression and clinical data or overall survival was exceptional. In a subgroup, response to everolimus based on mRNA expression of the mTOR-pathway was not predictable.

In 18,4 - 63,2 % of pNEN a hypermethylation of the *MGMT*-promoter region occurred. The expression of MGMT did not correlate with the methylation-status. Neither MGMT-expression nor *MGMT*-promoter methylation was related to the clinical data or overall survival. In a very small subgroup, the response to temozolomide did not correlate with the MGMT-status.

Discussion:

Although mRNA expression indicated a higher activity of the mTOR-pathway in pNEN, it is not useful to determine prognosis. While heterogeneous studies provided controversial results concerning the prognostic and predictive value of MGMT in pNEN, in this study no association was identified. Due to a limited number of cases, the predictive validity of this study is limited. Further prospective studies analysing the predictive value of the MGMT-status or the mRNA expression are desirable.

1. Einleitung

1.1 Neuroendokrine Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) sind eine seltene und heterogene Tumorentität. Sie gehen von den Zellen des diffusen endokrinen Systems aus und entwickeln sich aus dem Endoderm (Schmitt-Gräff et al., 2001, Sigal et al., 2012). Typisch ist die Expression von Chromogranin A und Synaptophysin. In immunhistochemischen Färbungen ähneln diese Neoplasien morphologisch den endokrinen Drüsenzellen, da sich neurosekretorische Vesikelproteine nachweisen lassen (Sigal et al., 2012). Innerhalb der Vesikel befinden sich häufig Peptidhormone oder biogene Amine. Die Freisetzung dieser Hormone kann zu einem sogenannten Hypersekretionssyndrom führen (Sigal et al., 2012). Sofern sich Symptome nachweisen lassen, bezeichnet man die neuroendokrine Neoplasie als funktionell aktiv. Bei NEN im Bereich des Pankreas kann es auf Grund des natürlichen Vorhandenseins endokriner Drüsenzellen zur Produktion einer Vielzahl von unterschiedlichen Hormonen kommen (Sigal et al., 2012). Hierdurch präsentieren sich klinisch sehr unterschiedliche Krankheitsausprägungen und -verläufe.

Bei nicht vorhandener Funktionalität gestaltet sich die Diagnostik schwierig (Kanakis und Kaltsas, 2012). Hierdurch werden die NEN oft erst spät und zufällig erkannt (Modlin et al., 2008, Kanakis und Kaltsas, 2012). Über die Hälfte der Patienten mit nicht-funktionellen Tumoren weisen daher zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine Metastasierung auf (Modlin et al., 2008). Diagnostisch kommen verschiedene bildgebende Verfahren zum Einsatz. Die histologische Sicherung bleibt zur Diagnosestellung unverzichtbar. Je nach Tumorausbreitung stehen verschiedene therapeutische Verfahren zur Verfügung, wobei die chirurgische Resektion der einzige kurative Ansatz ist. Für die verschiedenen medikamentösen Therapieoptionen bei fortgeschrittenen Tumorstadien fehlen prädiktive und prognostische Marker, um den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen besser abschätzen zu können.

1.2 Historische Entwicklung

Neuroendokrine Neoplasien wurden erstmals im Jahr 1867 von Langhans beschrieben (Langhans, 1867). Im Verlauf des 19. Jahrhunderts wurden weitere Beschreibungen von Lubarsch, Ransom und von Notthafft hinzugefügt (Lubarsch, 1888, Ransom, 1890, von Notthafft, 1895). Im Rahmen von Untersuchungen von Heidenhain und Kultschitzky konnten Zellen identifiziert werden, die eine vermehrte Affinität zu Chromaten aufwiesen (Heidenhain, 1870, Kultschitzky, 1897). Diese Zellen wurden nachfolgend als enterochromaffine Zellen bezeichnet (Ciaccio, 1907).

Im Jahr 1907 implementierte Oberndorfer den Begriff „Karzinoid“ auf Grund des karzinom-ähnlichen, insgesamt aber weniger aggressiven Tumorwachstums (Oberndorfer, 1907). Zuvor wurde diese Tumorentität zumeist als „benignes Karzinom“ beschrieben. Der Begriff des „Karzinoids“ wurde initial nur für Tumorentitäten des Intestinaltrakts verwendet.

Im Verlauf konnten weitere Studien diese initialen Beschreibungen ergänzen. Es zeigte sich, dass Karzinoide von den enterochromaffinen Zellen mit einer nachweisbar vermehrten Produktion von Serotonin ausgehen (Gosset und Masson, 1914, Feyrter, 1938, Modlin et al., 2004). Später wurden die Peptid-produzierenden Zellen des Darmes als APUD-Zellen (englisch: *amine precursor uptake and decarboxylation*) tituiert (Pearse, 1979). Heutzutage wird dies als diffuses neuroendokrines System bezeichnet (Modlin et al., 2004).

1963 empfahlen Williams und Sandler eine Unterteilung der Karzinoide nach ihrem embryonalen Ursprung in Vorderdarm (Lunge, Pankreas, Magen und oberes Duodenum), Mitteldarm (ab unterem Duodenum bis mittleres Colon transversum) und Hinterdarm (letztes Drittel des Colon transversum bis Rektum) (Williams und Sandler, 1963). Soga und Yakuwa (1997) führten im Verlauf eine Klassifikation basierend auf histologischen Kriterien der Karzinoide ein. Im Laufe des 20. Jahrhunderts kamen diverse Fallbeschreibungen der klinischen Ausprägungen der Karzinoide hinzu (Modlin et al., 2004). Diese Beschreibungen, gemeinsam mit dem zunehmenden histomorphologischen Verständnis dieser Tumorentität, mündete in einer Vereinheitlichung der Klassifikation im Jahr 2000 durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Solcia et al., 2000, Klöppel et al., 2004). Hierbei wurde die Malignität der Tumoren anhand von Lokalisation, Tumorgröße, histologischer Differenzierung mit Ki-67-Proliferationsindex, lokaler Invasion, Angioinvasion und möglicher hormoneller Aktivität eingegrenzt. Die WHO-Klassifikation wurde später mehrmals gemäß der aktuellen Studienlage optimiert (Bosman et al., 2010, Lloyd et al., 2017). In diesem Rahmen wurde eine Klassifikation beschlossen, welche insbesondere die Begriffe „gut differenzierter neuroendokriner Tumor“, „gut differenziertes neuroendokrines Karzinom“ und „geringdifferenziertes neuroendokrines Karzinom“ einführte. Im Laufe der Jahre wurden eine TNM-Klassifikation und ein Gradingssystem implementiert. Im Jahr 2018 wurde in Deutschland die erste S2k-Leitlinie für neuroendokrine Tumore erstellt (Rinke et al., 2018).

1.3 Epidemiologie und Ätiologie

Grundsätzlich können neuroendokrine Neoplasien überall dort entstehen, wo neuroendokrine Zellen existieren, weshalb sie gehäuft im gastroenteropankreatischen System vorkommen (Rinke und Arnold, 2014).

NEN machen insgesamt 0,49 % aller Malignome aus (Modlin et al., 2003). In den letzten Jahren zeigte sich eine zunehmende Inzidenz neuroendokriner Neoplasien. Laut Dasari et al. (2017)

stieg die Inzidenz bis in das Jahr 2012 auf 6,98 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Rund 40 Jahre zuvor wurde in den USA noch eine Inzidenz von 1,09/100.000 Einwohnern angenommen (Yao et al., 2008). Auch im europäischen Raum ließ sich dieser Inzidenzanstieg in verschiedenen Studien belegen (Quaedvlieg et al., 2001, Begum et al., 2017, Darba und Marsa, 2019). Die zunehmende Inzidenz ist vermutlich auf den Fortschritt der endoskopischen und radiologischen Diagnostik, aber auch auf das zunehmende Verständnis der Tumorbilogie zurückzuführen (Modlin et al., 2008).

Bei einer angenommenen Inzidenz von 2-4/100.000 für NEN werden in Deutschland jährlich schätzungsweise rund 1.600-3.200 Neuerkrankungen diagnostiziert (Begum et al., 2017). Die größte Subgruppe stellen die gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN) mit ca. 75 % aller neuroendokrinen Tumoren dar (Lepage et al., 2004, Begum et al., 2017, Dasari et al., 2017). Scherübl et al. (2013) dokumentierten in Deutschland eine Verhundertfachung der Inzidenz von GEP-NEN von 0,45/1000.000 auf 2,53/100.000 zwischen 1976 und 2006. Im Rahmen einer Studie des deutschen NET-Registers zeigten zuletzt rund 23,4 % aller NEN einen pankreatischen Primarius (Maasberg et al., 2018). 2014 wurde ein prozentualer Anteil von pNEN von 34,2 % im Verhältnis zu allen neuroendokrinen Neoplasien berichtet (Begum et al., 2014).

Bezüglich der Inzidenz von pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (pNEN) sind nur limitierte Daten, nicht zuletzt auf Grund wechselnder Klassifikationssysteme, verfügbar (Williams und Sandler, 1963, Halfdanarson et al., 2008, Bosman et al., 2010, Maasberg et al., 2018). Insgesamt zeigt sich gemäß verschiedener Studienergebnisse eine Inzidenz von < 1/100.000 Einwohnern für pNEN (Halfdanarson et al., 2008, Lepage et al., 2010, Fraenkel et al., 2015). In Deutschland wurde ein Inzidenzanstieg von 0,03 für Männer bzw. 0,08 für Frauen im Jahr 1976 auf jeweils 0,25/100.000 bis in das Jahr 2006 nachgewiesen (Scherübl et al., 2013). Dies entspricht einer Veracht- beziehungsweise Verdreifachung der Inzidenz. In anderen Ländern variiert die Inzidenzrate für pNEN zwischen 0,13/100.000 und 1,27/100.000 (Fraenkel et al., 2015).

Heutzutage ist eine pNEN nicht selten ein Zufallsbefund (Zarate et al., 2012). Im Rahmen von Autopsien ließen sich bei 0,8-10 % der Untersuchten eine pNEN nachweisen (Halfdanarson et al., 2008, Fraenkel et al., 2015).

NEN treten bei beiden Geschlechtern gleichermaßen auf, wobei in den USA etwas häufiger Männer erkranken (Quaedvlieg et al., 2001, Lepage et al., 2004, Yao et al., 2008, Halfdanarson et al., 2008, Maasberg et al., 2018, Darba und Marsa, 2019). Als mittleres Erkrankungsalter wird 50-70 Jahre angegeben, wobei der Median bei rund 60 Jahren anzusiedeln ist (Quaedvlieg et al., 2001, Yao et al., 2008, Ploekinger et al., 2009, Fraenkel et al., 2015, Halfdanarson et al., 2008).

Die ätiologischen Faktoren sind weitestgehend unbekannt. Die Tumorentstehung der NEN wird als größtenteils sporadisch aufgefasst. Es konnte jedoch eine Häufung von NEN bei hereditären Syndromen festgestellt werden. Insbesondere bei der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN-1), aber auch dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom, der tuberösen Sklerose oder der Neurofibromatose kommt es zu einem vermehrten Auftreten von NEN (Öberg, 2013).

1.4 Symptomatik und Diagnostik

Bei NEN unterscheidet man zwischen funktionell aktiven und inaktiven Tumoren. Als funktionell aktiv bezeichnet man eine neuroendokrine Neoplasie dann, wenn es auf Grund der sezernierten Peptidhormone oder biogenen Amine zu einer Ausprägung von Symptomen kommt. Bei pNEN kommt es in rund 10 – 40 % der Fälle zu einer funktionellen Aktivität (Halfdanarson et al., 2008, Öberg, 2018). Die verschiedenen Symptomkomplexe mit den korrespondierenden Hormonen sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Auf Grund der in der Mehrzahl der Fälle fehlenden Funktionalität sind pNEN schwer zu diagnostizieren. Daher gelingt die Diagnosestellung häufig erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium nach bereits erfolgter Metastasierung. Der Zeitraum der verspäteten Diagnose wird auf fünf bis sieben Jahre geschätzt (Modlin et al., 2008, Kanakis und Kaltsas, 2012).

Für die in **Tabelle 1** aufgeführten funktionellen pNEN existieren verschiedene Tests, wie laborchemische Bestimmungen der entsprechenden Hormone, eine Bestimmung des pH-Wertes des Magensaftes beim Gastrinom oder ein Fastentest für das Insulinom (Sigal et al., 2012, Rinke et al., 2018). Als weitere Biomarker können Chromogranin A und die neuronenspezifische Enolase als serologische und von der Funktionalität unabhängige Biomarker bestimmt werden. Gemäß aktueller Leitlinie soll bei jeder NEN mindestens einmalig Chromogranin A bestimmt werden, da die Höhe des Serumspiegels mit dem Tumolvolumen korreliert (Rinke et al., 2018). Es liegt jedoch abhängig von Tumorgröße und Metastasierung lediglich eine Sensitivität und Spezifität zwischen 60 – 100 % vor. Weiterhin beeinflussen Faktoren wie die Tumorentität, Nieren- und Herzinsuffizienz, eine Therapie mit Somatostatinanaloga oder Protonenpumpeninhibitoren das Testresultat (Rinke et al., 2018). Chromogranin A kann, wenn identische Assays zur Bestimmung verwendet werden, auch Hinweise auf ein Rezidiv oder einen Tumorprogress liefern (Rinke et al., 2018). Als Screeningmarker oder prädiktiven Marker für das Therapieansprechen ist Chromogranin A nicht geeignet (Rinke et al., 2018). Die Bestimmung der neuronenspezifischen Enolase wird nur bei G2/G3 NEN und neuroendokrinen Karzinomen, jedoch nicht bei gut differenzierten neuroendokrinen Neoplasien empfohlen (Dilz et al., 2015, Rinke et al., 2018).

Tabelle 1: Hypersekretionssyndrome bei pNEN. Nach: Pape et al., 2000, Bosman et al., 2010, Turaga und Kvols, 2011, Sigal et al., 2012, Kanakis und Kaltsas, 2012.

Syndrom/ Tumor	Sezernierte Hormone	Klinik/ Symptome
Karzinoid-Syndrom	Serotonin Tachykinin Kallikrein Prostaglandine	<ul style="list-style-type: none"> - Flush - Sekretorische Diarrhöen - Bronchospasmus - Rezidivierende, krampfartige Bauchschmerzen - Endokardfibrose des rechten Herzens - Teleangiektasien
Zollinger-Ellison-Syndrom/ Gastrinom	Gastrin	<ul style="list-style-type: none"> - Rezidivierende Magen-Darm-Ulzerationen, häufig in atypischer Lokalisation - Epigastrischen Schmerzen - Sekretorische Diarrhöen - Steatorrhöen - Maldigestion
Insulinom	Insulin	<ul style="list-style-type: none"> - Neurohypoglykämische Symptome <p>Whipple-Trias:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hypoglykämische Symptome insbesondere nach Anstrengung oder Fasten - Hypoglykämien (< 45mg/dl) - Besserung der Beschwerden nach Glucoseaufnahme
Glukagonom	Glukagon	<ul style="list-style-type: none"> - Diabetes mellitus/ Hyperglykämie - Erythema negroticans migrans - Anämie - Mangelernährung
Verner- Morrison-Syndrom (VIPom); WDHA-Syndrom (Water-Diarrhea-Hypokalemia-Achlorhydria)	Vasoaktives intestinales Peptid	<ul style="list-style-type: none"> - Wässrige Diarrhöen mit resultierender Exsikkose - Hypokaliämie - Achlorhydrie - Metabolische Azidose - Gelegentlich Flush
Somatostatinom	Somatostatin	<ul style="list-style-type: none"> - Steatorrhöen - Diarrhöen - Cholelithiasis - Diabetes mellitus
GHRHom	„Growth hormone releasing hormone“	<ul style="list-style-type: none"> - Akromegalie - gestörte Glucosetoleranz
ACTHom	Adrenocorticotropes Hormon	<ul style="list-style-type: none"> - Cushing-Syndrom

Grundsätzlich kommen zur primären Diagnostik vorrangig bildgebende Verfahren zum Einsatz. Hierfür stehen laut AWMF-Leitlinie insbesondere die hochauflösende Multidetektor-Computertomographie mit Kontrastmittel in 3 Phasen oder eine kontrastmittelgestützte Magnetresonanztomographie im Vordergrund (Rinke et al., 2018). Zum pulmonalen Metastasennachweis sollte ebenfalls eine Computertomographie erfolgen (Rinke et al., 2018).

Ergänzend können abdomensonographische Untersuchungen mit und ohne Kontrastmittel durchgeführt werden. Ebenso unterstützen endosonographische und bei Funktionalität auch echokardiographische Untersuchungen die Diagnostik (Rinke et al., 2018). Nuklearmedizinische Verfahren kommen insbesondere bei einer vermehrten Somatostatinrezeptorexpression zum Einsatz. Hierfür stehen bei pankreatischen NEN vorrangig das PET/CT (Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie) unter Zuhilfenahme von DOTATATE, DOTATOC und DOTANOC als entsprechende Somatostatinanaloga zur Verfügung (Rinke et al., 2018). Durch diese Untersuchungen wird das TNM-Stadium ermittelt (für pNEN in **Tabelle 2**).

Tabelle 2. TNM-Stadien neuroendokriner gut differenzierter Neoplasien des Pankreas nach UICC/ENETS. UICC = Union internationale contre le cancer. ENETS = European Neuroendocrine Tumor Society. Quelle: Perren et al., 2010, Wittekind, 2017.

T--- Primärtumor			
TX	Primärtumor kann nicht bestimmt werden		
T1	Tumor auf das Pankreas begrenzt und < 2cm		
T2	Tumor auf das Pankreas begrenzt und 2 - 4cm		
T3	Tumor auf das Pankreas begrenzt und > 4cm oder Infiltration von Duodenum oder Gallengang		
T4	Tumor infiltriert Nachbarorgane (Magen, Milz, Kolon, Nebenniere) oder die Wand großer Gefäße		
N--- Lymphknoten			
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht bestimmt werden		
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen		
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen		
M--- Fernmetastasen			
MX	Fernmetastasen können nicht bestimmt werden		
M0	Keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen		
UICC-Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T2	N0	M0
Stadium IIB	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T4	N0	M0
Stadium IIIB	Jedes T	N1	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Zur Diagnosesicherung und weitergehenden Differenzierung ist eine histopathologische Beurteilung unumgänglich. Hierbei sollte mindestens eine histologische Klassifikation, eine Beurteilung des Differenzierungsgrades, sowie eine Quantifizierung der Ki-67-positiven Tumorzellen, bezogen auf die Gesamtheit der Tumorzellkerne in einem bestimmten Gebiet erfolgen (Rinke et al., 2018). Hierdurch lässt sich eine Einteilung des Gratings (G) gemäß WHO-Leitlinie vornehmen. Die aktuelle Einteilung gemäß Histopathologie ist in **Tabelle 3** aufgeführt. Diese Klassifizierung wurde im Jahr 2017 erneuert (Bosman et al., 2010, Choe et al., 2019).

Diese Arbeit wurde bereits vor Veröffentlichung der WHO-Klassifikation von 2017 begonnen. Da gemäß der Einschlusskriterien nur G1- oder G2-pNEN inkludiert werden sollten, hatte die Änderung der Klassifikation nur geringgradige Auswirkungen auf die Anfertigung (siehe **Kapitel 2**). Lediglich der Trennwert für die Unterscheidung zwischen gut differenzierten NEN Grad 1 und Grad 2 veränderte sich. Die Einteilung des Gradings dieser Arbeit wurde an die WHO-Klassifikation von 2017 adaptiert. Eine Inklusion von neuroendokrinen Neoplasien mit einem Ki-67-Index größer als 20 % (NEN-Grad 3) erfolgte nicht, da diese Subgruppe erst im Jahr 2017 von der WHO als gut differenzierte neuroendokrine Tumore mit hoher Mitosenanzahl und hohem Ki-67-Index ergänzt wurde.

Anhand der histopathologischen Graduierungseinteilung und mit Hilfe der auf den bildgebenden Verfahren fußenden TNM-Klassifikation erfolgt die Evaluation des weitergehenden Therapiekonzeptes.

Tabelle 3. Grading pankreatischer neuroendokriner Neoplasien gemäß Klassifikation der WHO von 2010 und 2017. HGF = Hauptgesichtsfeld; Ki-67-Index in %. Modifiziert nach Bosman et al., 2010, Rindi et al., 2018, Choe et al., 2019.

WHO 2010	Mitosen/ 10 HGF	Ki-67- Index (%)	WHO 2017	Mitosen/ 10 HGF	Ki-67- Index (%)
<i>Gut differenzierte NEN</i>			<i>Gut differenzierte NEN</i>		
NEN Grad 1	< 2	≤ 2	NEN Grad 1	< 2	< 3
NEN Grad 2	2 - 20	3 - 20	NEN Grad 2	2 - 20	3 - 20
			NEN Grad 3	> 20	> 20
<i>Schlecht differenzierte NEN</i>			<i>Schlecht differenzierte NEN</i>		
Neuroendokrine Karzinome Grad 3	> 20	> 20	Neuroendokrine Karzinome Grad 3 - Kleinzelliger Typ - Großzelliger Typ	> 20	> 20
Gemischtes Adenoneuroendokrines Karzinom			Gemischte neuroendokrine/ nicht-neuroendokrine Neoplasie		

1.5 Therapie gut differenzierter pankreatischer neuroendokriner Neoplasien

Da sich diese Arbeit ausschließlich mit gut differenzierten (G1 oder G2) pNEN auseinandersetzt, erfolgt eine Darstellung der Therapieempfehlungen nur für diese Subgruppe.

Im Vordergrund steht die kurativ intendierte chirurgische Resektion, falls möglich mit ein- oder zweizeitiger Lebermetastasenresektion, sofern alle Metastasen kurativ resezierbar sind (**Abbildung 1**) (Rinke et al., 2018). Bei sehr kleinen nicht funktionellen pNEN ≤ 2 cm kann auch

abgewartet werden. Extrahepatische, nicht ossäre Metastasen sollten bei resultierender Tumorfreiheit oder bei drohenden Komplikationen reseziert werden (Rinke et al., 2018). Auch bei nicht resektablen Metastasen kann bei Symptomen durch den Primarius oder drohenden Komplikationen eine Resektion des Primärtumors indiziert sein (Rinke et al., 2018). Debulking-Operationen können zur Beschwerdebesserung oder Verbesserung der Tumorsymptomatik bei hormonellem, nicht ausreichend medikamentös therapierbarem Syndrom angezeigt sein (Rinke et al., 2018). Bei selektionierten Patienten kann auch eine Lebertransplantation erwogen werden (Rinke et al., 2018).

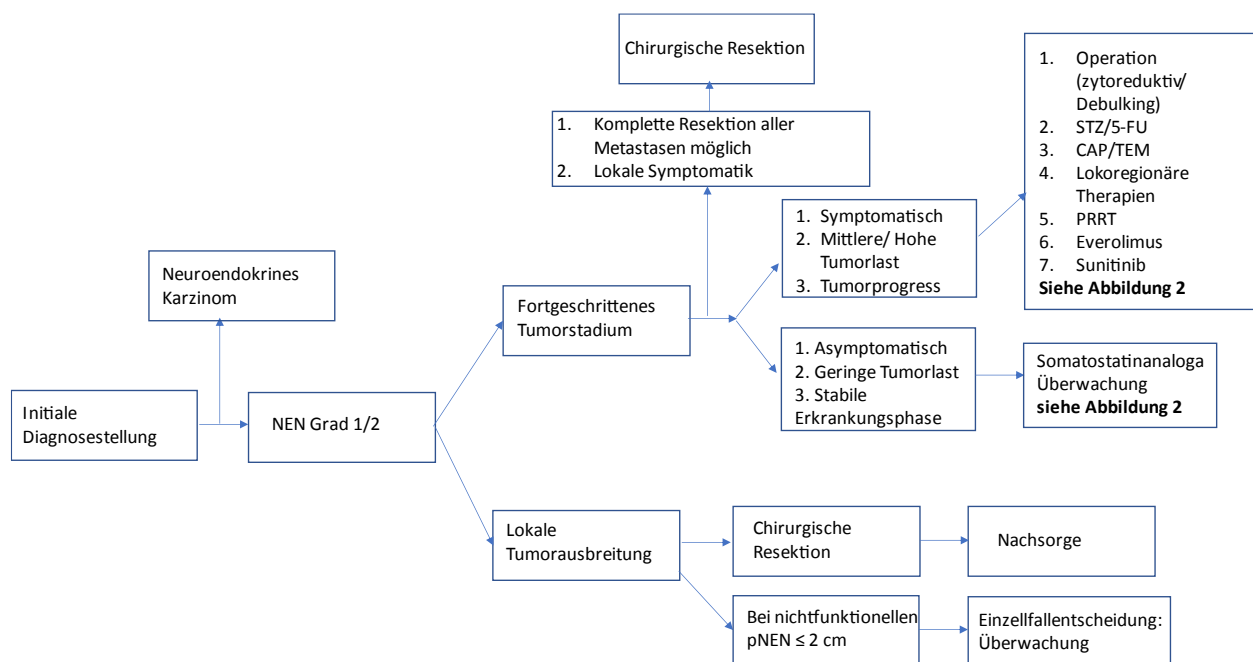
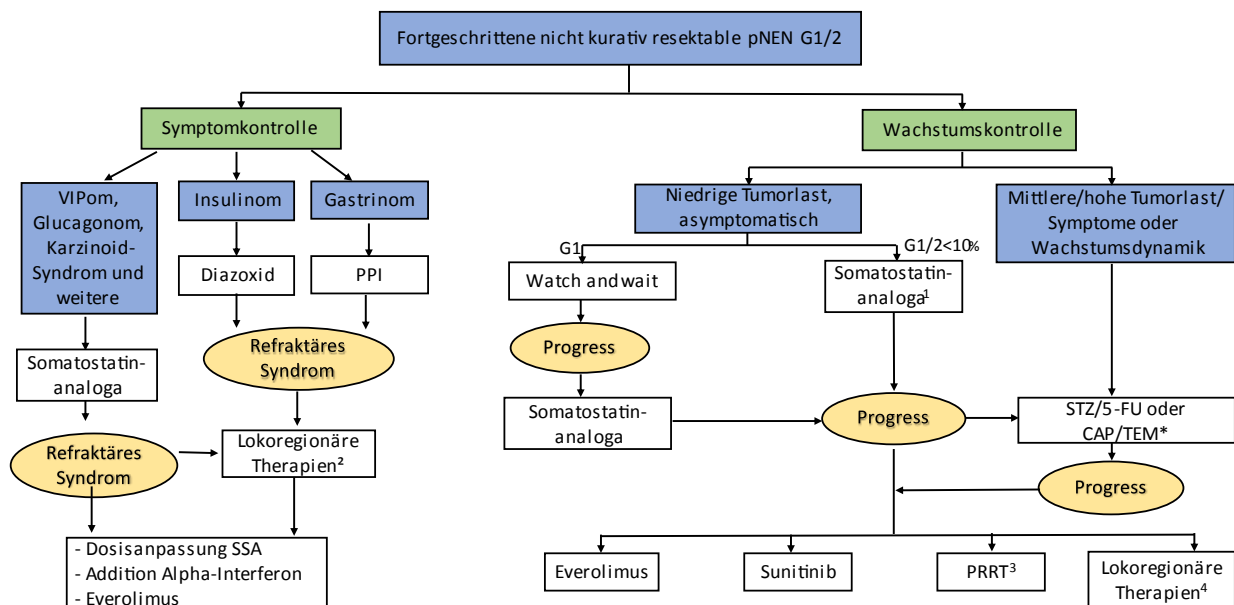


Abbildung 1. Therapie bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien ohne Hinweis auf eine multiple endokrine Neoplasie Typ 1. STZ = Streptozotocin; 5-FU = 5-Fluoruracil; CAP = Capecitabine; TEM = Temozolomid; PRRT = Peptid-Radio-Rezeptor-Therapie. Modifiziert nach Rinke et al., 2018, Choe et al. 2019.

In Einzelfallentscheidungen kann bei primär irresektablen pNEN eine neoadjuvante Therapie zur Reduktion der Tumormasse erfolgen. Hierfür existieren jedoch nur Einzelfallberichte (Rinke et al., 2018). In diesen Fällen sollte primär eine Therapie mit hoher Ansprechrate eingeleitet werden. Hierbei sind chemotherapiebasierte Regime wie Temozolomid (TEM), gegebenenfalls in Kombination mit Capecitabin oder Streptozotocin und 5-Fluoruracil (5-FU), den zielgerichteten Therapien wie Everolimus, Somatostatin-Analoga oder Sunitinib überlegen (Rinke et al., 2018). Die Ansprechraten der chemotherapiebasierten Regime liegen bei über 25 %, wohingegen sich bei den zielgerichteten Therapien Ansprechraten von unter 10 % gezeigt haben (Rinke et al., 2018). Eine Peptid-Radio-Rezeptor-Therapie kann ebenfalls zum Downstaging verwendet werden (Rinke et al., 2018).

Bei gut differenzierten, lokal fortgeschrittenen oder metastasierten und nicht resektablen pNEN kommen medikamentöse Therapieoptionen in Betracht. Die verschiedenen Optionen sollten interdisziplinär, üblicherweise im Rahmen eines Tumorboards, evaluiert werden. Es gibt eine große Bandbreite von Optionen, die von einem abwartenden Verhalten über medikamentöse bis hin zu lokoregionären Therapien reichen (**Abbildung 2**).



*nur bei Remissionsdruck, da offiziell nicht zugelassen

¹ausreichender Somatostatinrezeptorbesatz vorausgesetzt; ² bei prädominanter Lebererkrankung; ³ nicht bei heterogenem Rezeptorbesatz/ mismatch; ⁴ bei rein hepatischer Erkrankung, wenn allgemeine Voraussetzungen erfüllt

Abbildung 2. Vorgehen bei metastasierten oder lokal fortgeschrittenen und nicht resektablen pNEN G1/G2. PPI = Protonenpumpeninhibitoren; SSA = Somatostatinanaloga; STZ = Streptozotocin; 5-FU = 5-Fluoruracil; CAP = Capecitabine; TEM = Temozolomid; PRRT = Peptid-Radio-Rezeptor-Therapie. Modifiziert nach AWMF-Leitlinie (Rinke et al., 2018).

Bei funktionell aktiven pNEN sollte ein differenziertes Vorgehen je nach sezerniertem Hormon erfolgen. Bei einem Großteil der funktionell aktiven pNEN wird hierbei auf Somatostatinanaloga zurückgegriffen. Ausnahmen bilden insbesondere das Insulinom und das Gastrinom. Bei Insulinomen sollte, sofern der Allgemeinzustand des Patienten dies zulässt, eine Operation erfolgen, auch wenn bei einem malignen Insulinom keine kurative chirurgische Resektionsmöglichkeit besteht. Ziel der Operation ist dann eine Verbesserung der Hypoglykämiesymptomatik. Das Ausmaß der chirurgischen Resektion variiert abhängig von Sitz und Funktionalität der pNEN (Rinke et al., 2018). Bei Patienten mit MEN-1 assoziierten funktionellen oder nicht-funktionellen pNEN gelten ebenfalls modifizierte Therapierichtlinien (Rinke et al., 2018).

Bei Insulinomen und Gastrinomen werden gezielt Medikamente zur Reduzierung der Tumorsymptomatik eingesetzt. Sollten sich unter diesen Maßnahmen die Tumorsymptome nicht ausreichend reduzieren lassen, können lokoregionäre Therapien, insbesondere bei hepatischer

Metastasierung, oder Dosisanpassungen der Somatostatinanaloga erfolgen. Auch der „*mammalian target of rapamycin*“ (mTOR)-Inhibitor Everolimus (EVE) kann bei funktionell aktiven, therapierefraktären pNEN wie dem Insulinom zum Einsatz kommen (Rinke et al., 2018).

Für EVE existieren bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien mehrere prospektive, doppelblind randomisierte Studien (Yao et al., 2010, Yao et al., 2011, Kulke et al., 2017). Unter einer EVE-Therapie zeigte sich ein progressionsfreies Überleben von 9,7 - 16,8 Monaten gegenüber 4,6 Monaten bei Placebo. Die objektive Remissionsrate betrug 5 % im Vergleich zu 2 % bei Placebo (Yao et al., 2010, Yao et al., 2011, Kulke et al., 2017). Sunitinib, ein Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor, zeigte in einer Placebo-kontrollierten Studie eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von 5,5 auf 11,0 Monate mit einer objektiven Remissionsrate von 9,3 % (Raymond et al., 2011). In einer aktuelleren Phase-IV-Studie von der gleichen Arbeitsgruppe waren das progressionsfreie Überleben (13,2 Monate) und die objektive Remissionsrate (bis zu 28,9 %) noch höher (Raymond et al., 2018).

Es existieren aktuell keine prospektiv randomisierten Studienergebnisse, die den Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib und den mTOR-Inhibitor Everolimus miteinander vergleichen. Während sich in zwei retrospektiven Studien kein signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben oder der objektiven Ansprechrate bei pNEN zeigte (Angelousi et al., 2017, Yoo et al., 2017), wurden in einer weiteren Studie bessere Ergebnisse mit Everolimus erzielt (Daskalakis et al., 2019). Laut aktueller Leitlinie soll die Entscheidung zwischen diesen Therapieoptionen daher primär von dem Nebenwirkungsspektrum der Medikamente abhängig gemacht werden (Rinke et al., 2018).

Zur Kontrolle des Wachstums werden bei lokal fortgeschrittenen pNEN andere Therapiestrategien verfolgt. Es geht weniger um die Kontrolle der durch das sezernierte Hormon verursachten Symptome als um die Eindämmung des Tumorwachstums. Hierfür kommen neben den Somatostatinanaloga und lokoregionären Therapien auch Chemotherapeutika, Everolimus oder Sunitinib in Betracht.

Als Erstlinientherapie kommen bei pNEN mit einer hepatischen Tumorlast über 25 % und signifikantem Tumorprogress in den vergangenen 6 Monaten oder G2-pNEN mit einem Proliferationsindex von über 10 % verschiedene Chemotherapien zum Einsatz (Rinke et al., 2018). Die Standardtherapie stellt hierbei eine seit vielen Jahren eingesetzte Kombination aus Streptozotocin (STZ) und 5-FU dar. Bei STZ-basierten Regimen wurden in älteren Studien Ansprechraten von 45 – 69 % erzielt, die dabei höhere Ansprechrate im Rahmen einer Kombinationstherapie mit Doxorubicin (Moertel et al., 1980, Moertel et al., 1992). Auf Grund von kardiotoxischen Nebenwirkungen stellt heute jedoch die Kombination mit 5-FU den Standard dar. Neuere Studien identifizierten in dieser Kombination Remissionsraten von 28 - 42,7 %,

gegebenenfalls mit adaptiertem Therapieprotokoll (Dilz et al., 2015, Krug et al., 2015, Clewemar Antonodimitrakis et al., 2016, Schrader et al., 2019). Bei zusätzlicher Gabe von Bevacizumab, einem Angiogeneseinhibitor, konnten sogar noch höhere Ansprechraten erzielt werden, jedoch fehlen hier aktuell noch weitere Studien (Ducieux et al., 2014). Auch eine Kombination von STZ mit oralen Fluoropyrimidinen kann eine Möglichkeit darstellen (Ono et al., 2020).

Alternativ können auch orale Chemotherapeutika mit einer Kombination aus Capecitabin (CAP) und Temozolomid zum Einsatz kommen (Rinke et al., 2018). Bei diesen Zytostatika konnten mehrere retrospektive Studien Ansprechraten ähnlich denen von Streptozotocin demonstrieren, bei oftmals allerdings nur kleinen Fallzahlen (Saif et al., 2013, Mueller et al., 2016, Crespo et al., 2017, Roquin et al., 2018). Eine Studie mit 30 Patienten konnte eine objektive Ansprechrate von über 70 % darlegen (Strosberg et al., 2011). Eine spätere Studie aus dem gleichen Zentrum mit größerer Fallzahl zeigte eine Ansprechrate von 54 % (Cives et al., 2016). De Mestier et al. (2020) veröffentlichten aktuelle Studienergebnisse, in welcher TEM und die Kombination aus TEM/CAP verglichen wurde. Es zeigte sich in beiden Gruppen ein identisches progressionsfreies Überleben, wobei die objektive Ansprechrate in der Gruppe von TEM/CAP höher war (34 vs. 51 %), auch wenn sich kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte ($p = 0,088$).

Bei Progress der pNEN unter einer Therapie mit Somatostatinanaloga oder Chemotherapeutika kommen zur Wachstumskontrolle unter anderem molekulare zielgerichtete Therapien in Betracht (**Abbildung 2; siehe auch Kapitel 1.7**).

1.6. Prädiktive und prognostische Marker bei pNEN

Etablierte prädiktive Biomarker, die das Therapieansprechen der verschiedenen Behandlungsoptionen bei pNEN vorhersagen oder eingrenzen können, sind aktuell nicht vorhanden. Bezogen auf TEM existieren verschiedene Studien bezüglich einer Prädiktion des Therapieansprechens je nach O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Status bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien. Zudem wird bereits seit längerem an einer Möglichkeit zur Vorhersage des Therapieansprechens von pNEN auf Everolimus geforscht. Von entscheidender Bedeutung hierfür ist das Verständnis des Wirkmechanismus der Medikamente und der hierdurch beeinflussten intrazellulären Signalkaskaden.

Der aktuelle Wissensstand hinsichtlich der Therapieoptionen TEM und EVE wird unter den **Abschnitten 1.6 und 1.7** weiter ausgeführt.

Neuere Studien identifizierten zudem weitergehende molekulare Alterationen bei pNEN. Neben den genetischen Syndromen wie der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1, dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom, der Neurofibromatose Typ 1 oder der tuberösen Sklerose und der vermehrten Aktivierung des mTOR-Signalwegs konnte durch Sequenzierungsanalysen des gesamten Genoms beispielsweise eine erhöhte Häufigkeit inaktivierender Mutationen für *DAXX* (kodierendes Gen für „*Death Domain Associated Protein*“) und *ATRX* (kodierendes Gen für „*ATP-Dependent Helicase ATRX*“) gefunden werden (Jiao et al., 2011, Scarpa, 2019). Die Inaktivierung des Daxx/ Atrx-Komplexes ist wiederum mit chromosomaler Instabilität und alternativer Telomereelongation assoziiert und könnte daher mit weiteren Tumorcharakteristika in pNEN in Zusammenhang stehen (Scarpa, 2019, Bocchini et al., 2020). Darüber hinaus existieren weitere Untersuchungen und Überlegungen hinsichtlich möglicher gewebespezifischer oder zirkulierender Biomarker in pNEN (Bocchini et al., 2020).

Im Vergleich zu anderen gastroenteropankreatischen Neoplasien haben pNEN die schlechteste Prognose. Fraenkel et al. (2015) haben hierzu mehrere Studienergebnisse verschiedener Nationen zusammengefasst. Hierbei zeigte sich ein 5-Jahres-Überleben mit großen Schwankungen zwischen 8,5 – 78 % in Europa bei teils deutlichen regionalen Unterschieden. In Nord- und Westeuropa wurde eine 5-Jahres-Überlebensrate von 38,8 - 49,3 % berichtet (Lepage et al., 2010). Negative Prognosefaktoren waren insbesondere das Grading, ein fortgeschrittenes Tumorstadium und eine fehlende Funktionalität (Fraenkel et al., 2015).

1.7 Everolimus und der mTOR-Signalweg

Everolimus ist indiziert zur Behandlung von fortgeschrittenen, nicht kurativ resektablen pNEN mit guter oder mäßiger Differenzierung. In mehreren großen, multizentrischen, prospektiven, doppelblind-randomisierten Studien konnte die antineoplastische Wirkung von EVE bei gut differenzierten pNEN nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben unter einer Therapie mit EVE (Yao et al., 2010, Yao et al., 2011, Pavel et al., 2011, Kulke et al., 2017). Auf Basis dieser Studienlage erfolgte die Zulassung von EVE bei pNEN.

Der Wirkmechanismus von EVE erfolgt durch eine Komplexbildung des Medikaments mit dem intrazellulären Protein FKBP-12. Hierdurch wird die Aktivität des mTOR-Komplex 1 (englisch *mTOR complex 1* (mTORC1)) inhibiert (Schuler et al., 1997). mTORC1 ist an der Regulation der Translation und Proteinbiosynthese und damit unter anderem an der Regulation des Zellzyklus, der Glykolyse und der Angiogenese beteiligt (Briest und Grabowski, 2014).

1.7.1 Der mTOR-Signalweg

Der mTOR-Signalweg ist Gegenstand vieler verschiedener Studien und Forschungen. Durch die Beteiligung von mTOR an verschiedenen Proteinkomplexen erfolgt eine Regulation intrazellulärer Signalkaskaden, welche maßgeblich an der Translation, Zelldifferenzierung, Zellzyklusprogression und Zellmotilität beteiligt sind (**Abbildung 3**) (Briest und Grabowski, 2014).

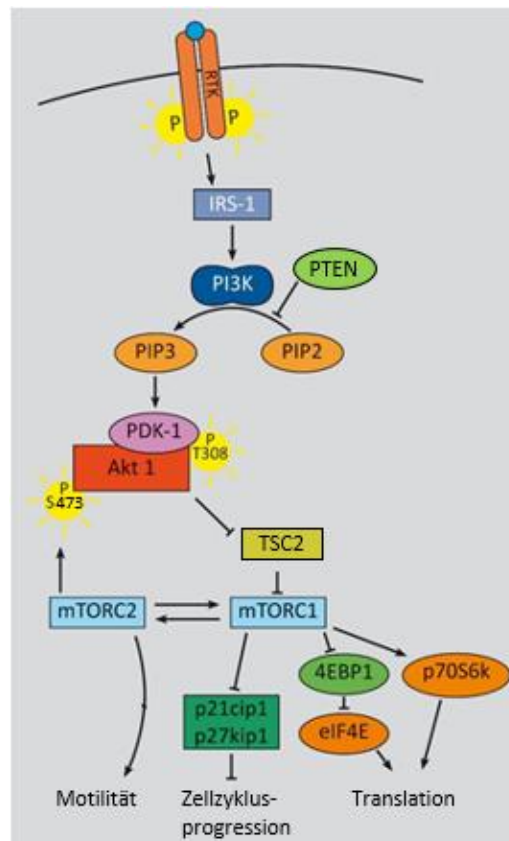


Abbildung 3. Der PI3K/mTOR-Signalweg. Durch Ligandenbindung von beispielsweise dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1 (blauer Punkt oben im Bild) an den insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptor erfolgt die Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase (RTK) mit Initiierung einer Phosphorylierungskaskade über das Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Nachfolgend kommt es zu einer Phosphorylierung von der Proteinkinase B 1 Alpha (*hier: Akt 1* (Akt-1)) an T308 durch die „3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1“ (PDK-1), sowie eine Phosphorylierung an S473 durch den mTOR-Komplex 2 (mTORC2). Durch Akt 1 wird die Komplexbildung von „*Tuberous sclerosis 1 und 2*“ durch Phosphorylierung von „*Tuberous sclerosis 2*“ (TSC2) inhibiert, was zu einer vermehrten Aktivität des mTOR-Komplex 1 (mTORC1) führt. Durch mTORC1 wird über weitere Zwischenschritte die Translation und Zellzyklusprogression stimuliert. Das Tumorsuppressorprotein „*phosphatase and tensin homolog*“ (PTEN) inhibiert die Signalkaskade. Auf die Darstellung von negativen Rückkopplungsschleifen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Modifiziert nach Briest und Grabowski, 2014.

Die Aktivierung des mTOR-Signalwegs kann durch Wachstumsfaktoren, Aminosäuren, Glucose oder den insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1 (englisch: *insulin-like growth factor 1* (IGF-1)) erfolgen (Samani et al., 2007, Laplante und Sabatini, 2009). So bindet beispielsweise IGF-1 an

den insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (englisch: *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R)), eine Rezeptortyrosinkinase, um die intrazelluläre Signaltransduktion einzuleiten.

Bei NEN konnte nachgewiesen werden, dass vermehrt IGF-1 sezerniert wird (von Wichert et al., 2000, Furukawa et al., 2005, Vitale et al., 2006, Samani et al., 2007). Durch eine erhöhte Konzentration von IGF-1 kann es zu einem vermehrten Tumorwachstum und zu einer vermehrten Sekretion neuroendokriner Proteine kommen (von Wichert et al., 2000, Furukawa et al., 2005).

Das insulinähnliche Wachstumsfaktor-Bindungsprotein-3 (englisch: *insulin-like growth factor-binding protein 3* (IGFBP-3)) reguliert den durch IGF-1 initiierten Signalweg. Durch die Bindung von IGFBP-3 an IGF-1 im Serum wird die zur Signaltransduktion frei verfügbare Menge von IGF-1 reduziert (Firth und Baxter, 2002, Foulstone et al., 2005). Laut Baxter (2014) kann IGFBP-3 allerdings sowohl als Tumorsuppressor, als auch als Tumorpromotor fungieren.

Bei pNEN konnte eine erhöhte Expression von IGFBP-3 bei fortgeschrittenen metastasierten Tumorstadien nachgewiesen werden (Maitra et al., 2003, Hansel et al., 2004). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Expression von IGFBP-3 bei pNEN die Möglichkeit einer Selbstregulation des IGF-1-Spiegels darstellt (Briest und Grabowski, 2014). Bei Insulinomen mit pankreatischem Primarius konnte bestätigt werden, dass ein erhöhter IGFBP-3-Spiegel mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Henfling et al., 2018). Welche genauen Mechanismen von IGFBP-3 bei pNEN entscheidend sind, ist noch nicht abschließend geklärt.

Durch die Autophosphorylierung des IGF-1R kann eine Bindung des Insulin-Rezeptor-Substrats-1 (IRS-1) an den IGF-1R erfolgen (Samani et al., 2007). Hierdurch wird, über weitere Zwischenschritte, eine Signaltransduktion durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) beziehungsweise der Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase katalytischen Untereinheit alpha (PIK3CA) eingeleitet. Mit Hilfe von Adenosintriphosphat werden schrittweise Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol-4-Phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat phosphoryliert. Der weitergehende Signalweg wird durch das Produkt Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) eingeleitet (Briest und Grabowski, 2014). Die PI3K ist an dem letzten Schritt dieser Phosphorylierungskette beteiligt.

Bei pNEN konnte nachgewiesen werden, dass es in 1,4 % der Fälle zu einer Mutation in dem für PIK3CA kodierenden Gen kommt. Durch die entstehende erhöhte Kinaseaktivität wird die PI3K-Signalkaskade hochreguliert (Jiao et al., 2011).

Ein Inhibitor der PI3K/mTOR-Signalkaskade ist das Tumorsuppressorprotein „*phosphatase and tensin homolog*“ (PTEN) (Li et al., 1997). PTEN ist eine Phosphatase, welche eine Phosphatgruppe von PIP3 entfernt und hierdurch den weitergehenden Signalweg inhibiert (Steck

et al., 1997, Furnari et al., 1998). PTEN ist unter anderem in den Reparaturprozess der DNA involviert, ohne jedoch ein direktes DNA-Reparatur Enzym zu sein (Jiao et al., 2011).

Die Rolle von PTEN wurde in verschiedenen Studien bei pNEN untersucht (Perren et al., 2000, Missiaglia et al., 2010, Jiao et al., 2011, Yachida et al., 2012, Han et al., 2013). In zwei Studien präsentierte sich immunhistochemisch in über 40 % der pNEN eine reduzierte Expression von PTEN, wohingegen sich aus vier anderen Studien eher keine höhergradigen Mutationshäufigkeiten ableiten ließen (Perren et al., 2000, Arnold et al., 2007, Missiaglia et al., 2010, Jiao et al., 2011, Yachida et al., 2012, Han et al., 2013). Es konnte herausgestellt werden, dass eine verminderte Expression von PTEN mit einer schlechteren Prognose und eine vermehrte Expression mit einem erhöhten Therapieansprechen für verschiedene Chemotherapeutika einhergeht (Missiaglia et al., 2010, O'Toole et al., 2010, Han et al., 2013).

Durch die Synthese von PIP3 kommt es zu einer Phosphorylierung der Proteinkinase B mit Hilfe der Protein-3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase-1 (Cantley, 2002). Eine der Isoformen der Proteinkinase B ist die Proteinkinase B 1, mit ihrer Untereinheit alpha (Akt-1). Akt-1 ist primär an der Regulation des Zellwachstums und -überlebens, sowie der Signalkaskade der Proteinbiosynthese beteiligt (Chen et al., 2001). Die Phosphorylierung von Akt-1 durch die Protein-3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase-1 führt jedoch nur zu einer teilweisen Aktivierung. Zusätzlich bedarf es einer weiteren Phosphorylierung von Akt-1 mit Hilfe des mTOR-Komplex 2 (englisch: *mTOR complex 2* (mTORC2)) an einer weiteren Lokalisation (Briest und Grabowski, 2014).

An der Komplexbildung von mTORC2 sind insgesamt sechs verschiedene Proteine beteiligt, unter anderem „*Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin*“ (Rictor), „*DEP Domain Containing mTOR Interacting Protein*“ (Deptor) und „*mammalian lethal with SEC13 protein 8*“ (mLST8) (Laplanche und Sabatini, 2009, Briest und Grabowski, 2014). Die weiteren Bestandteile des mTORC2 sind mit ihren jeweiligen Funktionen in **Tabelle 4** aufgeführt.

Durch die Phosphorylierung an zwei verschiedenen Lokalisationen von Akt-1 kommt es zu einer fünf Mal so hohen Aktivität im Vergleich zu einer unilokulären Phosphorylierung (Alessi et al., 1996, Sarbassov et al., 2005, Guertin et al., 2006). In GEP-NEN zeigte sich in 61 – 76 % der Fälle immunhistochemisch eine Expression von aktivierter Akt-1 (Shah et al., 2006, Ghayouri et al., 2010). O'Toole et al. (2010) konnten nachweisen, dass eine vermehrte Akt-1 Expression in NEN mit einem verminderten Ansprechen auf verschiedene chemotherapeutische Optionen assoziiert ist.

Nach Aktivierung phosphoryliert Akt-1 das Protein „*Tuberous sclerosis 2*“ (TSC2) (Inoki et al., 2002, Potter et al., 2002). TSC2 bildet gemeinsam mit „*Tuberous sclerosis 1*“ (TSC1) einen Komplex (TSC1/2) (Inoki et al., 2002). Durch Phosphorylierung kann die Komplexbildung von

TSC1/2 nur in reduziertem Maße erfolgen, wodurch dessen inhibierende Funktion auf den Proteinkomplex mTORC1 reduziert wird. Durch die resultierende erhöhte Aktivität einer GTPase kommt es daher zu einer vermehrten Aktivierung des mTORC1 (Inoki et al., 2003). mTORC1 wiederum inhibiert beispielsweise Proteinkinaseinhibitoren (Nourse et al., 1994, Luo et al., 1995). Die einzelnen Untereinheiten und Strukturkomponenten des mTORC1 sind mit den jeweiligen Funktionen in **Tabelle 4** aufgeführt.

Während mTORC2 resistent gegenüber Rapamycin ist, ist mTORC1 sensibel gegenüber therapeutischen Optionen wie Rapamycin, Everolimus und Temsirolimus (Yang und Guan, 2007).

Tabelle 4. Bestandteile des mTOR-Komplex 1 und 2. mTOR: „Mammalian target of rapamycin“; Raptor: „Regulatory associated protein of mTOR“; mLST8: „Mammalian lethal with SEC13 protein 8“; Deptor: „DEP Domain Containing mTOR Interacting Protein“; PRAS40: „Proline rich Akt substrate 40 kDa“; Rictor: „Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin“; mSin1: „Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein“; PROTOR-1: „Protein observed with Rictor-1; PRR5: Proline-rich protein 5“ (Guertin et al., 2006, Frias et al., 2006, Woo et al., 2007, Peterson et al., 2009, Laplante und Sabatini, 2009, Briest und Grabowski, 2014).

mTOR Komplex 1	Funktion	mTOR Komplex 2	Funktion
mTOR	Katalytische Untereinheit	mTOR	Katalytische Untereinheit
Raptor	Strukturkomponente; stimulierende Wirkung auf mTOR	Rictor	Stabilisiert PROTOR-1; Strukturkomponente
mLST8	Stimuliert Kinaseaktivität; sorgt für Interaktion zwischen mTORC1 und mTORC2	mLST8	Stabilisiert mTORC2; stimuliert Kinaseaktivität
Deptor	Inhibiert mTORC1-Aktivität	mSin1	Stabilisiert Rictor; Strukturkomponente von mTORC2; relevant für intrazelluläre Lokalisation
PRAS40	Inhibiert mTORC1-Aktivität	PRR5/PROTOR-1	Genauer Wirkmechanismus unklar
		Deptor	Inhibiert mTORC2 Aktivität

Durch mTORC1 werden zwei Schlüsselproteine phosphoryliert - das „*eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1*“ (4EBP1) und die Protein S6 Kinase 1 (Nojima et al., 2003, Inoki et al., 2003, Laplante und Sabatini, 2009). Durch letzteres wird über Phosphorylierung von Ribosomen die Translation der mRNA und die Proteinsynthese angeregt (Nojima et al., 2003, Faivre et al., 2006). Durch die entstehenden Translationsprodukte kann wiederum eine negative Rückkopplung über den IGF-1-Signalweg erfolgen (Manning, 2004).

4EBP1 inhibiert die Initiierung weiterer translationaler Prozesse durch eIF-4E. Durch Phosphorylierung von 4EBP1 durch mTORC1 kommt es zur Dissoziation des Komplexes 4EBP1/eIF-4E, wodurch die Translationsinitiation durch 4eIF-4E erfolgen kann (Pause et al., 1994, Richter und Sonenberg, 2005). Dies resultiert in einer vermehrten Expression von

vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (englisch *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)), wie z.B. VEGF-A, was zu einer vermehrten Angiogenese führt (Zhong et al., 2000, Maity et al., 2000, Karar und Maity, 2011). Die Rolle von VEGF-A für die Angiogenese konnte bei pankreatischen endokrinen Zellen und neuroendokrinen Neoplasien bestätigt werden (Inoue et al., 2002, Lammert et al., 2003, Zhang et al., 2007). Couvelard et al. (2005) zeigten, dass bei pNEN die Expression von VEGF negativ mit dem Tumorstadium und dem Grading (G) korreliert. Zusätzlich werden über den PI3K-Signalweg weitere proangiogenetische Faktoren vermehrt exprimiert (Karar und Maity, 2011).

Es gibt viele weitere Proteine und Faktoren, die an der Regulation der mTOR-Signalkaskade beteiligt sind (Laplane und Sabatini, 2009, Briest und Grabowski, 2014). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde sich für diese Arbeit auf eine Auswahl beschränkt.

Briest und Grabowski (2014), sowie Lamberti et al. (2018) fassten in Übersichtsarbeiten viele Erkenntnisse über den mTOR-Signalweg in NEN zusammen. Der Großteil der publizierten Arbeiten konzentriert sich hierbei auf Mutationsanalysen auf genetischer Ebene oder immunhistochemische Expressionsanalysen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Fokus auf die mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene gelegt werden. Da die jeweilig zugehörigen Proteine auf unterschiedlichen Ebenen des mTOR-Signalwegs die Signaltransduktion beeinflussen, sollten weitergehend die intergenetischen Expressionskorrelationen untersucht werden.

1.8 Temozolomid und die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Temozolomid ist ein Zytostatikum, welches mittels Alkylierung der DNA eine antineoplastische Wirkung entfaltet. Bei TEM handelt es sich um ein sogenanntes Prodrug, welches durch Metabolisierung zu 5-(3-Methyltriazin-1-yl) Imidazole-4-Carboxamid (MTIC) aktiviert wird (Koumariou et al., 2015). MTIC bewirkt eine Alkylierung an der O⁶-Position von Guanin mit zusätzlicher Alkylierung an der Position N⁷. Durch das entstehende O⁶-Methylguanin kommt es zu einer Fehlpaarung mit Thymin bei der DNA-Replikation. Durch enzymatische Reaktionen, mit dem Ziel der Entfernung dieser Methylgruppe, entstehen Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA mit resultierendem zytotoxischem Effekt (Newlands et al., 1997).

TEM wird insbesondere bei hirneigenen Tumoren wie dem Glioblastom als Chemotherapeutikum eingesetzt. Auch bei fortgeschrittenen, nicht kurativ resektablen G1/2 pNEN kommt es zur Wachstumskontrolle bei niedriger Tumorlast und primär asymptomatischem Verlauf mit Progress unter Somatostatinanaloga zum Einsatz. Weiterhin ist TEM bei hoher Tumorlast,

Tumorsymptomatik oder Wachstumssymptomatik in Kombination mit Capecitabin indiziert (**Abbildung 2**) (Rinke et al., 2018). In einer prospektiven Studie in den USA wird aktuell untersucht, ob bei fortgeschrittenen pNEN die Kombinationstherapie TEM/CAP einer alleinigen Therapie mit TEM überlegen ist (www.clinicaltrials.gov) (Rinke et al., 2018). In einer retrospektiven Studie zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben oder bezüglich des Therapieansprechens bei einem Vergleich zwischen der Mono- und Kombinationstherapie (de Mestier et al., 2020).

1.8.1 Die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)

Das *MGMT*-Gen kodiert die Sequenz für die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (Synonym: O⁶-Methylguanin-DNA-Alkyltransferase) und ist im Bereich von 10q26 lokalisiert (Natarajan et al., 1992). MGMT ist ein Protein, welches an dem Reparaturprozess bei DNA-Schäden beteiligt ist (Esteller et al., 1999). Es entfernt eine Alkylgruppe an der O⁶-Position von Guanin (Esteller et al., 1999). Dies führt zu einer Umwandlung von O⁶-Methylguanin zu Guanin (Esteller et al., 1999). Hierdurch wird einem potenziell karzinogenem DNA-Defekt entgegengewirkt (Liu et al., 2016).

In Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass es bei einer verringerten Expression von MGMT und einer Exposition von alkylierenden Substanzen ein erhöhtes Krebsrisiko besteht (Shiraishi et al., 2000). Eine vermehrte Akkumulation von O⁶-Methylguanin führt zu einem erhöhten Risiko an verschiedenen Malignomen wie Glioblastomen, Lymphomen oder auch pankreatischen Tumoren zu erkranken (Liu et al., 2016).

Der DNA-Reparaturprozess durch MGMT erfolgt als stöchiometrische Reaktion. Das Entfernen der Alkylgruppe erfolgt durch eine Übertragung der entsprechenden Gruppe auf MGMT ohne nachfolgende Wiederherstellung der Akzeptorstelle von MGMT. Dies kommt einer „Selbstmordreaktion“ des Proteins gleich. Entsprechend ist dieser unidirektionale Reparaturmechanismus von der verfügbaren Menge beziehungsweise der Konzentration von MGMT abhängig (**Abbildung 4**) (Koumariou et al., 2015). Eine Beeinflussung dieser Konzentration kann zum Beispiel mittels epigenetischer Modifikation erfolgen. Eine vermehrte Alkylierung der DNA, beispielsweise auf Grund einer Therapie mit Alkylanzien, kann einen ähnlichen Effekt haben (Pegg, 1990).

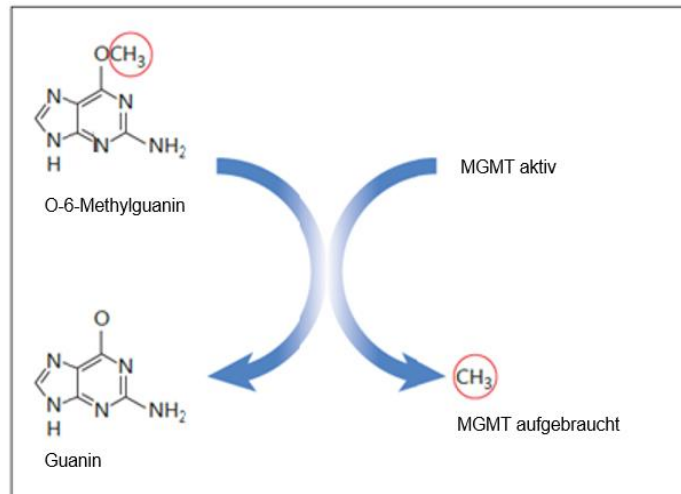


Abbildung 4. Wirkmechanismus von Temozolomid und MGMT. Die durch Temozolomid zuvor hinzugefügte Methylgruppe (CH₃; rot eingekreist) wird durch MGMT im Rahmen einer stöchiometrischen Reaktion entfernt. Modifiziert nach Koumariou et al., 2015.

Dem Wirkmechanismus des Chemotherapeutikums Temozolomid wird entsprechend durch eine vermehrte Expression von MGMT entgegengewirkt (Liu et al., 2016). Durch epigenetische Modifikationen kann die Expression von MGMT verändert werden (Soejima et al., 2005). Auf epigenetischer Ebene wird die MGMT-Expression durch die Methylierung im Bereich der Promotorregion reguliert (Pegg, 1990, Esteller et al., 1999).

Im Bereich von CpG-Inseln, ein Abschnitt des Genoms mit erhöhter Cytosin-Guanin-Dinukleotiddichte, können diese Modifikationen, insbesondere durch Anlagerung von Methylgruppen an die Nukleinbase Cytosin, vorkommen (Esteller et al., 1999). Durch Hypermethylierung der CpG-Inseln einer Promotorregion kann es zu einer verminderten Transkription des entsprechenden Genabschnittes mit nachfolgend verminderter Translation und Expression des kodierten Proteins kommen (Jaenisch und Bird, 2003). Dieser Mechanismus ist für das *MGMT*-Gen beschrieben (Esteller et al., 1999).

Grundsätzlich kann der „MGMT-Status“ durch immunhistochemische Untersuchungen, entsprechend der Nachweisbarkeit einer Expression, oder durch Analyse der Methylierung der CpG-Inseln der Promotorregion erhoben werden. Letzteres kann entweder mittels methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder durch Pyrosequenzierung erfolgen. In verschiedenen Studien zeigten sich divergente Ergebnisse bezüglich einer Korrelation zwischen der Promotormethylierung und der immunhistochemischen Expression von MGMT.

Bei Glioblastomen hat die Einschätzung des Methylierungsstatus der Promotorregion von *MGMT* bereits Einzug in die Routinediagnostik erhalten (Hofer et al., 2019). Eine Hypermethylierung der *MGMT*-Promotorregion hat bei dieser Tumorentität sowohl therapeutische als auch

prognostische Bedeutung (Hegi et al., 2005, Wick et al., 2012, Malmstrom et al., 2012). Christians et al. (2012) empfahlen bei Glioblastomen die Analyse der *MGMT*-Promotorregion mittels Pyrosequenzierung oder methylierungsspezifischer PCR. Radke et al. (2019) konnten bestätigen, dass bei Glioblastomen das Gesamtüberleben mit der durch Pyrosequenzierung erhobenen Promotormethylierung von *MGMT* korreliert. Sie schlugen vor, dass bei 10 bis 20 % methylierter Allele der *MGMT*-Promotorregion neben der Pyrosequenzierung eine weitere Methode verwendet werden sollte, um diese Ergebnisse zu bestätigen (Radke et al., 2019).

Bei NEN, insbesondere bei pNEN, existieren einige Studien mit teils konträren Ergebnissen. Es wurden verschiedene Methoden verwendet, um den *MGMT*-Status zu erheben (Kulke et al., 2009, Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Raj et al., 2017, Girot et al., 2017).

Immunhistochemisch zeigte sich in 16 – 66 % der Patienten mit pNEN ein Verlust oder eine Verminderung der *MGMT*-Expression (Ekeblad et al., 2007, Kulke et al., 2009, Gilbert et al., 2013, Schmitt et al., 2014, Yang et al., 2014, Walter et al., 2015, Cives et al., 2016, Raj et al., 2017, Krug et al., 2017, Owen et al., 2017). Eine Hypermethylierung im Bereich der *MGMT*-Promotorregion bei pNEN wurde in 14 – 56 % der Fälle detektiert (Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Girot et al., 2017, Raj et al., 2017, Campana et al., 2018). Die Vergleichbarkeit der Studien ist auf Grund von verschiedenen Referenzwerten (Methylierungsreferenzwert 7 - 20 % der Allele) und heterogenen immunhistochemischen Auswertungssystemen deutlich limitiert. Eine signifikante Korrelation der Methylierung der *MGMT*-Promotorregion mit der *MGMT*-Expression zeigte sich in der Mehrzahl der Studien nicht (Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Girot et al., 2017).

Während sich in einigen Studien bei pNEN der *MGMT*-Status als prädiktiver Marker für das Therapieansprechen auf TEM oder andere alkylierende Substanzen herauskristallisierte (Kulke et al., 2009, Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Campana et al., 2018), standen andere Studien hierzu im Widerspruch (Ekeblad et al., 2007, Cives et al., 2016, Girot et al., 2017, Raj et al., 2017, Krug et al., 2017). Hijioka et al. (2019) zeigten in einer kleinen Gruppe (n = 13) gut differenzierter pNEN bei fehlender *MGMT*-Expression im Tumorgewebe ein gutes Ansprechen auf Streptozotocin. Aktuelle Ergebnisse einer prospektiven Studie aus Frankreich bei NEN werden noch erwartet (Lemelin et al., 2019).

1.9 Fragestellung und Zielsetzung

Für gut differenzierte pankreatische neuroendokrine Neoplasien existieren verschiedene antineoplastische Therapieoptionen. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es jedoch keine etablierten diagnostischen Möglichkeiten das Therapieansprechen der medikamentösen Therapieoptionen vorherzusagen.

Auf Grundlage der in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen intrazellulären Prozesse und Signalkaskaden und vorheriger Studienergebnisse, erfolgte daher an einem definierten Patientenkollektiv mit gut differenzierten pNEN (G1/2) eine Analyse der mRNA-Expression verschiedener Mitglieder der mTOR-Signalkaskade. Zusätzlich wurden die MGMT-Expression und die Methylierung der Promotorregion des *MGMT*-Gens untersucht.

Weitergehend sollten die entsprechenden molekularpathologischen und immunhistochemischen Ergebnisse mit den klinischen Charakteristika in Bezug gesetzt werden. Ergänzend wurde zusätzlich eine Subgruppenanalyse derjenigen Patienten, die entweder eine Therapie mit Temozolomid oder Everolimus erhalten hatten, durchgeführt.

Darüber hinaus sollte für eine weitergehend geplante prospektive Studie auf Grundlage dieser theoretischen Überlegungen die mögliche Patientenanzahl der unterschiedlichen Therapiearme evaluiert werden.

Hieraus ergaben sich insbesondere folgende Fragestellungen:

Teil „mTOR“:

- 1.) Zeigen sich Unterschiede in der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene zwischen pNEN und normalem Pankreasgewebe?
- 2.) Inwiefern zeigen sich intergenetische Korrelationen der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene in pNEN?
- 3.) Kann in pNEN eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden?
- 4.) Korreliert die mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene mit den klinischen Charakteristika in pNEN?
- 5.) Eignet sich die mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene in einer Subgruppenanalyse zur Abschätzung des Therapieansprechens auf Everolimus?

Teil „MGMT“:

- 6.) Wie hoch ist der prozentuale Anteil der pNEN, die eine Methylierung der *MGMT*-Promotorregion aufweisen?

- 7.) Lässt sich eine Überlegenheit eines bestimmten Referenzwertes bei der prozentualen Anzahl methylierter Allele der *MGMT*-Promotorregion zur Dichotomisierung in Hinblick auf eine Assoziation zu den klinischen Charakteristika herausarbeiten?
- 8.) Bei wie vielen Prozent der pNEN liegt eine Proteinexpression von *MGMT* vor?
- 9.) Korreliert die *MGMT*-Promotormethylierung mit der Proteinexpression von *MGMT* in pNEN?
- 10.) Existiert eine Assoziation der *MGMT*-Promotormethylierung und/oder der *MGMT*-Expression mit den klinischen Parametern?
- 11.) Eignet sich die Analyse des Methylierungsgrades der *MGMT*-Promotorregion und/oder die Proteinexpression von *MGMT* in einer Subgruppenanalyse zur Abschätzung des Therapieansprechens auf Temozolomid?

Kombiniert „MGMT und mTOR“:

- 12.) Kann auf Grundlage der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene und/oder der Proteinexpression von *MGMT* beziehungsweise der *MGMT*-Promotormethylierung abgeschätzt werden, wie viele Patienten für eine mögliche weiterführende prospektive Studie für die beiden Therapieoptionen Everolimus und Temozolomid in Frage kommen würden?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1. Laborequipment

Tabelle 5. Laborequipment.

Instrument oder Gerät	Hersteller	Land
Qubit Fluorometer	Invitrogen	USA
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG	Deutschland
Immunfärbeautomat	Dako	Deutschland
Mx3005p Real-Time PCR System	Agilent Technologies	Deutschland
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Werke GmbH & Co. KG	Deutschland
Scientific Vortex G-560	Scientific Industries, Inc.	USA
IKA Vortex Genius 3	IKA Werke GmbH & Co. KG	Deutschland
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf AG	Deutschland
Pipetus	Thermo Fisher Scientific	USA
Pyro-Mark Q24-System	Qiagen	Niederlande
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen	Niederlande
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Deutschland
Tischzentrifuge Qik spin QS7000	Süd-Laborbedarf GmbH	Deutschland
Thermomixer Comfort (Heizblock)	Eppendorf AG	Deutschland
Realplex ep Gradient S Thermozykler	Eppendorf AG	Deutschland
MagJET Separation Rack, 12 x 1.5 mL tube	Thermo Fisher Scientific	USA
MagnaRack™ Gestell für magnetische Separation	Invitrogen	USA
Benchmark XT Autostainer	Ventana Medical Systems	USA
Thermo Scientific Shandon Objektträgerhalter	Thermo Fisher Scientific	USA
Laborglasflaschen 250 ml Schott-Duran	DWK Life Sciences GmbH	Deutschland

2.1.2 Verbrauchs- und Labormaterial

Tabelle 6. Labormaterial.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Land
Biozym SafeSeal-Tips Professional (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Biozym GmbH	Deutschland
Eppendorf Tubes (1,5ml/ 2ml)	Eppendorf AG	Deutschland
Falcon Röhren (15ml/ 50ml)	Sarstedt AG & Co	Deutschland
Qubit Assay Tubes	Invitrogen	USA
Objekträger SuperFrost Plus™	Thermo Scientific	USA
PyroMark Q24 Plate	Qiagen	Niederlande
PyroMark Q24 Kartusche	Qiagen	Niederlande
24- Well Platten	Thermo Scientific	USA
Chirurgische Einmal-Skalpelle	B. Braun	Deutschland
DNA LoBind Tubes (1,5ml/ 2ml)	Eppendorf AG	Deutschland
Serologische Pipette (5ml/ 10ml)	Sarstedt AG & Co	Deutschland
Handschuhe Vasco Nitril weiß M	B. Braun	Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7. Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller	Land
Ethanol 100 %	Herbeta Arzneimittel	Deutschland
Ethanol ≥99,5 %	Carl Roth	Deutschland
2-Propanol	Carl Roth	Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich	USA
Xylol	Carl Roth	Deutschland
Methanol	Carl Roth	Deutschland
RNase-freies Wasser	Qiagen	Niederlande
Proteinase K	Qiagen	Niederlande
RNase A	Qiagen	Niederlande
Ampuwa® destilliertes Wasser	Fresenius SE & Co. KGaA	Deutschland
10mM Citratpuffer, pH 6,0	Roth	Deutschland
Bidestilliertes Wasser	Medicalcorner24	Deutschland
Zitronensäure (0,1 molar)	Sigma-Aldrich	USA
10mM Citratpuffer, pH 6,0	Roth	Deutschland
EMSURE 30 % Wasserstoffperoxid	Merck AG	Deutschland
Fettfreie Trockenmilch	Bio-Rad	USA
Kaninchenserum (Kat. Nr. R4505)	Sigma-Aldrich	USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich	USA
PyroMark Gold Q24 Reagenzien (Kat. Nr. 970802)	Qiagen	Niederlande
PyroMark Bindungspuffer (Kat. Nr. 979006)	Qiagen	Niederlande
PyroMark Denaturierungs-Lösung (Kat. Nr. 979007)	Qiagen	Niederlande
PyroMark Waschpuffer (Kat. Nr. 979008)	Qiagen	Niederlande
PyroMark Hybridisierungspuffer (Kat. Nr. 979009)	Qiagen	Niederlande
Streptavidin Sepharose Hochleistung (Kat. Nr. 17-5113-01)	Cytiva	USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurden destilliertes Wasser und Salzsäure verwendet.

Tabelle 8. Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller	Land
DNase Buffer 10x, (Kat. Nr. AM8170G)	Nach Herstellerangaben	Thermo Fisher Scientific	USA
10 mM Citratpuffer, pH 6,0	29,4g Tri-Natriumcitrat-2-hydrat 1000ml destilliertes Wasser	Roth Fresenius SE &Co KGaA	Deutschland Deutschland
3'3-Diaminobenzidin - Substratlösung:	100ml 0,05M Tris (pH 7,5) 0,1g 3'3-Diaminobenzidin 50ml 30 % Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Merck AG	USA USA Deutschland
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) (Kat. Nr. 3813)	Nach Herstellerangaben	Sigma-Aldrich	USA

2.1.5 Kits

Tabelle 9. Kits.

Kits	Hersteller	Land
Dako REAL™ Detection System, APAAP (Maus) K5000	Dako	Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit (Kat. Nr. SP-2001)	Vector	USA
Quant-iT dsDNA HS Assay Kit, 100 assays *0.2-100ng* (10pg/µl-100ng/µl) (Kat Nr. Q32851)	Invitrogen	USA
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) (Kat. Nr. 56404)	Qiagen	Niederlande
Quant-iT RNA Assay Kit, 100 assays 5-100ng (250pg/µl-100ng/µl) (Kat. Nr. Q32852)	Invitrogen	USA
EZ DNA Methylation-Kit (Kat. Nr. D5001)	Zymo Research	USA
Pyro Mark PCR Kit (200) (Kat. Nr. 978703)	Qiagen	Niederlande
PyroMark Q24 CpG MGMT (4 x 24) (Kat. Nr. 970032)	Qiagen	Niederlande
Stratifyer XTRAKT FFPE Kit (Kat. Nr. XTK2.0-96)	STRATIFYER Molecular Pathology GmbH	Deutschland
SuperScript III Platinum einstufiges qRT-PCR-Kit (Kat. Nr. 11732020)	Invitrogen	USA

2.1.6 Enzyme

Tabelle 10. Enzyme.

Enzyme	Hersteller	Land
DNase I (Kat. Nr. AM2222)	Life technologies	USA
Proteinase K (Kat. Nr. 03115852001)	Roche	Schweiz
RNase A 100mg/ml (Kat. Nr. 19101)	Qiagen	Niederlande

2.1.7 Antikörper

Tabelle 11. Antikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Land
MIB-1-Antikörper (Kat. Nr. GA62661-2) (Maus)	1:2000	Dako	Deutschland
Anti-MGMT (Kat. Nr. 35-7000) (Maus)	1:50	Invitrogen	USA
Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Land
Polyklonale Anti-Maus-Immunglobuline (Kat. Nr. P026002-2) (Kaninchen)	1:200	Dako	Deutschland
Anti-Maus IgG, Sekundärantikörper, Biotin (Kat. Nr. PA1-28567) (Kaninchen)	1:1000	Invitrogen	USA

2.1.8 Genexpressionsassays

Tabelle 12. TaqMan Genexpressionsassays der Firma STRATIFYER Molecular Pathology GmbH.

Gen	Assay-ID
<i>CALM2</i> (Haushaltsgen)	MP501
<i>MTOR</i>	MP629
<i>AKT-1</i>	MP147
<i>MLST8</i>	MP680
<i>PIK3CA</i>	MP681
<i>DEPTOR</i>	MP682
<i>IGF-1</i>	MP683
<i>IGFBP-3</i>	MP684
<i>4EBP1</i>	MP685
<i>RAPTOR</i>	MP687
<i>RICTOR</i>	MP688
<i>VEGF-A</i>	MP016

2.1.9 Software

Tabelle 13. Software.

Software	Hersteller	Land
PyroMark Q24 Software (Version 2.0)	Qiagen	Niederlande
MxPro QPCR Software (Version 4.10.)	Agilent Technologies	Deutschland
SPSS Statistics (Version 25)	IBM	USA
Microsoft Office (Version 16.16.10)	Microsoft Corp.	USA
Endnote (Version X8)	Clarivate	USA

2.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv wurde aus vier verschiedenen europäischen “European Neuroendocrine Tumor Society” (ENETS) -Exzellenzzentren akquiriert. Neben drei deutschen Kliniken (Universitätsklinikum Marburg, Zentralklinik Bad Berka GmbH und Charité-Universitätsmedizin Berlin) wurden auch Patienten des Oslo University Hospital, Norwegen eingeschlossen.

Es wurden nur Patienten inkludiert, bei denen eine gut differenzierte pankreatische neuroendokrine Neoplasie, entsprechend G1 oder G2 gemäß WHO-Klassifikation von 2017, vorlag und Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Tumorproben des Primärtumors oder einer Metastase vorhanden waren. Insgesamt wurden primär 115 Patienten in die Studie eingeschlossen.

Die Erhebung der Patientendaten und des Krankheitsverlaufs erfolgte retrospektiv anhand von Arztbriefen. Es wurden die folgenden Daten erhoben: Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, das Tumorstadium gemäß der TNM-Klassifikation (**Tabelle 2**), der Ki-67-Index, das Grading (**Tabelle 3**), die Lokalisation und Anzahl der Metastasen, die erfolgten Therapien und das Gesamtüberleben. In einigen Fällen war der Ki-67-Proliferationsindex nicht vorbeschrieben, so dass in diesen Fällen eine immunhistochemische Evaluation erfolgte. Sofern retrospektiv beurteilbar, wurde auch das Therapieansprechen nach RECIST 1.1. erhoben (Eisenhauer et al., 2009). Durch Auskünfte des Landeseinwohnermeldeamtes und des Tumorregisters wurde das Gesamtüberleben ergänzt.

Für die laboranalytischen Untersuchungen wurde nach Möglichkeit Gewebematerial des Primärtumors verwendet. Sofern keine oder eine nicht ausreichende Gewebemenge des Primärtumors zur Verfügung stand, erfolgten die laborchemischen Experimente anhand von Tumormaterial einer Metastase.

Die Erhebung der Daten und Analysen wurden von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin genehmigt (Ethik-Antragsnummer: EA1/194/16).

2.3 Färbeverfahren/ Immunhistochemie

Aus dem FFPE-Tumormaterial wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 2, 5 und 10µm angefertigt und auf einen Objektträger aufgetragen. Nachfolgend wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung an den 5µm dicken Schnitten durchgeführt.

Mikroskopisch wurden die Größe des Tumorareals und der Prozentsatz der Tumorzellen in dem jeweiligen Bereich evaluiert. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen der Tumorzellgehalt mindestens 50 % betrug.

2.3.1 Immunfärbung nach der APAAP-Methode zur Bestimmung des Ki-67-Index

Bei fehlenden oder unvollständig erhobenen histopathologischen Befunden bezüglich des Gradings, erfolgte eine Re-Evaluation der Ki-67-Expression mit Hilfe des alkalischen-Phosphatase-anti-alkalischen-Phosphatase-Komplex-(APAAP) -Kit von Dako® wie unter anderem von der Arbeitsgruppe vorbeschrieben (Grabowski et al., 2001, Grabowski et al., 2005, Treese et al., 2016).

Bei dieser Methode bindet ein Primärantikörper (hier: MIB-1-Antikörper von Dako®) an das entsprechende Epitop. Nach Ankopplung eines Brückenantikörpers bindet ein APAAP-Immunkomplex, bestehend aus einem Antikörper (antialkalische Phosphatase) mit dem Enzym alkalische Phosphatase an diesen Sekundärantikörper. Anschließend erfolgt die Hinzugabe des Fast-red Chromogens mit nachfolgender enzymatischer Reaktion und entsprechender Färbung. Die Expression von nukleärem Ki-67 wurde in zehn Hauptgesichtsfeldern evaluiert und als Prozentzahl an positiv gefärbten Zellen angegeben. Dies war nur bei fünf Patienten notwendig.

2.3.2 Immunfärbung nach der Avidin-Biotin-Methode zur Bestimmung der MGMT-Expression

Die immunhistochemische Expressionsanalyse von MGMT erfolgte mittels der Avidin-Biotin (ABC)-Methode. Die Methode stützt sich auf die Fähigkeit von Avidin, ein Eiweißglykoprotein, Biotin physikalisch zu binden. Avidin hat insgesamt vier verschiedene Bindungsstellen für Biotin. Nach Bindung eines primären Antikörpers an das Antigen MGMT, wird ein zweiter biotinylierter Antikörper hinzugegeben, welcher sich an den Primärantikörper anlagert. Ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers und damit an das aus zwei Antikörpern und dem Antigen bestehende Präzipitat. Nach Hinzugabe eines Substrats,

beispielsweise 3'3-Diaminobenzidin, wird durch die Peroxidase eine bräunliche Färbung hervorgerufen.

Hierfür wurden die angefertigten Gewebsschnitte zunächst in einem Inkubator bei 42°C getrocknet und anschließend in einem Xylolbad entparaffiniert. Nach weiteren Waschschrinen in einer absteigenden Ethanolreihe wurden die Schnitte in Methanol und in einprozentiger Wasserstoffperoxidase bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Ziel dieses Zwischenschritts ist eine Blockade der endogenen Peroxidase. Nach Rehydratisierung in bidestilliertem Wasser wurden die Schnitte 30 Minuten lang in 10 mM Natrium-Citratpuffer (pH 6,0) bei 180 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden die Schnitte daraufhin in Phosphat-gepufferte Salzlösung (englisch: „*Phosphate buffered saline*“ (PBS)) mit 5 % fettfreier Trockenmilch und 2 % Kaninchenserum für 30 Minuten bei Raumtemperatur gegeben. Anschließend wurde mit dem Primärantikörper bei 4°C über mehrere Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die überschüssigen Antikörper durch mehrfache Waschungen mit PBS entfernt. Es erfolgte die Hinzugabe des Sekundärantikörpers, ein Kaninchen-anti-Maus-biotinylierter-IgG-Antikörper, mit anschließender Inkubation für 30 Minuten. Nach erneutem Entfernen der überschüssigen Sekundärantikörper mittels PBS-Waschgängen wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex aus dem Kit hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit Hilfe von Triton X100 (0,1 %) -enthaltendem PBS erneut ungebundene Antikörper entfernt. Als Chromogen wurden drei Tropfen der 3'3-Diaminobenzidin-Substratlösung hinzugefügt. Die Färbungsreaktion wurde durch Abwaschen mit bidestilliertem Wasser nach wenigen Minuten beendet. Im Anschluss wurde mit einer Hämatoxylinlösung gegengefärbt. Abschließend erfolgte eine erneute Entwässerung und Fixierung durch eine Alkoholreihe und Xylol mit nachfolgender Versiegelung. Diese Schritte erfolgten auf dem Färbeautomaten (Benchmark XT Autostainer).

Der nukleäre Proteinnachweis von MGMT wurde in Abhängigkeit von der Anfärbbarkeit der Tumorzellen im Verhältnis zu 100 Tumorzellen in 4 Kategorien eingeteilt (**Tabelle 14**).

Tabelle 14. Kategoriale Einteilung der Tumorproben in Abhängigkeit von der prozentualen Expression von MGMT.

Tumorzellen mit nukleärer MGMT-Expression im Verhältnis zu 100 Tumorzellen (%)	Kategorie
0	0
0-10	1
10-30	2
>30	3

2.4 Methoden für die Analyse des mTOR-Signalwegs

Am mTOR-Signalweg sind diverse Proteine beteiligt. Im Rahmen dieser Studie wurde die mRNA-Expression einiger für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene untersucht. Nach RNA-Extraktion und Quantifizierung des gesamten RNA-Gehalts erfolgte eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (englisch: „*Real-time polymerase chain reaction*“ (RT-PCR)) mit Quantifizierung der mRNA-Expression der einzelnen Zielgene.

2.4.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden 10µm dicke Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte verwendet. Primär erfolgte eine Identifikation des tumorreichen Areals anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen. Es wurde der Bereich markiert, in welchem sich mindestens 50 % Tumorzellen befanden, um den Anteil an Nekrosen oder Normalgewebe zu minimieren. Nach Abgleich mit dem zu deparaffinierenden Gewebeschnitt wurde das überschüssige Material mit Hilfe eines Skalpell entfernt, so dass ein möglichst hoher Tumorzellgehalt erreicht wurde. Nach der Makrodissektion eines jeden Gewebeschnittes wurde das Skalpell mit Isopropanol sterilisiert.

Nach erfolgter Makrodissektion wurden die Gewebeproben zum Entparaffinieren für 15 Minuten in ein Xylobad gegeben. Hiernach wurde eine jeweils 10-minütige Behandlung in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %) mit anschließendem 10-minütigem Bad in destilliertem Wasser durchgeführt. Das Gewebe wurde daraufhin vorsichtig von dem Objektträger entfernt. Die ersten Schritte der DNA-Extraktion erfolgten analog (siehe **Kapitel 2.5.1**). Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des Stratifyer XTRAKT FFPE Kits (STRATIFYER Molecular Pathology GmbH) entsprechend der Anleitung extrahiert.

Primär wurden die Zellen lysiert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion mit Hilfe von paramagnetischen Kügelchen, welche sich in einem Puffersystem an die RNA-Stränge banden. Vor Hinzugabe der paramagnetischen Kügelchen erfolgte ein Proteinabbau durch Proteinase K. In mehreren Schritten erfolgte mit Hilfe von 3 verschiedenen Waschpuffern die Aufreinigung der RNA. Die gebundene RNA wurde mit Hilfe eines magnetischen Reagenzgestells in den Probenbehältern gehalten.

Nach Hinzugabe von 100µl des Lösungspuffers erfolgte eine Aufteilung des Eluats zu zwei gleichen Teilen. Die eine Hälfte wurde mittels DNase I (5µl 10x DNase Puffer und 1µl DNase I) weitergehend purifiziert. Die so erhaltenen Proben (50µl Eluat mit reiner RNA, 50µl Eluat mit RNA und DNA) wurden bis zur weitergehenden Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Quantifizierung des gesamten RNA-Gehalts

Nach der RNA-Extraktion wurde der RNA-Gehalt jeder Probe mittels Qubit® Fluorometer unter Verwendung des Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen) quantifiziert. Das Ziel war die Überprüfung einer erfolgreichen RNA-Extraktion, Hierfür wurde ein Mikroliter jeder Probe verwendet. Falls sich hierdurch keine Quantifizierung erzielen ließ, wurde der Schritt mit zwei Mikrolitern der Probe wiederholt.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Quant-iT Lösung. Es erfolgte die Durchführung analog des Protokolls des Quant-iT RNA Assay Kit, 5-100ng (250pg/µl-100ng/µl) (Invitrogen) (**Abbildung 5**). Vor der Quantifizierung des RNA-Gehalts einer Probenreihe wurde das Gerät mit den mitgelieferten Standards kalibriert.

Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung des RNA-Gehalts und der Mittelwert wurde berechnet. Bei niedriger RNA-Konzentration wurde eine erneute Extraktion mit einer erhöhten Probenmenge vorgenommen.

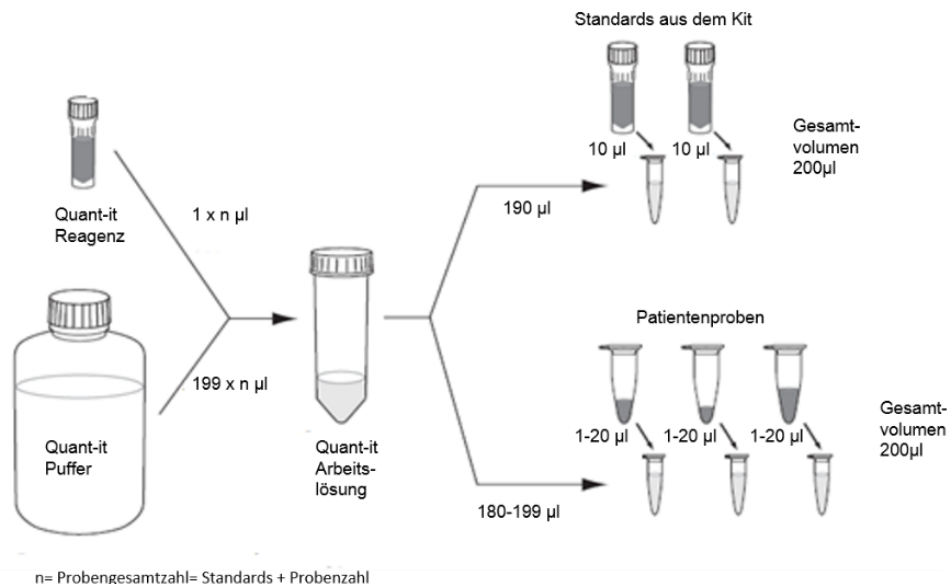


Abbildung 5. Vorbereitung der Proben zur Quantifizierung des DNA und RNA-Gehaltes mittels Qubit®-Fluorometer. Zunächst wurde die Quant-it Arbeitslösung in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Probengesamtzahl hergestellt. Daraufhin erfolgte eine Kalibrierung des Gerätes durch die Standards aus dem Kit. Hiernach wurden die Patientenproben gemessen. Zumeist wurde ein Mikroliter jeder Probe hierfür verwendet. Modifiziert nach Invitrogen MAN0002474.

2.4.3 Quantifizierung der mRNA-Expression von elf Genen des mTOR-Signalwegs durch die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die mRNA-Expression elf verschiedener am mTOR-Signalweg beteiligter Gene wurde mittels TaqMan-basierter Ein-Schritt quantitativer RT-PCR analysiert. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Firma STRATIFYER Molecular Pathology GmbH (Deutschland)

durchgeführt. Die analysierten Gene mit den jeweiligen Assaynummern sind in **Tabelle 12** aufgeführt. Die Reagenzien stammten aus dem SuperScript III Platinum-Kit (Invitrogen), ein einstufiges quantitatives RT-PCR-Kit. Die Analysen erfolgten auf dem "Mx3005p Real-Time PCR System" (Agilent Technologies) mit der Software "MxPro QPCR Software Version 4.10." (Agilent Technologies). Bei allen Proben erfolgte eine Doppelbestimmung der mRNA-Expression der jeweiligen Gene in der quantitativen RT-PCR. Es wurden jeweils 0,5µM je Primer und 0,25µM für die Sonden verwendet. Primär erfolgte dabei eine halbstündige Inkubation bei 50°C zur Synthese der komplementären DNA. Anschließend erfolgte eine Erwärmung auf 95°C für 2 Minuten zur Denaturierung der Proben. Daraufhin wurden 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95°C und 45 Sekunden bei 60°C durchlaufen. Worst et al. (2018) beschrieben die entsprechenden quantitativen PCR-Analysen bereits in einer Veröffentlichung.

Die relative Genexpression wurde mit Hilfe der $40 - \Delta$ Zyklusschwellenwert (Ct-Wert) Methode evaluiert (Kaemmerer et al., 2015). Calmodulin 2 (*CALM2*) als Referenzgen diente zur endogenen Kontrolle und Normalisierung. Hierdurch konnten mögliche Quantifizierungsfehler bezüglich der verwendeten RNA-Gesamtmenge und Effizienzunterschiede bei verschiedenen Versuchsdurchläufen der quantitativen RT-PCR korrigiert werden.

Es gilt also:

$$40 - \Delta \text{ Zyklusschwellenwert} = 40 - ((\text{Mittlerer Ct-Wert des Zielgens}) - (\text{Mittlerer Ct-Wert von CALM2}))$$

Für die statistische Auswertung wurden nur Proben verwendet, bei denen der mittlere Ct-Wert des Referenzgens unter 32 lag. Auf Grund der verwendeten Methodik ergibt sich, dass der mRNA-Gehalt umso höher ist, je größer der $40 - \Delta$ Ct-Wert ist.

Sofern sich nach 40 Replikationszyklen in der quantitativen RT-PCR kein Nachweis einer mRNA-Expression detektieren ließ, wurde für diese Proben ein $40 - \Delta$ Ct-Wert von 24 festgesetzt. Die Festsetzung dieses Wertes erfolgte erst nach Abschluss der Analyse aller Proben, so dass dieser Wert sicher unterhalb des niedrigsten gemessenen $40 - \Delta$ Ct-Wertes lag. Auf Grund dieser Wertfestlegung erfolgten die statistischen Analysen entsprechend nur mit nicht-parametrischen Tests.

Zusätzlich erfolgte die Analyse von histopathologisch unauffälligem Pankreasparenchym von acht verschiedenen Patienten. Die Gewebeproben stammten aus einem Patientenkollektiv der Charité. Nach histopathologischer Einschätzung zeigte sich bei den hierbei entnommenen Proben keine pathologischen Auffälligkeiten. Die PCR-Analysedaten dieser acht Patienten dienten als Referenzkontrolle.

2.5 MGMT-Promotormethylierungsanalysen mittels Pyrosequenzierung

Um die Methylierung der Promotorregion des Genomabschnitts von *MGMT* zu untersuchen, musste zunächst die DNA aus dem Tumormaterial extrahiert werden. Nach Quantifizierung des DNA-Gehalts wurde nach der Bisulfitbehandlung eine Pyrosequenzierung durchgeführt, durch die der Anteil an methylierten Allelen bestimmt wurde.

2.5.1 DNA-Extraktion

Die Makrodissektion und Entparaffinierung erfolgte analog **Kapitel 2.4.1**.

Nachfolgend wurde die DNA gemäß Protokoll mit Hilfe des QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) extrahiert. Die entsprechenden Puffersysteme wurden laut Herstellerangaben vorbereitet. Zur Optimierung der Entparaffinierung erfolgte gemäß Protokoll die erneute Hinzugabe von Xylol. Nach dem Inkubieren und Entfernen des überschüssigen Bestandes wurde Ethanol zur Reduktion des Xylolüberstandes in das Probengefäß hinzugegeben. Das überschüssige Ethanol wurde daraufhin ebenfalls entfernt. Es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur zur Evaporation des verbliebenen überschüssigen Alkohols.

Im Anschluss wurden die Proben in einem mitgelieferten Puffer gelöst und Proteinase K hinzugegeben. Daraufhin wurde die Probe bei zunächst 56°C und anschließend bei 90°C für jeweils eine Stunde inkubiert. Hierdurch sollten die Modifikationen der Nukleinsäuren durch Formaldehyd umgekehrt werden. Da nur ein Heizblock zur Verfügung stand, wurde nach der initialen Inkubation bei 56°C die Probe bei Raumtemperatur gelagert bis der Heizblock 90°C erreicht hatte.

Nach Zentrifugation und Abkühlen der Proben wurde RNase A hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Proben nacheinander mit drei verschiedenen mitgelieferten Puffern, einmal in Kombination mit 100-prozentigem Ethanol, gewaschen. Hierbei wurden die Eluate durch Zentrifugieren durch QIAamp MinElute-Säulen geführt. Nach Hinzugabe des letzten Waschpuffers wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 20.000xg) für drei Minuten zentrifugiert. Ziel dieses Schrittes war das in den Waschpuffern gelöste Ethanol möglichst komplett zu entfernen. Anschließend wurde die DNA in 50µl eluiert. Nach Einhalten einer Inkubationszeit von fünf Minuten erfolgte die abschließende Zentrifugation und Lagerung bei -20°C.

2.5.2 Quantifizierung des gesamten DNA-Gehalts

Die Quantifizierung der DNA erfolgte analog der RNA-Quantifizierung (**Kapitel 2.4.2**) unter Verwendung des Quant-iT dsDNA HS Assay Kit, *0.2-100ng* (Invitrogen) entsprechend der Arbeitsanleitung (Manual-Nr. MAN0002474). Es erfolgte eine Doppelbestimmung des DNA-Gehalts und der Mittelwert wurde gebildet. Falls der errechnete DNA-Gehalt weniger als 400ng betrug, wurde weitere DNA der Probe extrahiert, um eine ausreichende DNA-Menge zu gewährleisten.

2.5.3 Bisulfitbehandlung der DNA

Die Erhebung des Methylierungsstatus der Promotor-Region des *MGMT*-Gens erfolgte mittels quantitativer methylierungsspezifischer Pyrosequenzierung. Es wurden insgesamt fünf verschiedene CpG-Inseln betrachtet.

Zur Quantifizierung und Identifikation der Methylierung erfolgte zunächst eine Modifikation der DNA durch eine Bisulfitbehandlung mit Hilfe des EZ DNA Methylation Kits (Zymo Research). Nach Denaturierung der DNA in Einzelstränge wird durch die Bisulfitbehandlung die unmethylierte Nukleinbase Cytosin in drei Schritten zu Uracil umgewandelt (**Abbildung 6**) (Frommer et al., 1992, Patterson et al., 2011). Methyliertes Cytosin ist von dieser Reaktion unbeeinträchtigt, so dass sich für die spätere PCR-Amplifikation eine unterschiedliche Basenpaarung ergibt. Die Durchführung erfolgte analog der Herstellerangaben. Es wurden 500ng DNA jeder Probe konvertiert.

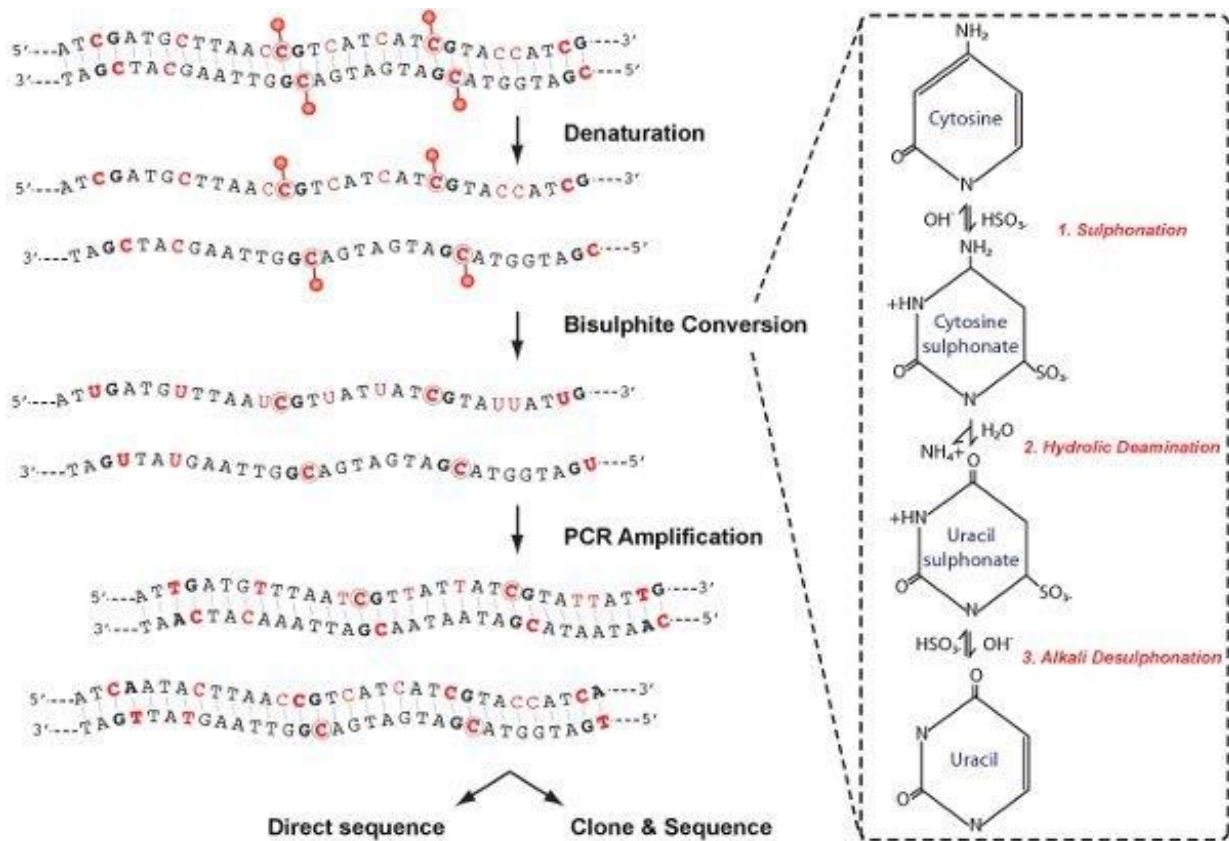


Abbildung 6. Schematische Darstellung der chemischen Prozesse zur Analyse der DNA-Methylierung. Die Analyse der DNA-Methylierung besteht aus 4 Stufen: Denaturierung, Bisulfit-Konvertierung, PCR-Amplifikation und -Analyse. Auf der rechten Seite sind die einzelnen Schritte der Bisulfitkonversion dargestellt. (1) Sulfonierung. (2) Hydrolytische Desaminierung. (3) Alkalische Desulfonierung. Schlussendlich erfolgt die Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil. Quelle Patterson et al., 2011.

2.5.4 PCR-Amplifikation

Im Rahmen der PCR-Amplifikation wird das zuvor gebildete Uracil als Thymin amplifiziert, wohingegen das methylierte Cytosin unverändert bleibt. Hierdurch ist eine Unterscheidung zwischen dem initial methylierten und unmethyliertem Cytosin möglich (Frommer et al., 1992, Patterson et al., 2011).

Nach erfolgreicher Bisulfitkonversion erfolgte eine PCR-Amplifikation unter Einbeziehung von fünf verschiedenen CpG-Inseln im Bereich der Promotorregion von *MGMT* (Hg19/ GRCh37 Koordinaten: Chromosom 10:131,265,507 - 534, CGCTTTGCGTCCCGACGCCCGCAGGTCC) (Schulze Heuling et al., 2017). Die verwendeten Primer stammten von Qiagen aus dem PyroMark Q24 CpG *MGMT*-Kit. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe des Pyro Mark PCR Kit (Qiagen) auf einem automatisierten Pyro-Mark Q24-System (Qiagen). Die erzeugten Daten wurden mittels PyroMark Q24 Software 2.0 (Qiagen) analysiert. Es wurden jeweils 0,5µl des Vorwärts- und Rückwärts-Primers verwendet (**Tabelle 15**). Der Rückwärts-Primer ist hierbei biotinyliert, so dass

der korrekte DNA-Abschnitt zur Sequenzierung nachfolgend isoliert werden kann. Nach Aktivierung der *“HotStarTaq DNA Polymerase”* bei 95°C für 15 Minuten erfolgten insgesamt 45 Amplifikationszyklen auf dem Thermozykler (Eppendorf) (**Tabelle 16**).

Tabelle 15. Zusammensetzung der verschiedenen Reagenzien zur PCR-Amplifikation.

Reagenzien/ Komponenten	Volumen
PyroMark Mastermix	12,5µl
Coral Load	2,5µl
Vorwärts-Primer	0,5µl
Rückwärts-Primer	0,5µl
Destilliertes Wasser (RNase und DNase frei)	6,0µl
Bisulfit-konvertierte DNA	3,0µl
Gesamtmenge	25

Tabelle 16. Protokoll der PCR-Amplifikation. Insgesamt wurden 45 PCR-Amplifikationszyklen, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation durchgeführt, bevor die finale Polymerisation eingeleitet wurde.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale PCR-Aktivierung	95°C	15 Minuten
Denaturierung	94°C	40 Sekunden
Hybridisierung	58,7°C	40 Sekunden
Polymerisation	72,0°C	40 Sekunden
Finale Polymerisation	72°C	10 Minuten

2.5.5 Pyrosequenzierung

Nach Abschluss der finalen Polymerisation und Abkühlen wurden die Proben auf dem PyroMark Q24 System (Qiagen) pyrosequenziert. Hierbei wurde nach Anleitung nacheinander in jede Vertiefung der PCR-Platte der DNA-Immobilisierungsansatz und die jeweilige Patientenprobe hinzugefügt (**Tabelle 17**). Das Streptavidin ist auf der Sepharosematrix immobilisiert. Durch die Wechselwirkung von Streptavidin und Biotin wird die DNA immobilisiert, was für die nachfolgende Pyrosequenzierung entscheidend ist. Die Vakuum Arbeitsstation (Qiagen), Puffer und Primer wurden entsprechend der Anleitung vorbereitet und die präparierten Proben nach Anleitung in der Arbeitsstation hinzugefügt und bearbeitet. Der fertige Sequenzierungsansatz (**Tabelle 17**) wurde für fünf Minuten bei 85°C denaturiert. Während der Sequenzierungsansatz über 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt wurde, erfolgte die Programmierung der Plattenbelegung, die Beladung der Kartusche nach dem vom Hersteller vorgegebenen Schema und die Pyrosequenzierung mit dem vorgegebenen Setup. Am Ende erfolgte die Auswertung der Ergebnisse mit der PyroMark Q25 Software (Version 2.0; Qiagen).

Tabelle 17. Verwendete Reagenzien für die Pyrosequenzierung.

Ansatz	Reagenzien	Menge in µl
Sequenzierungsansatz	Sequenzierungsprimer	1,6
	Hybridisierungspuffer	38,4
DNA-Immobilisierungsansatz	“Streptavidin Sepharose Hochleistung”	5,0
	Bindungspuffer	40,0
	Destilliertes Wasser	10,0
Patientenprobe (PCR-Produkt)		25,0
Gesamt		120

Zur Dichotomisierung bezüglich des Methylierungsstatus wurde der Mittelwert der prozentual methylierten Allele der fünf Loki im Bereich der Promotorregion gebildet.

In verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Referenzwerte zur Unterscheidung zwischen methylierten und nicht methylierten Promotorregionen verwendet (siehe **Kapitel 1.8.1**). Auf Grund dessen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Analysen anhand von verschiedenen Trennwerten (im Mittel 7 %; 8 %, 10 %; 15 % oder 20 % methylierte Allele im Bereich der Promotorregion) (Quillien et al., 2012, Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Brigliadori et al., 2016, Girot et al., 2017, Raj et al., 2017, Yuan et al., 2017, Campana et al., 2018, Radke et al., 2019).

2.6 Statistische Auswertung und Software

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word (Version 16.16.10; Microsoft Corporation) und Microsoft Office Excel (Version 16.16.10; Microsoft Corporation) erstellt. Das Literaturverzeichnis wurde mit Hilfe des Programms Endnote (Version X8; Clarivate) und die statistische Auswertung und einige Grafiken mit SPSS Statistics (Version 25; IBM) angefertigt.

Die Evaluation von Häufigkeiten erfolgte durch deskriptive Verfahren. Damit konnten Patientencharakteristika wie Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, das Tumorstadium, sowie die Lokalisation und Lokalisationsdiversität der Metastasen oder die Therapien beschrieben werden.

Es erfolgte eine Überprüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Bei fehlender Normalverteilung wurden nicht-parametrische Tests, wie der Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Für Korrelationsanalysen wurden zudem der Korrelationskoeffizient nach Spearman und der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Zur Identifizierung möglicher linearer Zusammenhänge erfolgte ergänzend in einigen Fällen eine lineare Regressionsanalyse.

Anhand der Überlebenszeiten erfolgte eine Beurteilung der Überlebensraten mittels der Kaplan-Meier-Methode. Das Signifikanzniveau wurde durch den Chi-Quadrat-Test berechnet. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ für alle statistischen Tests angesehen.

3. Ergebnisse

Initial wurden 115 Patienten mit G1- oder G2-pNET eingeschlossen. 25 Patienten wurden nach erneuter Sichtung der klinischen Charakteristika oder wegen einer nicht ausreichenden Menge oder Qualität des FFPE-Tumormaterials ausgeschlossen.

In 15 Fällen konnte trotz mehrerer Versuche keine ausreichende Menge an RNA gewonnen werden oder die Qualität der RNA war für die quantitative RT-PCR nicht ausreichend. Letztendlich war eine mRNA-Expressionsanalyse des mTOR-Signalwegs an dem Tumormaterial von insgesamt 75 Patienten möglich (**Abbildung 7**).

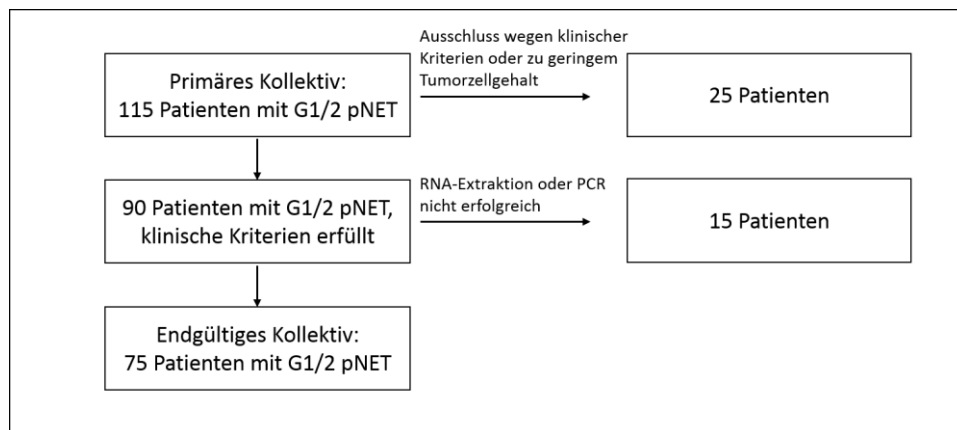


Abbildung 7. Patientenkollektiv zur Evaluation des mTOR-Signalwegs.

Der MGMT-Status konnte in 76 Fällen via Methylierungsanalyse erhoben werden (**Abbildung 8**). Bei 57 dieser 76 Patienten konnte zudem die MGMT-Expression analysiert werden. Bei 70 Patienten konnte sowohl eine adäquate RNA-Extraktion mit nachfolgender quantitativer RT-PCR als auch eine DNA-Extraktion mit nachfolgender Pyrosequenzierung erfolgen.

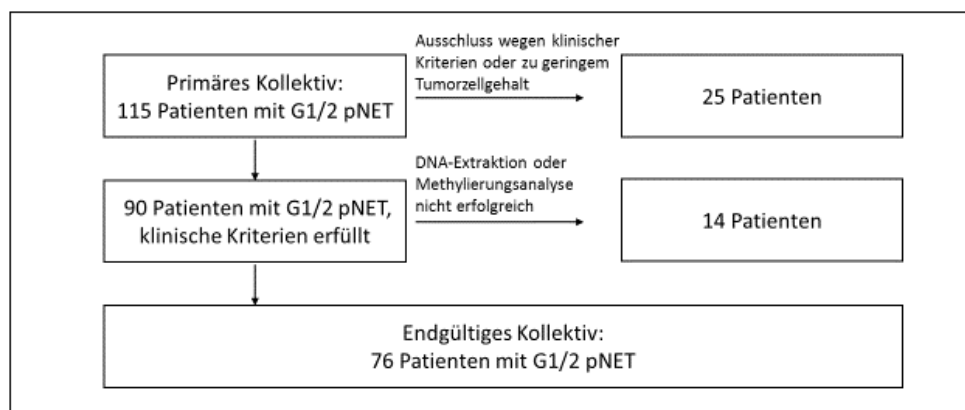


Abbildung 8. Patientenkollektiv zur Evaluation des MGMT-Status.

3.1 Klinische Charakteristika der „Patientenkollektive mTOR und MGMT“

Insgesamt wurde die mRNA-Expression von elf verschiedenen für den mTOR-Signalweg kodierenden Genen bei 75 pNEN und in acht Fällen an pankreatischem Normalgewebe analysiert. Zudem konnte bei 76 Patienten eine DNA-Extraktion mit nachfolgender Pyrosequenzierung erfolgreich durchgeführt werden.

Die erhobenen klinischen Daten der Patienten der beiden Kollektive sind in **Tabelle 18** aufgeführt. Die Geschlechterverteilung war jeweils etwa 3:2 (männlich: weiblich). Das mediane Patientenalter bei Erkrankungsbeginn betrug im „Patientenkollektiv mTOR“ 54 Jahre (Mittelwert $52,44 \pm 14,59$ Jahre; Reichweite 18 - 80 Jahre) und 54,5 Jahre (Mittelwert $52,78 \pm 13,9$ Jahre; Reichweite 18 - 80 Jahre) im „Patientenkollektiv MGMT“. Das mediane Follow-up belief sich auf 71 respektive 77 Monate (Reichweite 1 - 365 Monate). Insgesamt starben 22 Patienten (29,3 %) des „Patientenkollektivs mTOR“ und 23 Patienten (30,2 %) des „Patientenkollektivs MGMT“ auf Grund des Tumorleidens oder dessen Komplikationen während des Beobachtungszeitraumes. In einem weiteren Fall des „Patientenkollektivs MGMT“ war die Todesursache unklar. Der Todeszeitpunkt lag zwischen einem und 123 Monaten nach Erstdiagnose.

In über 85 % der Fälle wurde Tumormaterial des Primarius analysiert. Bei zehn beziehungsweise elf Patienten war keine ausreichende Menge des pankreatischen Tumormaterials verfügbar, so dass hier Tumormaterial von Metastasen analysiert wurde. Der Primarius war zumeist im Pankreasschwanz (circa 40 %) oder Pankreaskopfbereich (circa 32 %) lokalisiert. Der Großteil aller Patienten war bereits zu Erkrankungsbeginn in einem fortgeschrittenem Tumorstadium (**Abbildung 9**). Das Verhältnis zwischen G1- und G2-pNEN betrug in beiden Patientenkollektiven etwa 1:2.

Tabelle 18. Klinische Daten der „Patientenkollektive mTOR und MGMT“.

Kriterium	Patientenzahl „Kollektiv mTOR“ (n = 75)	Prozentualer Anteil (%) „Kollektiv mTOR“	Patientenzahl „Kollektiv MGMT“ (n = 76)	Prozentualer Anteil (%) „Kollektiv MGMT“
Geschlecht				
- männlich	46	61,3	45	59,2
- weiblich	29	38,7	31	40,8
Histopathologische Charakteristika				
- G1	24	32,0	24	31,6
- G2	51	68,0	52	68,4
- Hämangioinvasion	28	37,3	28	36,8
- Lymphangioinvasion	12	16,0	12	15,8
Analysiertes Gewebe				
- Pankreas	65	86,7	65	85,5
- Leber	7	9,3	7	9,2
- Lymphknoten	2	2,7	3	3,9
- Weichteilmetastase	1	1,3	1	1,3
Initiales Tumorstadium nach UICC				
- UICC I	7	9,3	7	9,2
- UICC II	19	25,3	20	26,3
- UICC III	13	17,3	12	15,8
- UICC IV	36	48,0	37	48,7
Funktionalität				
- Funktionell aktiv	21	28,0	22	28,9
- Funktionell inaktiv	54	72,0	54	71,1

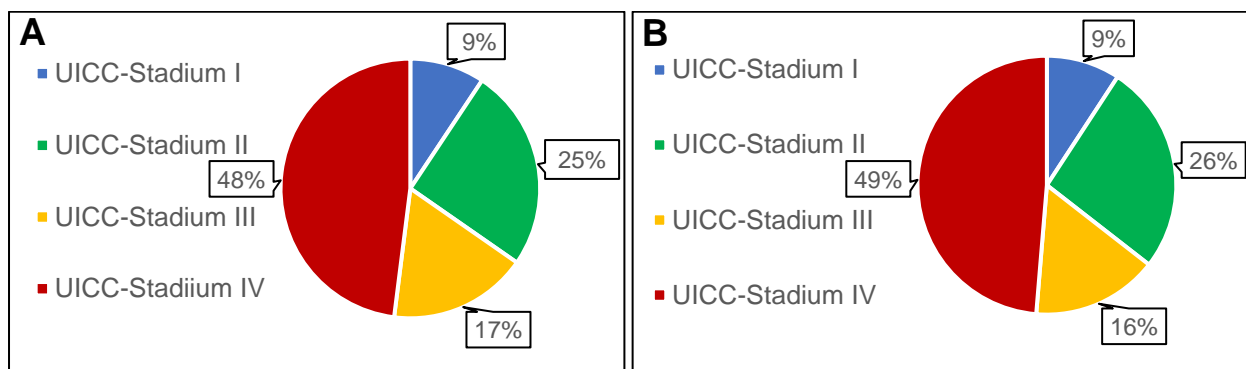


Abbildung 9. Tumorstadien nach UICC bei Erstdiagnose des „Patientenkollektivs mTOR“ (A) und des „Patientenkollektivs MGMT“ (B).

Insgesamt waren 21 respektive 22 der pNEN funktionell aktiv. Hierbei zeigten sich die in **Abbildung 10** zusammengefassten verschiedenen Syndrome. In einigen Fällen zeigten sich unspezifische Symptome (zum Beispiel Flush), welche am ehesten einer vermehrten Serotoninproduktion zuzuordnen wären.

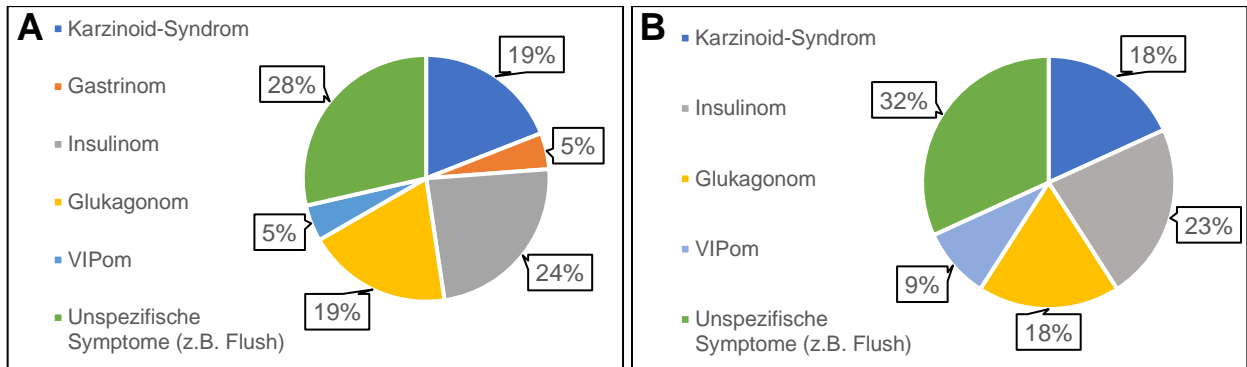


Abbildung 10. Verschiedene Syndrome der funktionell aktiven G1/2 pNEN des „Patientenkollektivs mTOR“ (A) und des „Patientenkollektivs MGMT“ (B).

Die durchgeführten antineoplastischen Therapien sind für die beiden Kollektive zusammenfassend in **Tabelle 19** aufgeführt. Bei 17 von 75 Patienten erfolgte eine temporäre Medikation mit EVE. Eine Therapie mit TEM erhielten nur 9 der 76 Patienten des „Patientenkollektivs MGMT“.

Tabelle 19. Verschiedene medikamentöse und interventionelle Therapien der „Patientenkollektive mTOR und MGMT“. 17 Patienten des „Patientenkollektivs mTOR“ erhielten eine Therapie mit Everolimus, wohingegen nur 9 Patienten des „Patientenkollektivs MGMT“ eine Medikation mit Temozolomid bekamen.

Therapie	Patientenzahl „Kollektiv mTOR“ (n = 75)	Prozentualer Anteil (%) „Kollektiv mTOR“	Patientenzahl „Kollektiv MGMT“ (n = 76)	Prozentualer Anteil (%) „Kollektiv MGMT“
Primär pankreatische Operation, gegebenenfalls mit Metastasenresektion	59	78,7	59	77,6
Sekundäre pankreatische Resektion (zum Beispiel nach primärer Chemotherapie), gegebenenfalls mit Metastasenresektion	17	22,7	19	25,0
Sekundäre Metastasenresektion	19	25,3	21	27,6
Chemotherapie (zum Beispiel STZ und 5-FU, FOLFOX etc.)	23	30,7	24	31,6
Everolimus	17	22,7	X	X
Temozolomid	X	X	9	11,8
Somatostatinanaloga	17	22,7	16	21,1
Interferontherapie	2	2,7	4	5,3
(Peptidvermittelte) Radiorezeptortherapie	25	33,3	24	31,6
Transarterielle Chemoembolisation	10	13,3	12	15,8
Radiatio	2	2,7	2	2,6
Andere radiologische oder nuklearmedizinische Therapie	5	6,7	6	7,9

Es zeigte sich jeweils eine signifikante Korrelation zwischen dem Ki-67-Index und dem Tumorstadium bei Erstdiagnose im Spearman-Rho-Test ($p = 0,001$ („Patientenkollektiv mTOR“); $p = 0,003$ („Patientenkollektiv MGMT“)) (**Abbildung 11**). Bei einem höheren Tumorstadium war auch der Proliferationsindex erhöht.

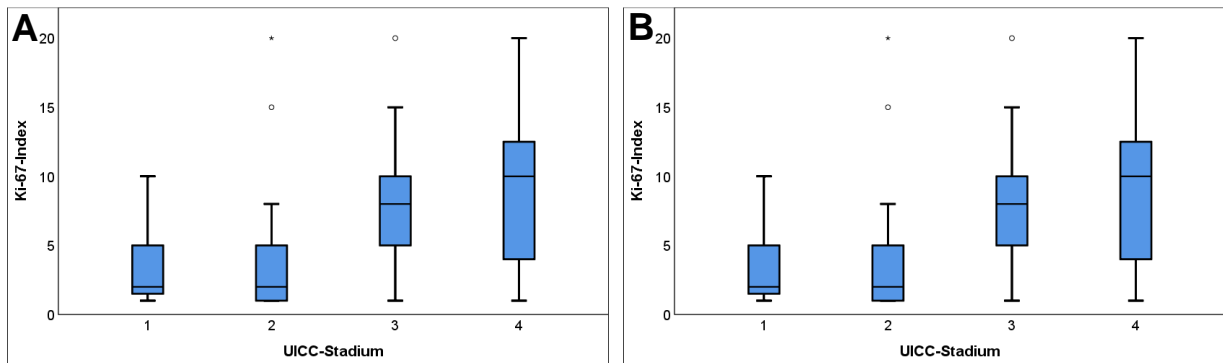


Abbildung 11. Korrelation zwischen dem UICC-Stadium und dem Ki-67-Index in dem „Patientenkollektiv mTOR“ (A) und dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B). Der Zusammenhang zwischen den beiden Parametern war statistisch signifikant ($p = 0,001$) (A) beziehungsweise ($p = 0,003$) (B).

Funktionell aktive oder inaktive Neoplasien zeigten keine signifikante Korrelation gemäß Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman zum Tumorstadium ($p = 0,126$ („Patientenkollektiv mTOR“); $p = 0,333$ („Patientenkollektiv MGMT“)) oder Grading ($p = 0,487$ („Patientenkollektiv mTOR“); $p = 0,270$ („Patientenkollektiv MGMT“)).

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und der Häm- ($p < 0,001$) bzw. Lymphangioinvasion ($p = 0,013$) im „Patientenkollektiv MGMT“. Bei höherem UICC-Stadium zeigte sich entsprechend eine vermehrte Lymph- oder Blutgefäßinvasion des Tumors. Bei dem „Patientenkollektiv mTOR“ bestätigte sich die signifikante Korrelation zwischen Tumorstadium und Hämangioinvasion ($p < 0,001$), für die Lymphangioinvasion und das Tumorstadium wurde das Signifikanzniveau knapp verfehlt ($p = 0,053$).

Als ein entscheidender prognostischer Faktor hat sich bei pNEN das UICC-Stadium etabliert. In beiden Patientenkollektiven zeigte sich die negative prognostische Bedeutung des Tumorstadiums, wobei eine statistische Signifikanz im Chi-Quadrat-Test bei Betrachtung aller Stadien jeweils verpasst wurde ($p = 0,166$ („Patientenkollektiv mTOR“); $p = 0,199$ („Patientenkollektiv MGMT“)) (**Abbildung 12**). Bei einem Vergleich zwischen einer initial geringeren (UICC-Stadium I und II) gegenüber einer fortgeschritteneren (UICC-Stadium III und IV) Tumorausbreitung zum Diagnosezeitpunkt zeigte sich ein signifikant schlechteres Überleben bei höhergradigem Tumorstadium ($p = 0,029$ („Patientenkollektiv mTOR“); $p = 0,038$ („Patientenkollektiv MGMT“)) (**Abbildung 13**). Bei denjenigen Patienten, welche zum Diagnosezeitpunkt ein UICC-Stadium I aufwiesen, trat während des Nachverfolgungszeitraums kein tumorassoziertes Versterben auf (**Abbildung 12**). Bei metastasiertem Tumorleiden zum Diagnosezeitpunkt zeigte sich eine schlechtere Prognose im Vergleich zu den Patienten ohne Fernmetastasen, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,164$ („Patientenkollektiv mTOR“); $p = 0,168$ („Patientenkollektiv MGMT“)).

Zudem zeigte sich, dass Patienten mit mäßig-differenzierten pNEN (G2) ein kürzeres Gesamtüberleben als Patienten mit gut differenzierten pNEN aufwiesen ($p = 0,056$ („Patientenkollektiv mTOR“); $p = 0,035$ („Patientenkollektiv MGMT“)) (**Abbildung 14**). Zusammenfassend ist daher von repräsentativen Patientenkollektiven auszugehen.

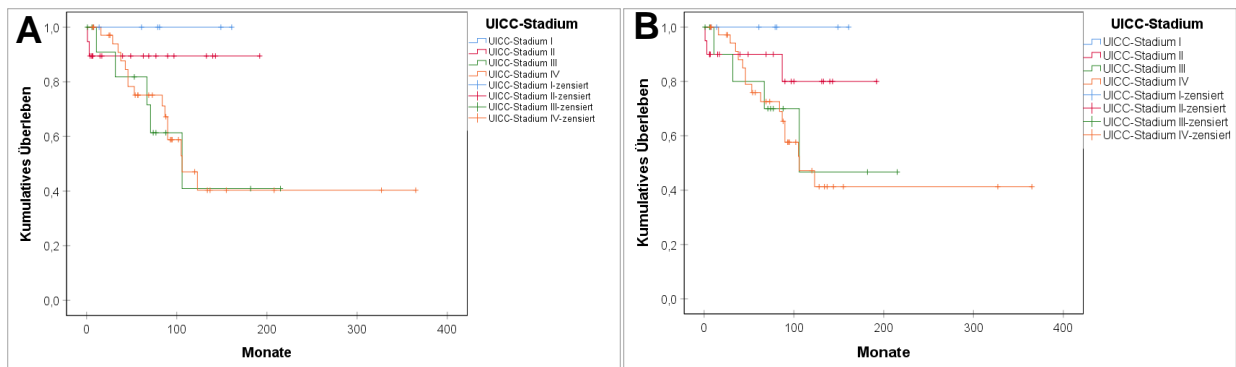


Abbildung 12. Gesamtüberleben in Abhängigkeit des UICC-Stadiums in dem „Patientenkollektiv mTOR“ (A) und dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B). In einem fortgeschrittenen Tumorstadium zeigte sich ein schlechteres Gesamtüberleben, auch wenn eine statistische Signifikanz verpasst wurde ($p = 0,166$ (A) bzw. $p = 0,199$ (B)).

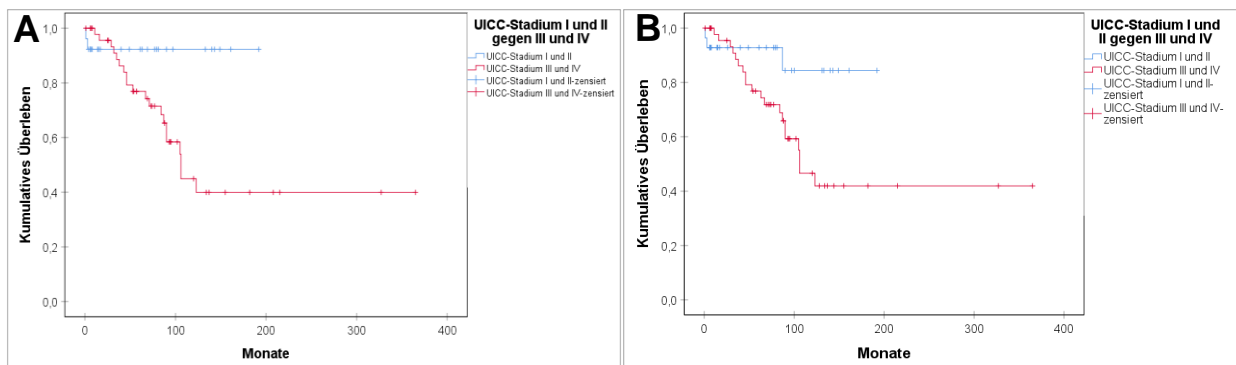


Abbildung 13. Gesamtüberleben in Abhängigkeit des UICC-Stadiums in dem „Patientenkollektiv mTOR“ (A) und dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B): Vergleich Stadium I und II gegen III und IV. Patienten, die bei Erstdiagnose ein UICC-Stadium I oder II hatten, lebten signifikant länger als die Patienten mit einem UICC-Stadium III oder IV ($p = 0,029$ (A) bzw. $p = 0,038$ (B)).

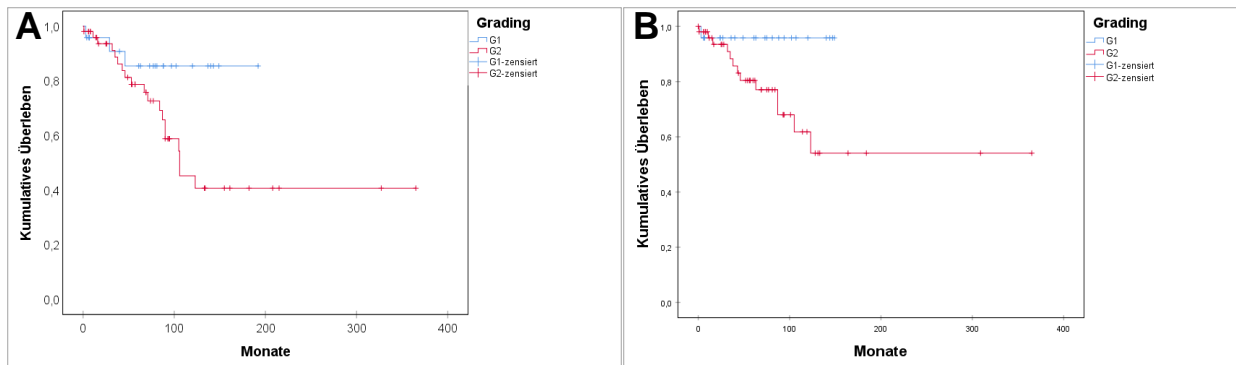


Abbildung 14. Gesamtüberleben nach histopathologischem Grading in dem „Patientenkollektiv mTOR“ (A) und dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B). Patienten mit einem G2-Tumor hatten ein schlechteres Gesamtüberleben, auch wenn sich ein statistisch signifikanter Unterschied nur in dem „Patientenkollektiv MGMT“ (B) zeigte ($p = 0,056$ (A) bzw. $p = 0,035$ (B)).

3.2 Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs in G1/2 pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Das mRNA-Expressionsmuster der für die mTOR-Signalkaskade kodierenden Gene wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert und im Folgenden in Korrelation zueinander und zu den klinischen Parametern gesetzt. Der geringste erhobene $40 - \Delta Ct$ -Wert betrug 26,41. Für die Gene, bei denen keine mRNA-Expression detektiert werden konnte, wurde ein fiktiver $40 - \Delta Ct$ -Wert von 24 festgesetzt. Auf Grund dessen wurden für die weitergehenden Analysen nur nicht-parametrische Tests verwendet. Insgesamt wurden die mRNA-Genexpression von elf Mitgliedern des mTOR-Signalwegs analysiert.

3.2.1 mRNA-Expressionsanalysen des mTOR-Signalwegs in pankreatischem Normalgewebe

Für die mRNA-Expressionsanalysen an pankreatischem Normalgewebe standen 8 Proben zur Verfügung. Es zeigte sich im Mittelwert eine erhöhte mRNA-Expression von *AKT-1* ($40 - \Delta Ct$ -Mittelwert: $38,13 \pm 0,41$) und *MTOR* ($40 - \Delta Ct$ -Mittelwert: $37,93 \pm 0,25$). Die geringste mRNA-Expression wies *IGF-1* auf ($40 - \Delta Ct$ -Mittelwert: $31,38 \pm 1,83$). Dies bedeutet, dass in pankreatischem Normalgewebe die mRNA-Expression von *AKT-1* über einhundert Mal höher war als diejenige von *IGF-1*.

Die mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene korrelierte zueinander teilweise signifikant (**Tabelle 20**). In einigen Fällen, zum Beispiel zwischen *IGF-1* und *IGFBP-3*, zeigte sich zwar im Rahmen der Spearman-Korrelationsanalysen ein hoher

Korrelationskoeffizient und ein signifikanter Zusammenhang, jedoch ohne relevanten linearen Bezug (lineare Regressionsanalyse: R^2 Linear = 0,372) (**Abbildung 15**).

Darüber hinaus zeigten sich weitere signifikante Korrelationen der mRNA-Expression derjenigen Gene, die für die verschiedenen Strukturkomponenten des mTORC1 und mTORC2 kodieren. Beispiele hierfür sind *MLST8* und *RICTOR* oder *RICTOR* und *RAPTOR*. Ein linearer Zusammenhang stellte sich jedoch zumeist nicht dar (**Tabelle 20** und **Abbildung 15**).

Tabelle 20. Intergenetische Korrelationen der mRNA-Genexpression von elf Mitgliedern des mTOR-Signalwegs in pankreatischem Normalgewebe. Signifikante Korrelationskoeffizienten sind in blau dargestellt.

Korrelationskoeffizienten nach Spearman											
	<i>IGF-1</i>	<i>IGFBP-3</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>AKT-1</i>	<i>MTOR</i>	<i>MLST8</i>	<i>DEPTOR</i>	<i>RAPTOR</i>	<i>RICTOR</i>	<i>4EBP1</i>	<i>VEGF-A</i>
<i>IGF-1</i>	1,000	,778*	,167	-,262	-,333	,048	,619	,048	,036	,143	-,024
<i>IGFBP-3</i>	,778*	1,000	,311	-,180	-,108	,108	,407	,084	,133	,311	-,204
<i>PIK3CA</i>	,167	,311	1,000	,619	,500	,881**	,119	,119	,587	,738*	,262
<i>AKT-1</i>	-,262	-,180	,619	1,000	,929**	,786*	-,214	,643	,790*	,667	,762*
<i>MTOR</i>	-,333	-,108	,500	,929**	1,000	,619	-,333	,619	,635	,524	,690
<i>MLST8</i>	,048	,108	,881**	,786*	,619	1,000	,286	,429	,731*	,905**	,357
<i>DEPTOR</i>	,619	,407	,119	-,214	-,333	,286	1,000	,143	,000	,405	-,381
<i>RAPTOR</i>	,048	,084	,119	,643	,619	,429	,143	1,000	,778*	,619	,500
<i>RICTOR</i>	,036	,133	,587	,790*	,635	,731*	,000	,778*	1,000	,826*	,539
<i>4EBP1</i>	,143	,311	,738*	,667	,524	,905**	,405	,619	,826*	1,000	,190
<i>VEGF-A</i>	-,024	-,204	,262	,762*	,690	,357	-,381	,500	,539	,190	1,000

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**.. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Die mRNA-Expression von *AKT-1* und *MTOR* zeigte gemäß Spearman Korrelationskoeffizient den deutlichsten Zusammenhang (Korrelationskoeffizient = 0,929; $p < 0,01$). Für diese beiden Gene zeigte sich auch eine lineare Korrelation (R^2 Linear = 0,812) (**Abbildung 15**).

Außerdem präsentierte sich eine deutliche Korrelation der mRNA-Expression zwischen *AKT-1* ($p = 0,028$) bzw. *MTOR* und *VEGF-A* als Zielprotein, auch wenn eine statistische Signifikanz bei letzterem knapp verpasst wurde ($p = 0,058$). Weiterhin zeigten sich weitere teilweise knapp nicht signifikante Korrelationen zwischen der mRNA-Expression von *AKT-1* bzw. *MTOR* und den weiteren für den mTORC1 und mTORC2 kodierenden Genen.

Die mRNA-Expression von *4EBP1* korrelierte signifikant mit der mRNA-Expression von Strukturkomponenten des mTORC2 und *PIK3CA*. Die zu erwartende Korrelation der mRNA-Expression zwischen *4EBP1* und *VEGF-A*, als mögliches Ziel im Rahmen der durch die Hemmung von *4EBP1* initiierten Translation, präsentierte sich hingegen nicht ($p = 0,651$).

Zusammenfassend konnte in einer Stichprobe von pankreatischem Normalgewebe ($n = 8$) eine lineare Korrelation der mRNA-Expression von *AKT-1* und *MTOR* dargestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich weitere Korrelationen der mRNA-Expression anderer für den mTOR-

Signalweg kodierenden Gene. Deutliche lineare Zusammenhänge oder eine typische Signalkaskade, welche in anderen Rezensionen beschrieben wurden, ließen sich hieraus jedoch nicht ableiten (Laplante und Sabatini, 2009, Briest und Grabowski, 2014). Auf Grund der geringen Fallzahl sind die Korrelationsanalysen allerdings kritisch zu hinterfragen.

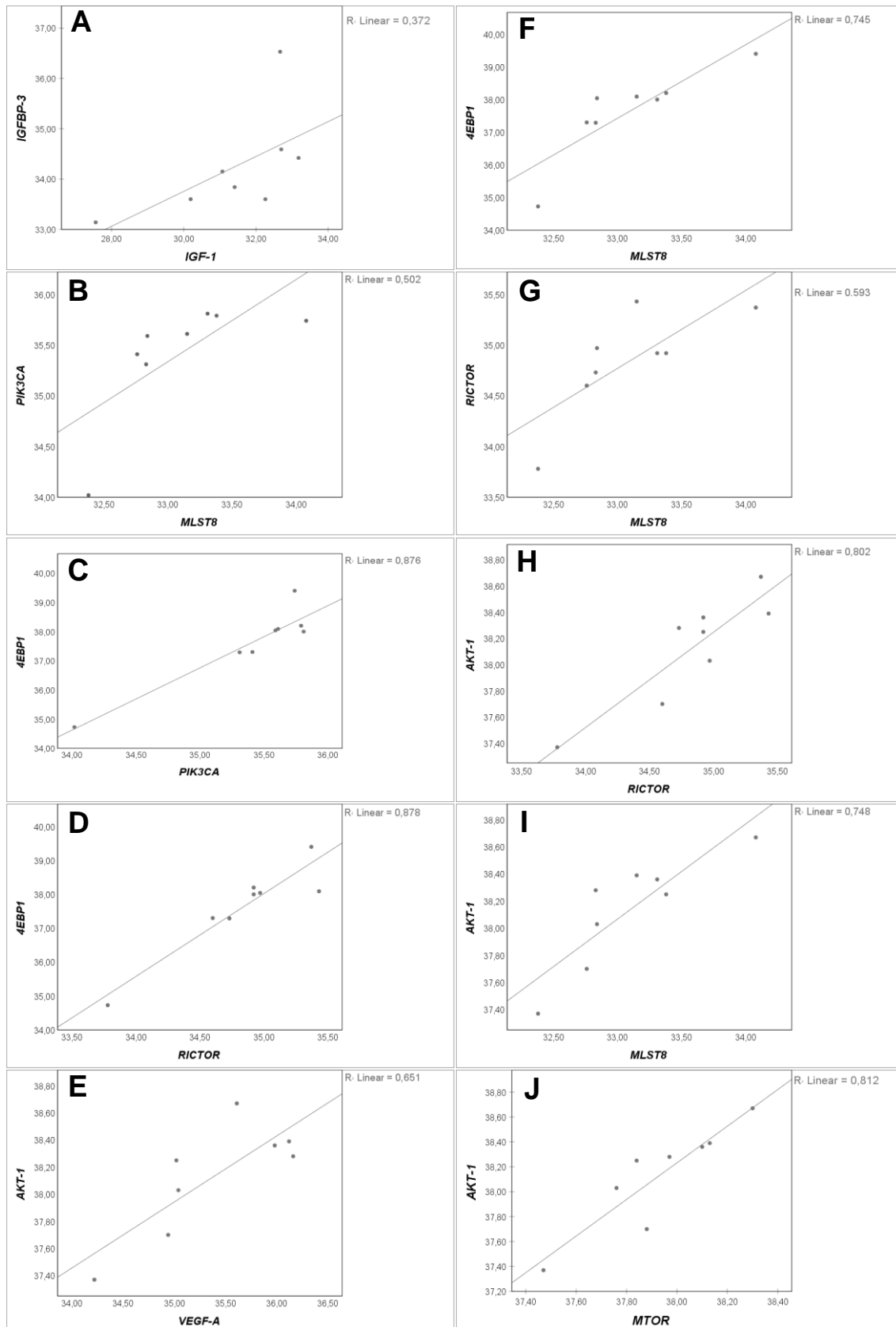


Abbildung 15. Beispielhafte lineare Regressionsanalysen der mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene in pankreatischem Normalgewebe. Ein höhergradiger linearer Zusammenhang zeigte sich für 4EBP1 und PIK3CA (R^2 Linear = 0,876) (C) bzw. 4EBP1 und RICTOR (R^2 Linear = 0,878) (D) und AKT-1 und MTOR (R^2 Linear = 0,812) (J). Bei nur 8 untersuchten Proben ist die Aussagekraft allerdings limitiert.

3.2.2 mRNA-Expressionsanalysen des mTOR-Signalwegs in G1/2 pNEN

Bei 75 Patienten mit pNEN wurde die mRNA-Expression elf verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene untersucht. Im Median zeigten sich $40 - \Delta \text{Ct}$ -Werte von $29,64 \pm 2,89$ bei *IGF-1* bis $38,01 \pm 2,8$ bei *MTOR*. (**Abbildung 16**). In der quantitativen RT-PCR konnte nach 40 Zyklen für *IGF-1* in 14 und für *RICTOR* in acht Fällen keine Genexpression detektiert werden. Für die anderen kodierenden Gene konnte meistens eine mRNA-Expression gefunden werden (**Abbildung 16**). Vergleicht man die mRNA-Expressionen untereinander, bedeutet dies eine im Median 330-fach stärkere mRNA-Expression von *MTOR* im Vergleich zu *IGF-1*.

Für alle Gene wurden zur intergenetischen Expressionskorrelation Streudiagramme erstellt. Einige davon sind mit der Angabe des R^2 -Wertes in **Abbildung 17** dargestellt.

Die mRNA-Expressionen der untersuchten Gene zeigten häufig signifikante intergenetische Korrelationen im Rahmen der Spearman-Korrelationsanalyse (**Tabelle 21**). Bei Korrelationskoeffizienten unter 0,7 waren diese Korrelationen jedoch nicht besonders stark ausgeprägt. In einem Großteil der Fälle war der Korrelationskoeffizient kleiner als 0,5, so dass in diesen Fällen nur eine sehr geringe Korrelation der Genexpression vorhanden war. Eine negative Korrelation der mRNA-Genexpression war nicht vorhanden. Unter Hinzuziehung der Streudiagramme konnte nur für die Genexpression von *MTOR* und *AKT-1* ein nahezu linearer Zusammenhang identifiziert werden. Diese Korrelation konnte statistisch auch in der linearen Regressionsanalyse ($R^2 \text{ Linear} = 0,868$) (**Abbildung 17**) und mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten belegt werden (Pearson-Korrelationskoeffizient = 0,932; $p < 0,0001$). Bei *PIK3CA*, *DEPTOR*, *RAPTOR*, *RICTOR* und *VEGF-A* zeigten sich in der Spearman-Korrelationsanalyse mit mindestens vier anderen für den mTOR-Signalwegs kodierenden Genen signifikante Korrelationen hinsichtlich der mRNA-Expression. Im Streudiagramm und der linearen Regressionsanalyse präsentierten sich hierbei im Vergleich jedoch deutlich geringere bis gar keine Korrelationen. Beispielfhaft sind in **Abbildung 17** diejenigen mit den höchsten Korrelationskoeffizienten aufgeführt.

Zusammenfassend zeigten sich zwar teils mäßig ausgeprägte monotone Zusammenhänge der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene, ein linearer Zusammenhang konnte jedoch nur für *MTOR* und *AKT-1* dargestellt werden. Auf mRNA-Ebene konnte die in der Literatur vorbeschriebene Signalkaskade hier nicht dargestellt werden (Laplanche und Sabatini, 2009).

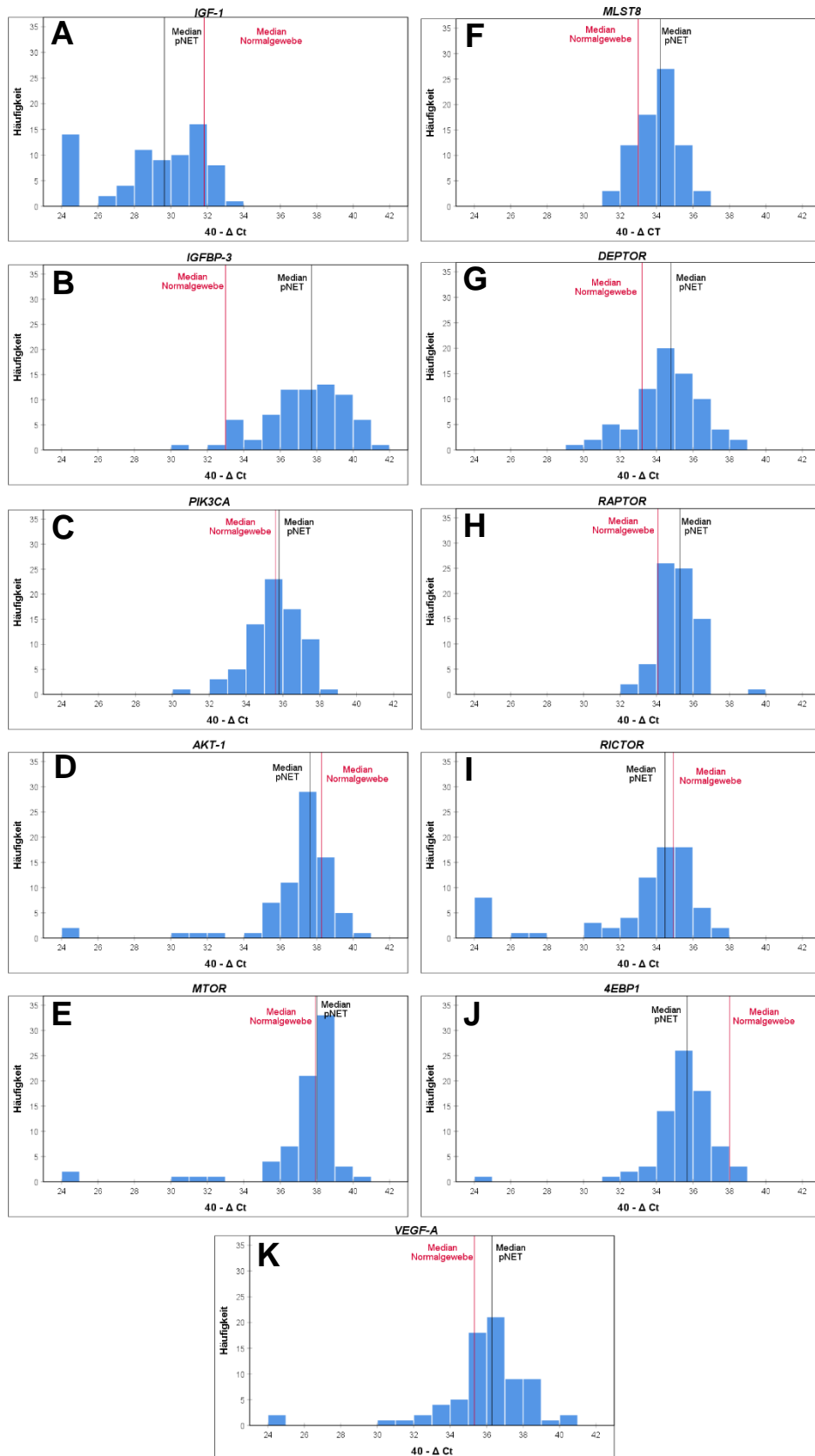


Abbildung 16. Die mRNA-Expression elf verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene bei G1/2 pNEN. Zum Vergleich wurde der mediane 40 - Δ Ct-Wert des pankreatischen Normalgewebes hinzugefügt (Giot et al.).

Tabelle 21. Intergenetische Korrelationen der mRNA-Genexpression von elf Mitgliedern des mTOR-Signalwegs bei G1/2 pNEN. In grüner Farbe sind signifikante Korrelationskoeffizienten zwischen 0,3-0,5, in blau signifikante Korrelationskoeffizienten größer als 0,5 dargestellt.

Korrelationskoeffizienten nach Spearman

	<i>IGF-1</i>	<i>IGFBP-3</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>AKT-1</i>	<i>MTOR</i>	<i>MLST8</i>	<i>DEPTOR</i>	<i>RAPTOR</i>	<i>RICTOR</i>	<i>4EBP1</i>	<i>VEGF-A</i>
<i>IGF-1</i>	1,000	,464**	,347**	,497**	,336**	,252*	,501**	,377**	,276*	,280*	,477**
<i>IGFBP-3</i>	,464**	1,000	,495**	,552**	,413**	,222	,499**	,455**	,359**	,152	,630**
<i>PIK3CA</i>	,347**	,495**	1,000	,343**	,561**	,508**	,600**	,618**	,592**	,465**	,448**
<i>AKT-1</i>	,497**	,552**	,343**	1,000	,645**	,136	,273*	,307**	,405**	,168	,420**
<i>MTOR</i>	,336**	,413**	,561**	,645**	1,000	,412**	,295*	,395**	,262*	,172	,270*
<i>MLST8</i>	,252*	,222	,508**	,136	,412**	1,000	,257*	,519**	,126	,262*	,211
<i>DEPTOR</i>	,501**	,499**	,600**	,273*	,295*	,257*	1,000	,452**	,560**	,360**	,572**
<i>RAPTOR</i>	,377**	,455**	,618**	,307**	,395**	,519**	,452**	1,000	,566**	,506**	,548**
<i>RICTOR</i>	,276*	,359**	,592**	,405**	,262*	,126	,560**	,566**	1,000	,543**	,592**
<i>4EBP1</i>	,280*	,152	,465**	,168	,172	,262*	,360**	,506**	,543**	1,000	,322**
<i>VEGF-A</i>	,477**	,630**	,448**	,420**	,270*	,211	,572**	,548**	,592**	,322**	1,000

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

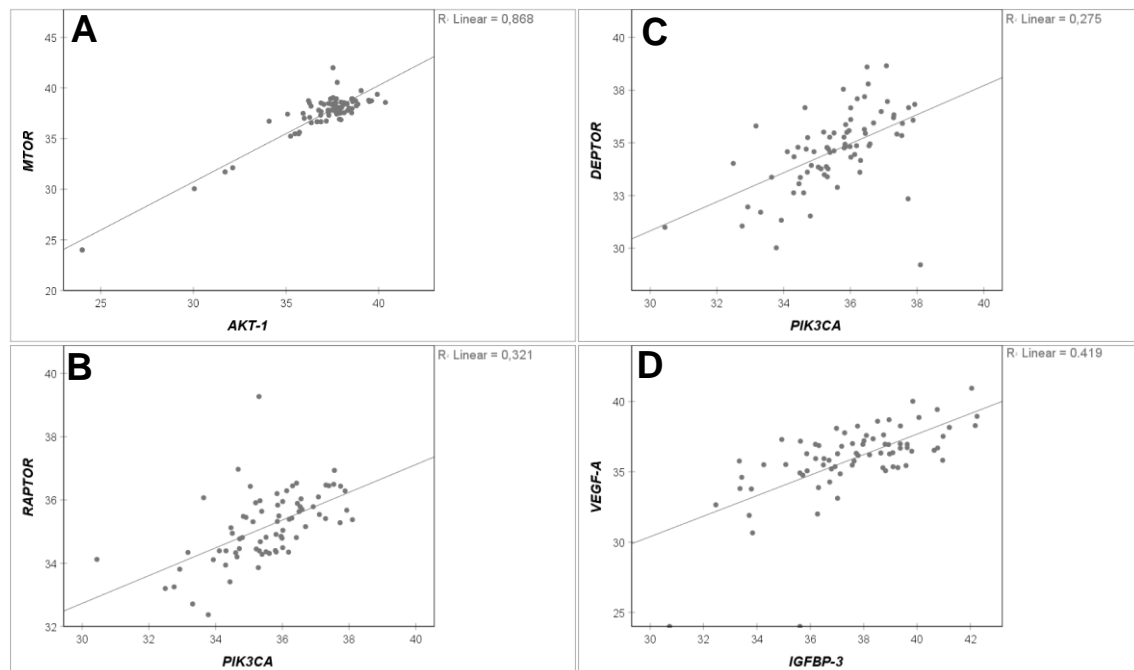


Abbildung 17. Streudiagramme der mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene mit linearer Regressionsanalyse bei G1/2 pNEN. Die 40 – Δ Ct-Werte sind durch die Zahlen an X- und Y-Achse dargestellt. Zwischen *MTOR* und *AKT-1* (A) zeigte sich ein linearer Zusammenhang (R^2 Linear = 0,868). Die mRNA-Expression der anderen Signalproteine zeigte keinen linearen Zusammenhang (B-D).

3.2.3 mRNA-Expressionsanalysen des mTOR-Signalwegs: Vergleich des pankreatischen Normalgewebes mit G1/2 pNEN

Bei einem Vergleich der mRNA-Expression der untersuchten Gene des mTOR-Signalwegs zwischen G1/2 pNEN und dem pankreatischen Normalgewebe zeigten sich signifikante Unterschiede im Mann-Whitney-U-Test für *IGF-1* ($p = 0,018$), *IGFBP-3* ($p < 0,001$), *MLST8* ($p = 0,009$), *DEPTOR* ($p = 0,005$), *RAPTOR* ($p = 0,001$) und *4EBP1* ($p = 0,001$). Die mRNA-Expression von *MLST8*, *DEPTOR*, *IGFBP-3* und *RAPTOR* war im Tumorgewebe erhöht. Im Gegensatz hierzu wurde die mRNA von *IGF-1* und *4EBP1* in pNEN im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert. Für *VEGF-A* ($p = 0,066$) und *AKT-1* ($p = 0,061$) wurde ein signifikanter Unterschied nur knapp verpasst. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich für *PIK3CA* ($p = 0,517$), *RICTOR* ($p = 0,366$) und *MTOR* ($p = 0,781$) (**Abbildung 16, Abbildung 18**).

Es konnte ein unterschiedliches mRNA-Expressionsprofil der am mTOR-Signalweg beteiligten Gene in pankreatischem Normalgewebe und gut differenzierten pNEN herausgearbeitet werden. Die vermehrte mRNA-Expression der für den mTORC1 und auch teilweise mTORC2 kodierenden Gene sowie die verminderte mRNA-Expression von *4EBP1* sprechen für eine vermehrte Aktivierung des mTOR-Signalwegs in pNEN. Bestätigend zeigten sich eine erhöhte mRNA-Expression von *VEGF-A*, auch wenn eine statistische Signifikanz knapp verpasst wurde.

Obwohl IGF-1 als Wachstumsfaktor und durch Bindung an den IGF-1R für die mTOR-Signalkaskade eine wichtige Rolle einnimmt, ist die mRNA-Expression bei pNEN im Vergleich zu pankreatischem Normalgewebe vermindert. Auffällig ist weiterhin, dass sowohl in pankreatischem Normalgewebe als auch in pNEN die mRNA-Expression des *IGF-1*-Gens im Vergleich zu anderen Genen der mTOR-Signalkaskade die geringste Genexpression aufweist.

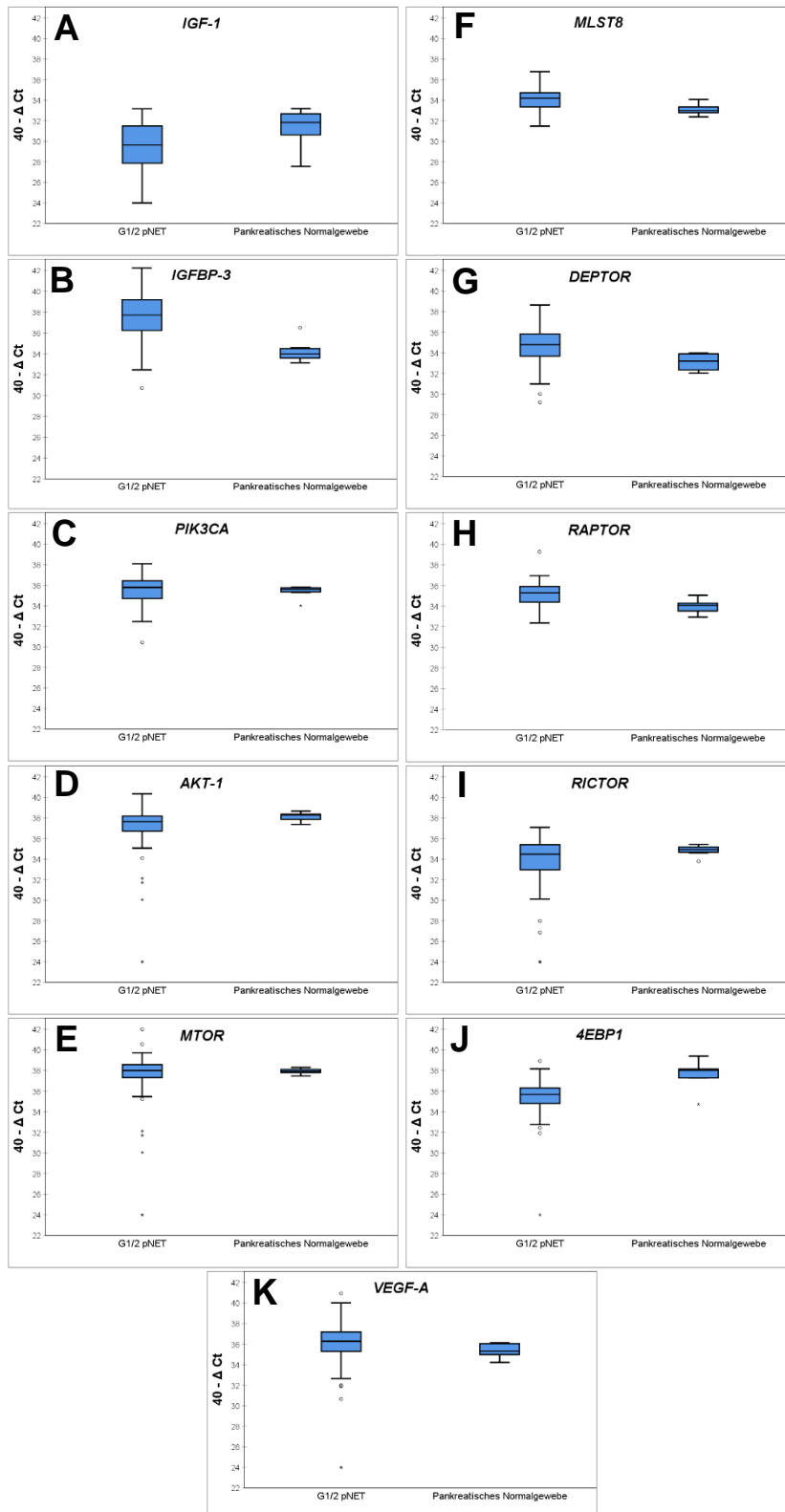


Abbildung 18. Die mRNA-Expression elf verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene: Vergleich zwischen G1/2 pNET und pankreatischem Normalgewebe. Es wurde die mRNA-Expression von elf für den mTOR-Signalweg kodierenden Genen in pankreatischem Normalgewebe (n = 8) und gut differenzierten pNET (n = 75) verglichen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede für *IGF-1* ($p = 0,018$) (A), *IGFBP-3* ($p < 0,001$) (B), *MLST8* ($p = 0,009$) (F), *DEPTOR* ($p = 0,005$) (G), *RAPTOR* ($p = 0,001$) (H) und *4EBP1* ($p = 0,001$) (J). Für *AKT-1* ($p = 0,061$) (D) und *VEGF-A* ($p = 0,066$) (K) wurde ein signifikanter Unterschied nur knapp verpasst. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich für *PIK3CA* ($p = 0,517$) (C), *MTOR* ($p = 0,781$) (E) und *RICTOR* ($p = 0,366$) (I).

3.2.4 Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs in G1/2 pNEN und Assoziation zu den klinischen Charakteristika

Eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *IGF-1*, *IGFBP-3*, *PIK3CA*, *AKT-1*, *MTOR*, *MLST8*, *DEPTOR*, *RAPTOR*, *RICTOR*, *4EBP1* und *VEGF-A* in pNEN und den klinischen Parametern zeigte sich nur in Ausnahmefällen. Die mRNA-Genexpression war unabhängig vom Alter zum Diagnosezeitpunkt und dem gewonnenen Gewebe. Für *MLST8* zeigte sich eine Geschlechtsabhängigkeit. Bei Frauen wurde die mRNA von *MLST8* signifikant vermehrt exprimiert ($p = 0,033$) (**Abbildung 19**). Die Expression keines der analysierten Gene korrelierte signifikant zum Tumorstadium im Kruskal-Wallis-Test unter Berücksichtigung aller Tumorstadien. Bei zum Diagnosezeitpunkt metastasierten Tumoren zeigte sich eine signifikant reduzierte mRNA-Expression von *MLST8* ($p = 0,044$) und *RICTOR* ($p = 0,016$). Auf Grund der Geschlechterabhängigkeit ist die reduzierte mRNA-Expression von *MLST8* bei Metastasierung jedoch nicht zweifelsfrei zu beurteilen. In pankreatischem Normalgewebe war die mRNA-Expression von *MLST8* am geringsten. In den UICC-Stadien I-III zeigte sich eine vergleichsweise hohe mRNA-Expression von *MLST8*, welche bei Metastasierung wieder abnahm, jedoch nicht auf das Niveau der Genexpression in pankreatischen Normalgewebe. Für *RICTOR* war die mRNA-Expression in pankreatischem Normalgewebe und M0-Stadium hingegen nahezu identisch. Bei Metastasierung des Tumors nahm die Genexpression jedoch ab (**Abbildung 19**). Ein analoges Ergebnis zeigte sich für die mRNA-Expression von *RICTOR* bei einem Vergleich des UICC-Stadiums I und II gegenüber UICC-Stadium III und IV ($p = 0,047$).

Das histopathologische Grading korrelierte nicht mit der mRNA-Expression eines der untersuchten Gene. Bei histopathologisch nachweisbarer Hämangiainvasion wurde die mRNA von *IGFBP-3* ($p = 0,012$) vermehrt exprimiert. In pankreatischem Normalgewebe zeigte sich im Verhältnis hierzu die geringste mRNA-Menge (**Abbildung 19**). Eine signifikante Assoziation der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene mit der Lymphangiainvasion bestätigte sich für keines der hier untersuchten Gene. Bezüglich der funktionellen Aktivität war eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *RICTOR* auszumachen ($p = 0,041$) (**Abbildung 19**).

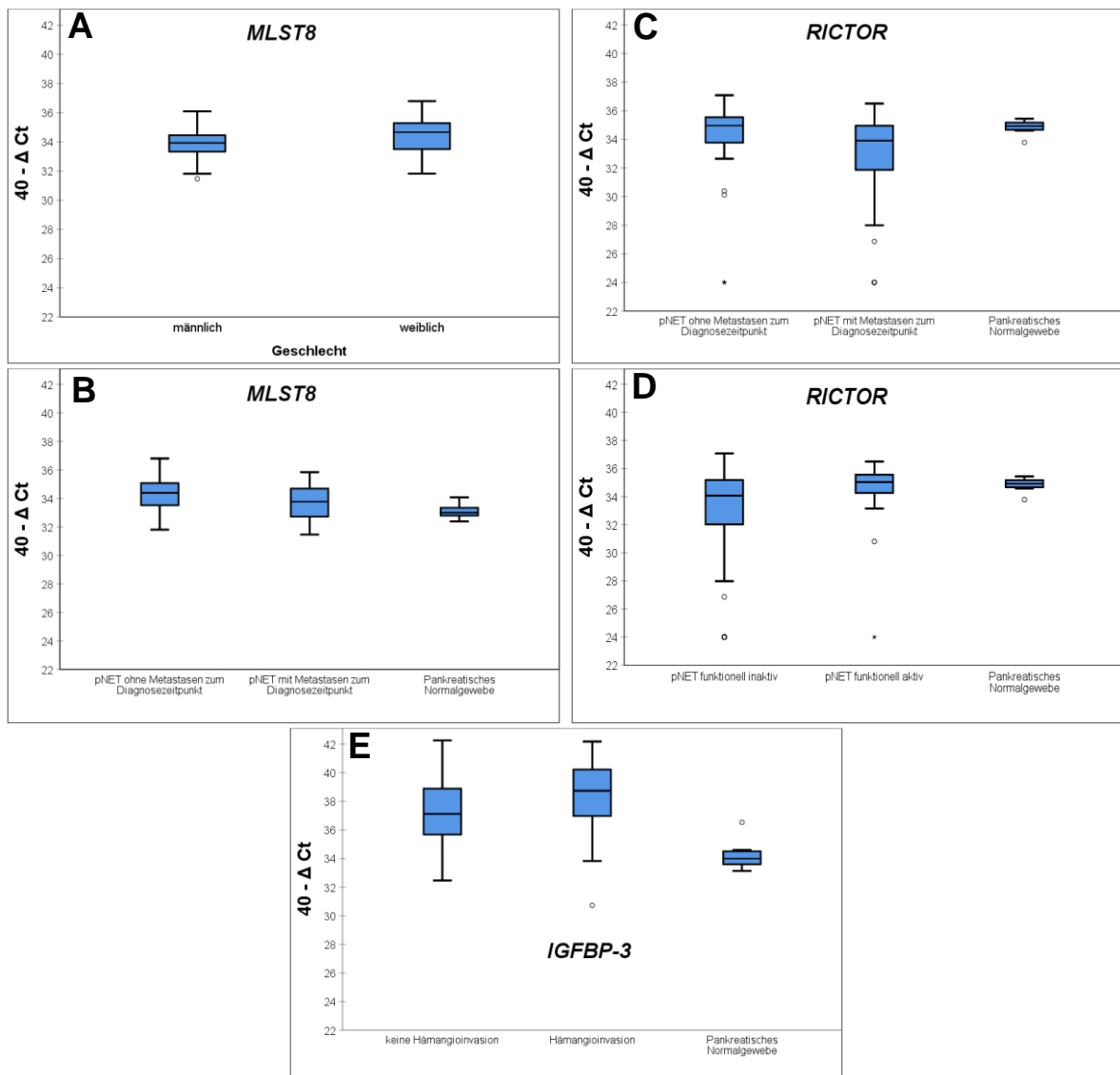


Abbildung 19. Die mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene in Abhängigkeit von den klinischen Charakteristika bei G1/2 pNEN. In der dritten Spalte ist zum Vergleich die jeweilige mRNA-Expression in pankreatischem Normalgewebe dargestellt. A: mRNA-Expression von *MLST8* in Abhängigkeit von dem Geschlecht ($p = 0,033$); B: mRNA-Expression von *MLST8* in Abhängigkeit von dem Metastasierungsverhalten zum Diagnosezeitpunkt ($p = 0,044$); C: mRNA-Expression von *RICTOR* in Abhängigkeit von dem Metastasierungsverhalten zum Diagnosezeitpunkt ($p = 0,016$); D: mRNA-Expression von *RICTOR* in Abhängigkeit von der Funktionalität ($p = 0,041$); E: mRNA-Expression von *IGFBP-3* in Abhängigkeit von der Hämangioinvasion ($p = 0,012$).

Um die prognostische Bedeutung der einzelnen mRNA-Genexpressionen des mTOR-Signalwegs weitergehend zu analysieren, wurde für jedes Gen eine Kaplan-Meier-Kurven inklusive Korrelationsanalysen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes angefertigt. Es erfolgte vorab eine Dichotomisierung anhand der 25., 50, und 75. Perzentile der jeweiligen mRNA-Expression, sowie anhand des medianen $40 - \Delta Ct$ -Wertes in pankreatischen Normalgewebe.

Zusammenfassend zeigten sich bis auf eine Ausnahme keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Insbesondere die mRNA-Expression derjenigen Gene, welche in den oben aufgeführten Analysen zu den klinisch-prognostischen Parametern korrelierten, zeigte keine eigenständige signifikante Assoziation zu dem Gesamtüberleben. Nach Dichotomisierung anhand der medianen mRNA-Expression des pankreatischen Normalgewebes konnte kein Vor- oder Nachteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei einer vermehrten oder verminderten Genexpression festgestellt werden.

Einzig die mRNA-Expression des für Raptor-kodierenden Gens zeigte eine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben. Diese Korrelation konnte bei erhöhten mRNA-Werten oberhalb der medianen Genexpression in G1/2 pNEN ($p = 0,01$) (**Abbildung 20**) und oberhalb der 75. Perzentile ($p = 0,016$) erzielt werden.

Bei einer verstärkten mRNA-Expression (oberhalb der 75. Perzentile) von *IGF-1* ($p = 0,108$) (**Abbildung 21**) oder *IGFBP-3* ($p = 0,091$) (**Abbildung 22**) zeigte sich ebenfalls ein schlechteres Gesamtüberleben, auch wenn keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Weiterhin ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der mRNA-Expression einzelner für den mTOR-Signalweg kodierender Gene und der Prognose.

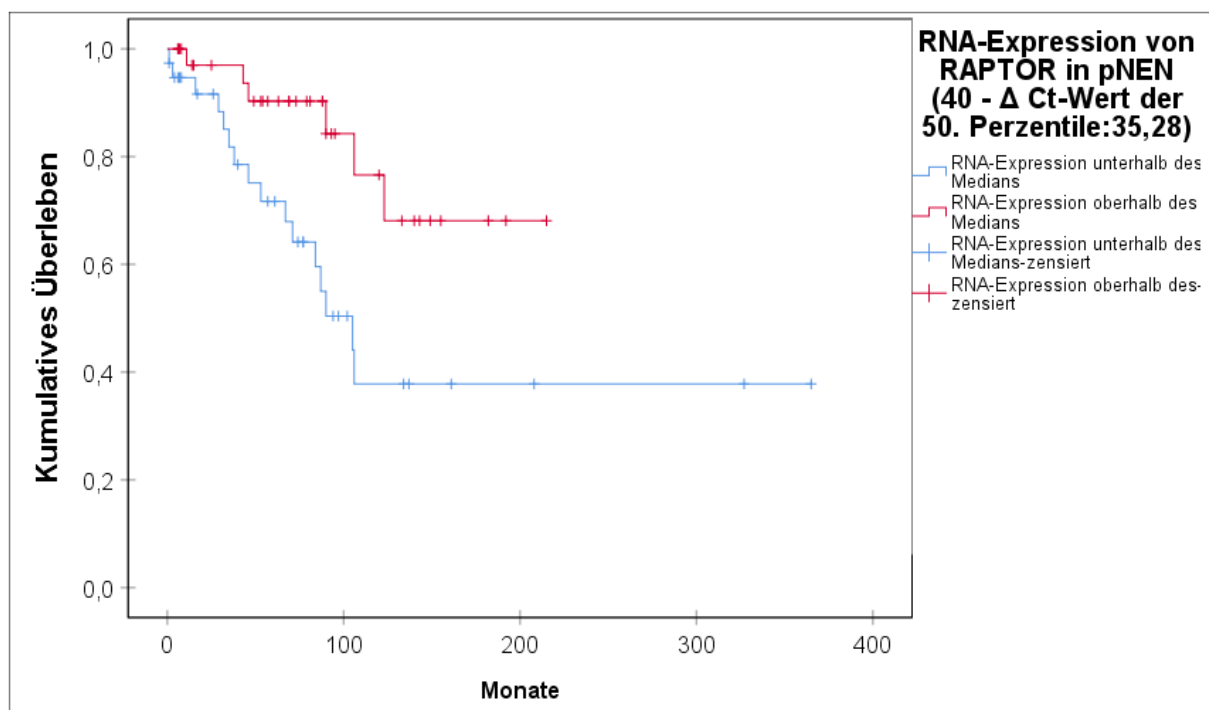


Abbildung 20. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der mRNA-Expression von RAPTOR in G1/2 pNEN. Es erfolgte eine Dichotomisierung anhand der medianen mRNA-Expression von RAPTOR in G1/2 pNEN. Bei einer niedrigen mRNA-Expression zeigte sich ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ($p = 0,01$).

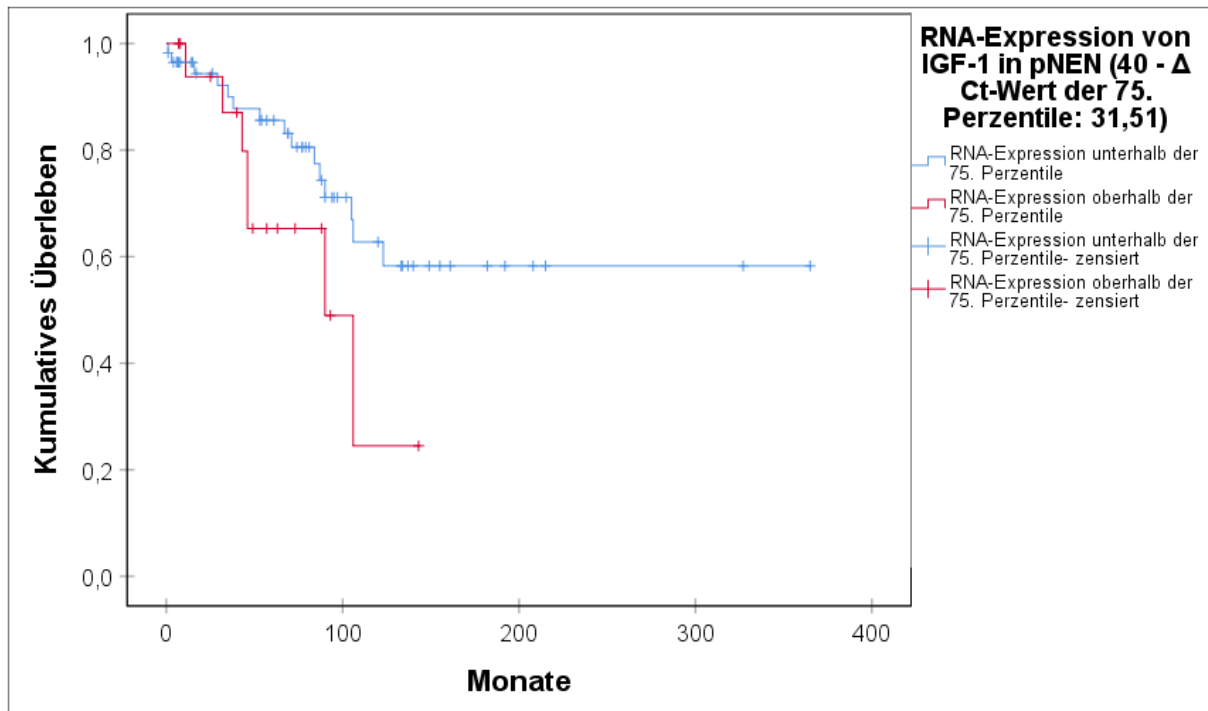


Abbildung 21. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der mRNA-Expression von *IGF-1* in G1/2 pNEN. Es erfolgte eine Dichotomisierung anhand der 75. Perzentile der mRNA-Expression von *IGF-1* in G1/2 pNEN. Bei hoher mRNA-Expression von *IGF-1* zeigte sich ein schlechteres Gesamtüberleben, auch wenn eine statistische Signifikanz verpasst wurde ($p = 0,108$).

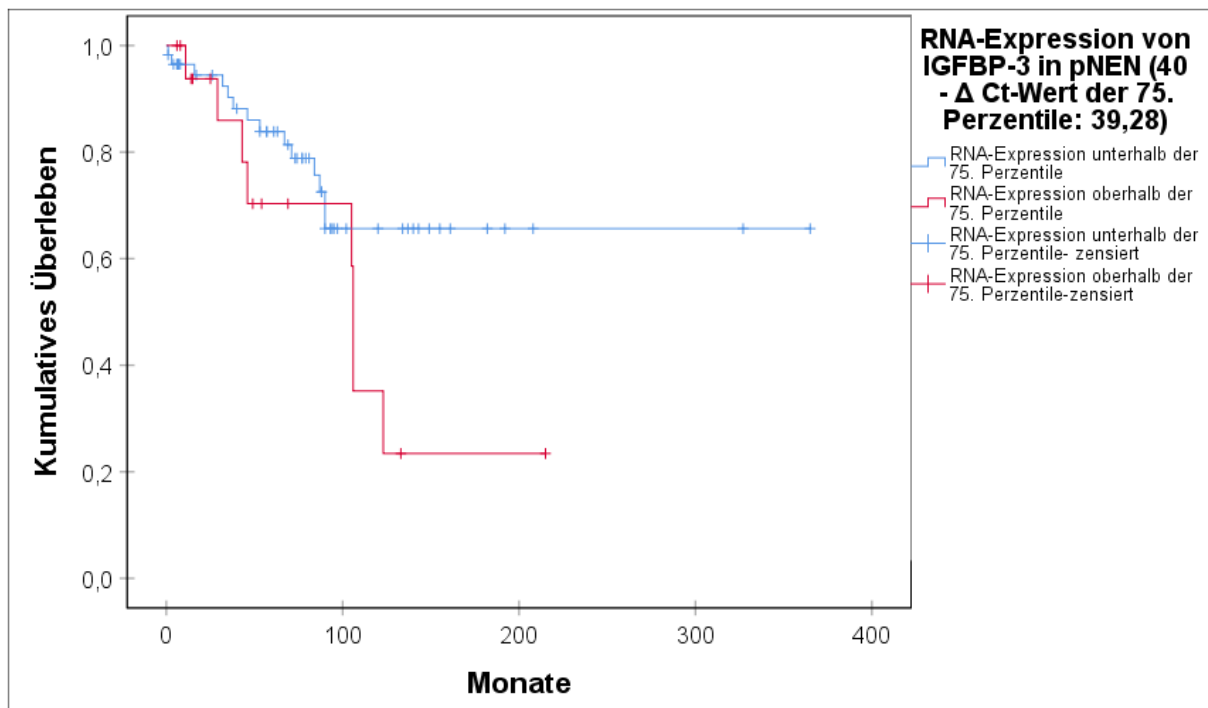


Abbildung 22. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der mRNA-Expression von *IGFBP-3* in G1/2 pNEN. Es erfolgte eine Dichotomisierung anhand der 75. Perzentile der mRNA-Expression von *IGFBP-3* in G1/2 pNEN. Bei hoher mRNA-Expression von *IGFBP-3* zeigte sich ein schlechteres Gesamtüberleben, auch wenn eine statistische Signifikanz verpasst wurde ($p = 0,091$).

3.2.5 Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs als prädiktiver Biomarker

Diejenigen Patienten, welche eine Therapie mit dem mTOR-Inhibitor EVE erhielten, wurden gesondert im Rahmen einer Subgruppenanalyse betrachtet. Die mRNA-Expression der elf Mitglieder der mTOR-Signalkaskade wurde hinsichtlich einer möglichen Prädiktion des Therapieansprechens auf EVE analysiert. Da auf Grund der retrospektiven Datenanalyse die Daten für eine Betrachtung des progressionsfreien Überlebens unzureichend waren, erfolgte ausschließlich eine Betrachtung des Therapieansprechens innerhalb der ersten 12 Monate. Insgesamt 17 Patienten, bei denen die mRNA-Expression von elf für den mTOR-Signalweg kodierenden Genen analysiert werden konnte, erhielten auch eine Therapie mit EVE. Die klinischen Daten sind in **Tabelle 22** aufgeführt. Das mediane Patientenalter betrug $57 \pm 11,4$ Jahre. Der Großteil der Patienten war im ersten Jahr unter einer Therapie mit EVE progredient (**Abbildung 23**). Lediglich bei zwei Patienten zeigte sich eine stabile Erkrankungsphase. Die Patienten, die unter einer Therapie mit EVE einen progredienten Krankheitsverlauf hatten, hatten im Vergleich zu denjenigen mit einer stabilen Erkrankungsphase ein kürzeres Gesamtüberleben, auch wenn sich auf Grund der niedrigen Fallzahl kein signifikanter Unterschied zeigte ($p = 0,081$) (**Abbildung 24**).

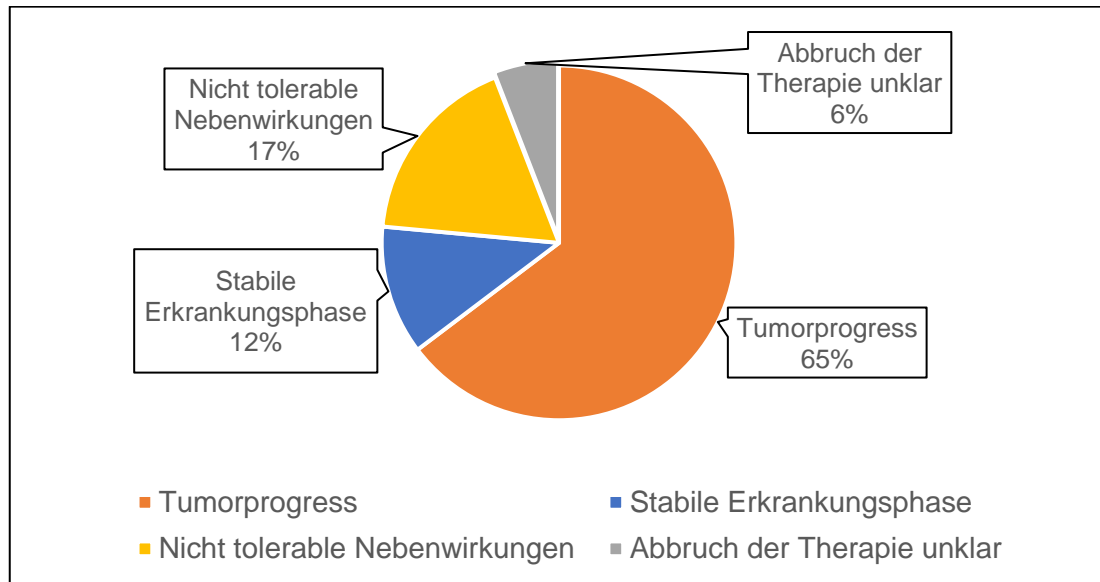


Abbildung 23. Therapieansprechen auf Everolimus innerhalb eines Jahres. Es wurden insgesamt 17 Patienten mit EVE behandelt.

Tabelle 22. Klinische Daten der mit Everolimus behandelten Patienten.

Kriterium	Patientenzahl (n = 17)	Prozentualer Anteil (%)
Geschlecht		
- männlich	12	70,6
- weiblich	5	29,4
Histopathologische Charakteristika		
- G1	3	17,6
- G2	14	82,4
- Hämangioinvasion	9	52,9
- Lymphangioinvasion	3	17,6
Analysiertes Gewebe		
- Pankreas	13	76,5
- Leber	4	23,5
Initiales Tumorstadium nach UICC		
- UICC I	0	0
- UICC II	1	5,9
- UICC III	1	5,9
- UICC IV	15	88,2
Funktionalität		
- Funktionell aktiv	1	5,9
- Funktionell inaktiv	16	94,1

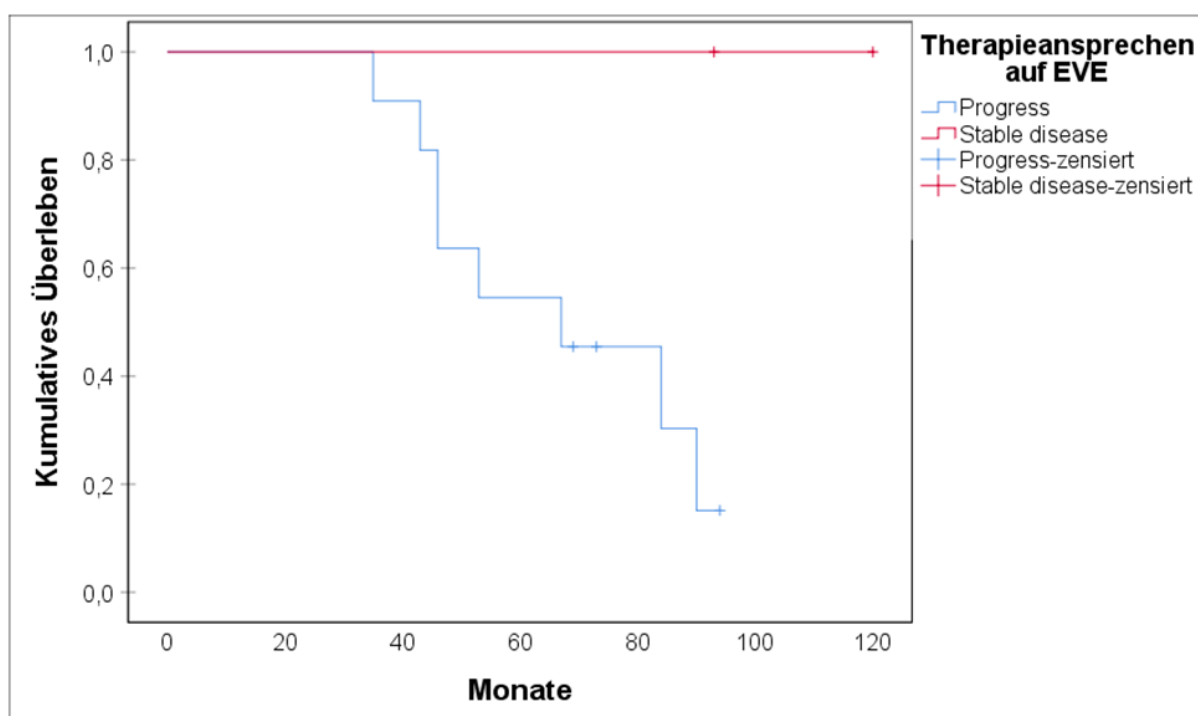


Abbildung 24. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von dem Therapieansprechen auf Everolimus. Die Prognose derjenigen Patienten, die unter einer Therapie mit EVE progredient waren (n = 11) hatten im Vergleich zu denjenigen, die eine stabile Erkrankungsphase erreichten (n = 2) ein schlechteres Gesamtüberleben, auch wenn sich auf Grund der geringen Fallzahl keine Signifikanz zeigte ($p = 0,081$).

Vergleicht man die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs zwischen den therapierefraktären Patienten mit denjenigen, die unter EVE eine stabile Erkrankungsphase erzielten, zeigte sich für

keines der Gene ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test (Signifikanzniveau je nach Gen: $p = 0,231 - 0,923$). Nach Einteilung in eine hohe oder niedrige mRNA-Expression anhand der zuvor ermittelten medianen und quartilen mRNA-Expressionswerte bei pNEN und der medianen Expression der mRNA im pankreatischen Normalgewebe zeigte sich kein Hinweis darauf, dass das Therapieansprechen mit Hilfe der mRNA-Expression der untersuchten Gene vorherzusagen ist.

3.3 Der MGMT-Status in G1/2 pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Für die Analyse des „MGMT-Status“ stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die immunhistochemische Expression von MGMT und die Methylierung der Promotorregion von *MGMT* untersucht.

Bei nicht vorhandener Normalverteilung der methylierten Allele wurden zu statistischen Zwecken nur nicht-parametrische Tests verwendet (Kolmogorov-Smirnov-Test $p < 0,001$). Die klinischen Charakteristika der 76 Patienten sind unter **Kapitel 3.1** ausgeführt.

3.3.1 Die Promotormethylierung des MGMT-Gens in G1/2 pNEN

Fünf CpG-Inseln der *MGMT*-Promotorregion wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von Methylgruppen evaluiert. Es wurde der Mittelwert der prozentual methylierten Allele gebildet. Anhand dieses erhobenen Mittelwertes erfolgte eine Dichotomisierung in eine unmethylierte oder methylierte Promotorregion. In verschiedenen Publikationen wurden uneinheitliche Grenzwerte zur Unterscheidung dieser beiden Gruppen beschrieben und verwendet (Quillien et al., 2012, Dussol et al., 2015, Cros et al., 2016, Raj et al., 2017, Schulze Heuling et al., 2017, Campana et al., 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher fünf verschiedene in der Literatur vorbeschriebene Grenzwerte (7; 8, 10; 15; 20 % methylierte Allele) zur Dichotomisierung untersucht. Für pNEN sind bisher Daten bei Grenzwerten von 7, 8 und 20 % methylierter Allele publiziert (Cros et al., 2016, Campana et al., 2018, Walter et al., 2015, Raj et al., 2017). Da sich bei einem Grenzwert von 7 % und 8 % nur minimale und nicht signifikante Unterschiede zeigten, erfolgt nachfolgend ausschließlich die Darstellung für den minimal untersuchten Grenzwert.

Im Median waren 9,65 % der CpG-Inseln der Promotorregion der Allele des *MGMT*-Gens mit Methylgruppen versehen. Der Mittelwert betrug $12,81 \pm 9,13$ % (Reichweite 2,8 - 42,8 %). Unter Verwendung der oben angegebenen Grenzwerte zur Dichotomisierung, war in 14 - 48 Fällen (entsprechend 18,4 - 63,2 %) von einer Methylierung der *MGMT*-Promotorregion auszugehen

(Abbildung 25). Dies liegt in etwa in dem vorbeschriebenen Bereich für gastrointestinale neuroendokrine Neoplasien (12 – 56 % der Fälle mit methylierter Promotorregion) (Schmitt et al., 2014, Walter et al., 2015).

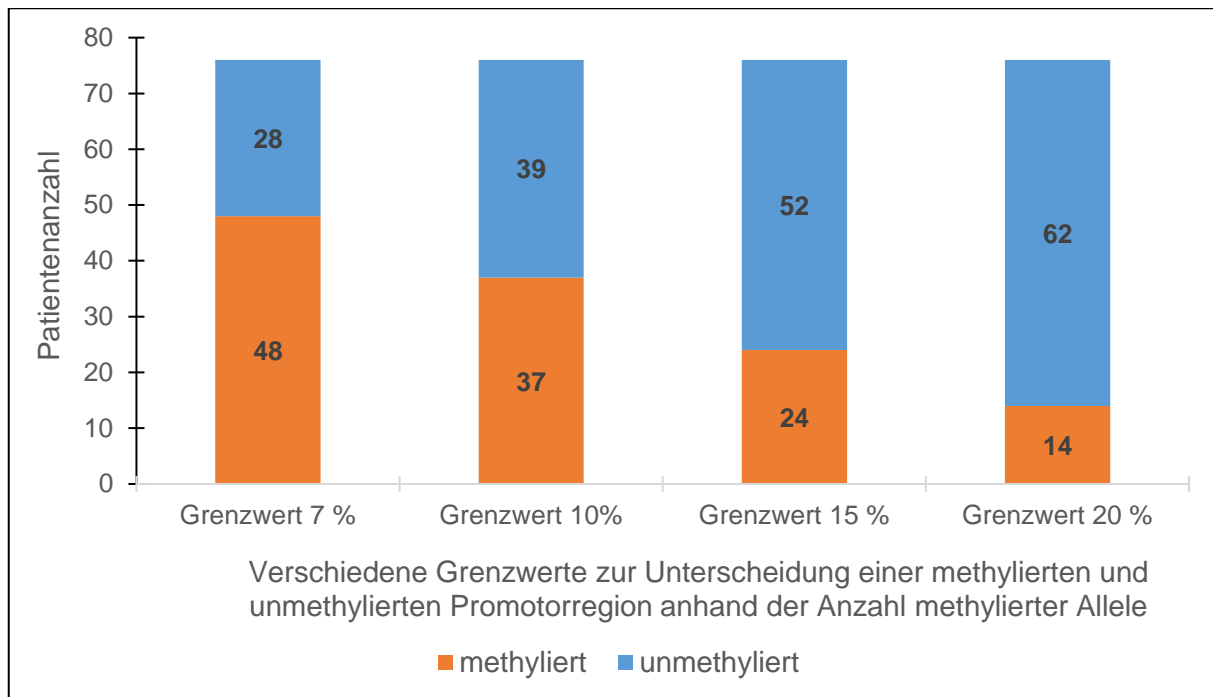


Abbildung 25. Verhältnis von methylierten und unmethylierten Allelen der *MGMT*-Promotorregion bei unterschiedlichen Grenzwerten bei G1/2 pNEN.

3.3.2 Die *MGMT*-Promotormethylierung in G1/2 pNEN und Assoziation zu den klinischen Charakteristika

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Erkrankungsalter ($p = 0,624$ gemäß Spearman-Korrelation) oder dem Geschlecht ($p = 0,12$) mit der Prozentzahl der methylierten Allele konnte ausgeschlossen werden. Auch zwischen funktionell aktiven und inaktiven Tumoren zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,646$ gemäß Spearman-Korrelation).

Das Tumorstadium korrelierte nicht mit der Anzahl der methylierten Allele ($p = 0,969$ im Kruskal-Wallis-Test und $p = 0,813$ gemäß Spearman-Korrelation) (Abbildung 26). Bei einer Gegenüberstellung der UICC-Stadien I und II mit den UICC-Stadien III und IV war ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Methylierungsstatus festzustellen ($p = 0,508$ im Mann-Whitney-U-Test). Auch nach Dichotomisierung zeigte sich unabhängig von dem verwendeten Trennwert keine Assoziation zwischen dem Methylierungsstatus und dem UICC-Stadium. Die

prozentuale Anzahl der methylierten Allele zum Erkrankungsbeginn unterschied sich nicht bei metastasierten und unmetastasierten G1/2 pNEN ($p = 0,942$ im Mann-Whitney-U-Test).

Der Mittelwert der methylierten Allele der *MGMT*-Promotorregion war bei den gut differenzierten pNEN im Vergleich zu den mäßig differenzierten pNEN reduziert. Bei einem Vergleich der beiden Gruppen war der Unterschied ohne statistische Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test ($10,72 \pm 6,29\%$ vs. $13,79 \pm 10,10\%$; $p = 0,351$; im Median $9,2\%$ vs. $9,9\%$) (**Abbildung 26**). Auch nach Dichotomisierung zeigten sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Eine Analyse möglicher direkter Zusammenhänge zum Proliferationsmarker Ki-67 bestätigte die fehlende Assoziation ($p = 0,286$ gemäß Spearman-Korrelation).

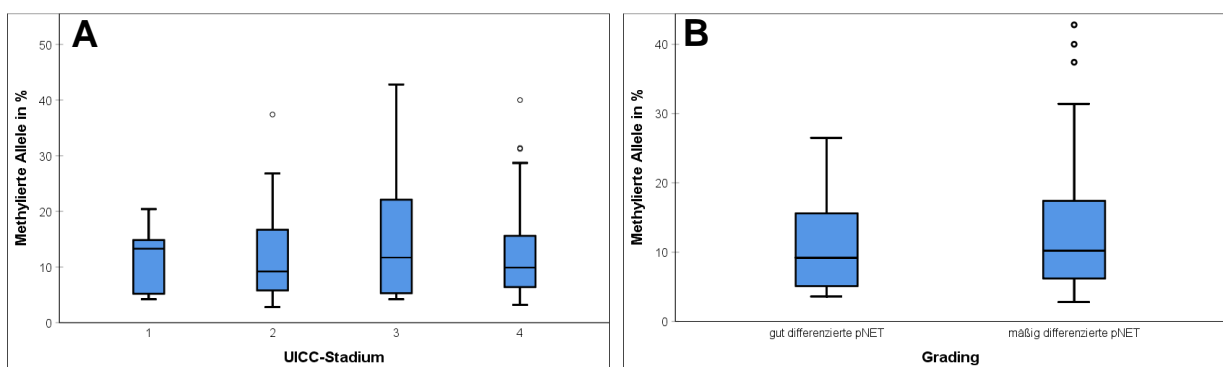


Abbildung 26. Anzahl methylierter Allele in Abhängigkeit vom UICC-Stadium und Grading bei G1/2 pNEN. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zeigte sich weder für das UICC-Stadium ($p = 0,969$ (Kruskal-Wallis-Test) bzw. $p = 0,813$ (Spearman-Korrelation)) (A) noch für das Grading ($p = 0,508$ (Mann-Whitney-U-Test)) (B).

Das Gesamtüberleben zeigte keine Assoziation zum Methylierungsstatus, unabhängig von dem verwendeten Unterscheidungswert zur Unterteilung in eine methylierte oder unmethylierte Promotorregion (**Abbildung 27**).

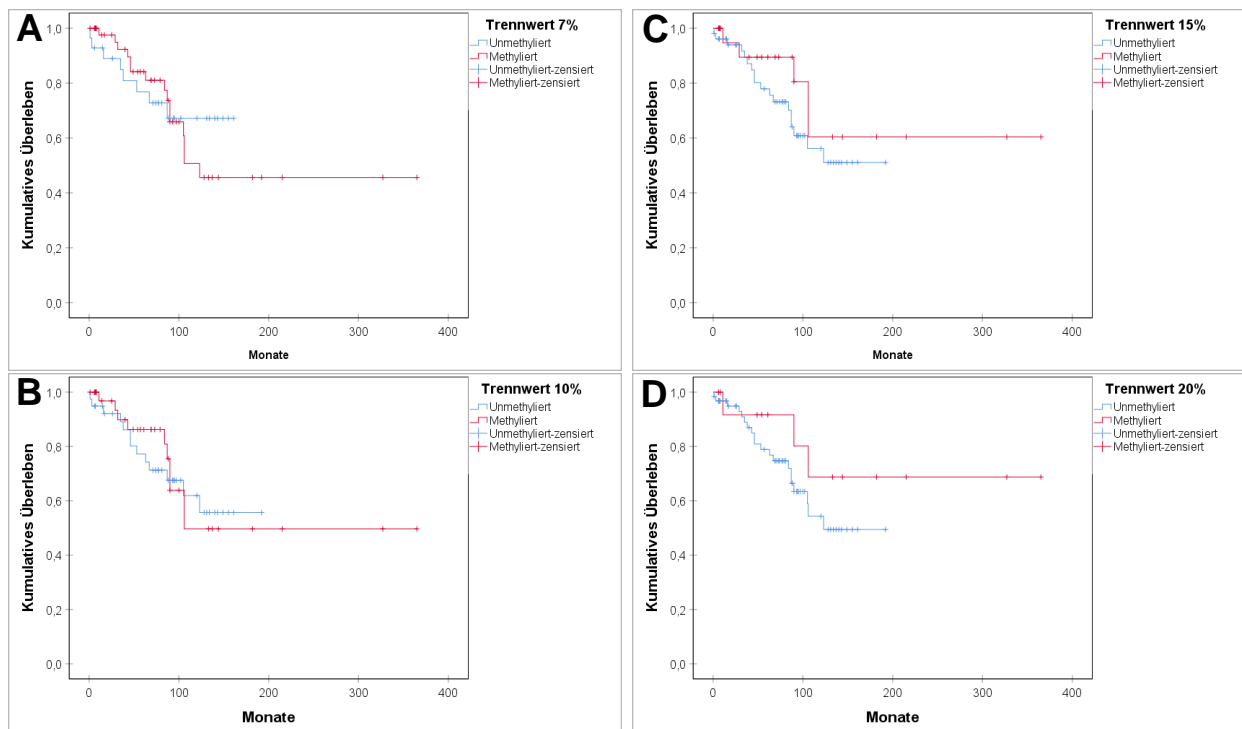


Abbildung 27. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Anzahl methylierter Allele der *MGMT*-Promotorregion nach Dichotomisierung anhand verschiedener Trennwerte bei G1/2 pNEN. Unabhängig von den untersuchten Trennwerten (7 % methylierte Allele ($p = 0,581$) (A); 10 % methylierte Allele ($p = 0,977$) (B); 15 % methylierte Allele ($p = 0,350$) (C); 20 % methylierte Allele ($p = 0,281$) (D)) präsentierte sich kein signifikanter Einfluss der Anzahl methylierter Allele der *MGMT*-Promotorregion auf das Gesamtüberleben.

3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von *MGMT* in G1/2 pNEN

Von den 76 Patienten, bei denen eine Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung möglich war, war in 75 % der Fälle ($n = 57$) auch eine aussagekräftiger immunhistochemische Untersuchung des *MGMT*-Status möglich. Bei allen aus Oslo stammenden Proben ($n = 9$) war auf Grund der zu geringen Materialmenge keine Analyse mittels Immunhistochemie möglich. In zehn weiteren Fällen war trotz wiederholter Versuche keine adäquate Aussagekraft möglich.

Der Anteil an Fällen, welche als sicher negativ (0 % der Tumorzellen *MGMT* positiv) oder positiv (> 30 % der Tumorzellen *MGMT* positiv) einzustufen waren, war nahezu identisch. Bei einigen pNEN war *MGMT* intranukleär in weniger als 10 % der Tumorzellen nachweisbar (**Abbildung 28**). Diese Patienten wurden für die anschließende Dichotomisierung zur Korrelation mit der Promotormethylierungsanalyse als negativ betrachtet.

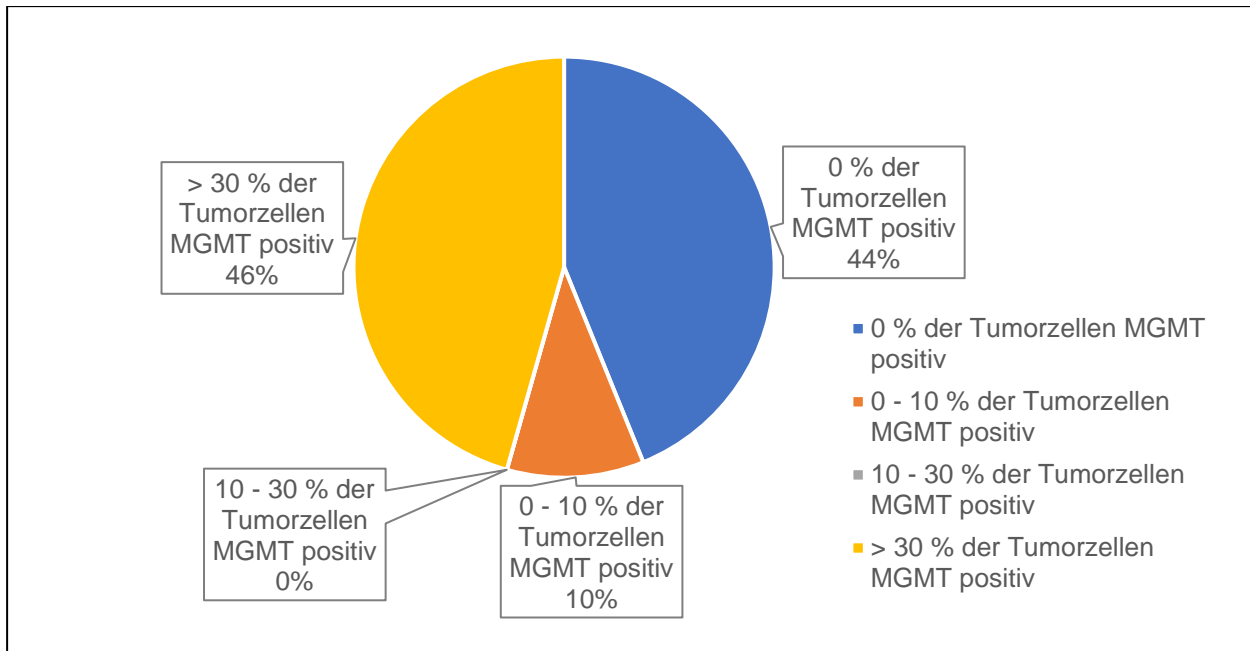


Abbildung 28. Immunhistochemischer Nachweis von MGMT bei G1/2 pNEN. Bei 57 Patienten konnte eine entsprechende Untersuchung erfolgen.

Der immunhistochemisch erhobene MGMT-Status wurde mittels Spearman-Test mit weiteren klinischen Variablen wie dem Erkrankungsalter ($p = 0,918$) (im Mittel $51,67 \pm 13,2$ Jahre), dem Geschlecht ($p = 0,401$), dem histopathologischen Grading ($p = 0,906$), dem Ki-67-Index ($p = 0,384$) der Funktionalität ($p = 0,478$), der Lymph- ($p = 0,188$) oder Hämangioinvasion ($p = 0,061$), dem UICC-Stadium ($p = 0,756$) oder dem M-Stadium zum Erkrankungsbeginn ($p = 0,869$) korreliert, ohne dass sich signifikante Zusammenhänge zeigten.

Bei einem positiven immunhistochemischen MGMT-Status, definiert als über 30 % der Tumorzellen mit einem intranukleären Nachweis von MGMT, zeigte sich ein schlechteres Gesamtüberleben, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,129$) (**Abbildung 29**). In den ersten 7 Jahren war hierbei eine nahezu identische Überlebenskurve festzustellen.

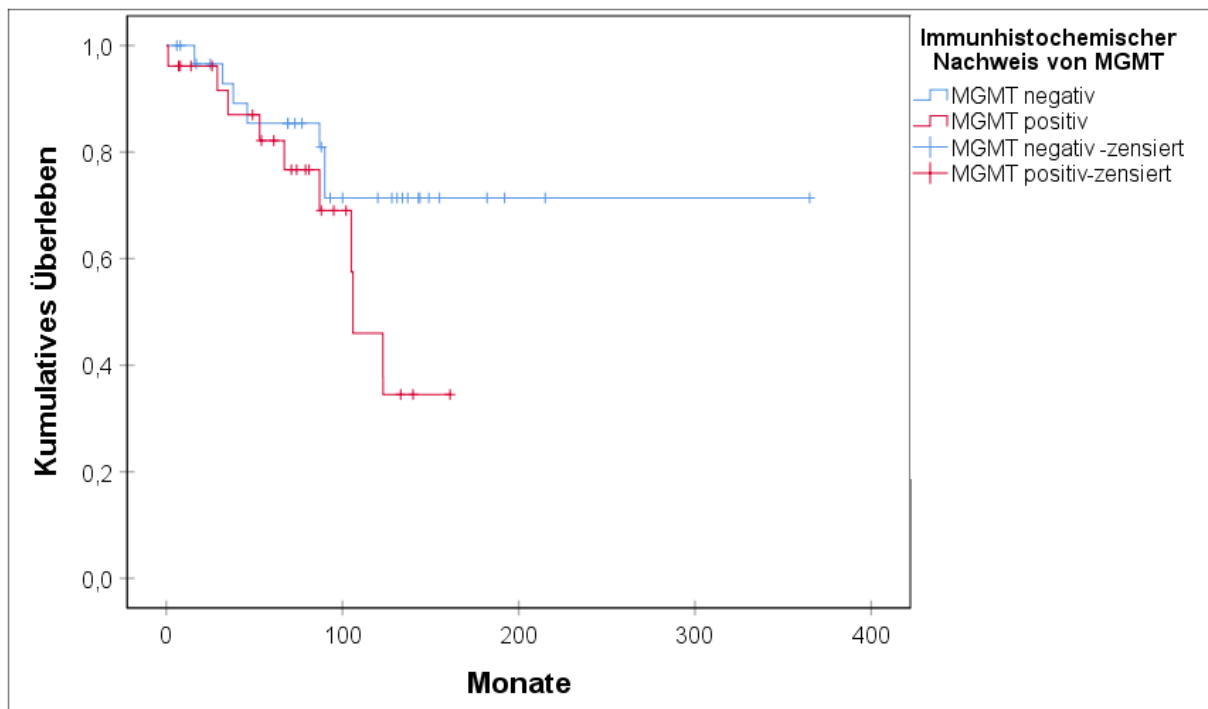


Abbildung 29. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Expression von MGMT in G1/2 pNEN. Es wurden insgesamt 57 Patienten untersucht. Wenn sich in über 30 % der Tumorzellen immunhistochemisch ein Nachweis von MGMT zeigte, wurde der Tumor als „MGMT positiv“ gewertet. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben in Abhängigkeit von dem immunhistochemisch erhobenen MGMT-Status ($p = 0,129$).

3.3.4 Korrelation zwischen der MGMT-Promotormethylierung und der MGMT-Expression in G1/2 pNEN

In der Theorie führt eine vermehrte Methylierung der Promotorregion von *MGMT* zu einer verminderten MGMT-Expression. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine immunhistochemische Expression von MGMT in über 30 % der Tumorzellen bei unmethylierter Promotorregion ebenso wie eine geringe oder fehlende Expression (weniger als 30 % der Tumorzellen) von MGMT bei methylierter Promotorregion als passende Wechselbeziehung eingestuft. Beispielhaft hierfür sind zwei Fälle in **Abbildung 30** dargestellt. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Methylierung im Bereich der Promotorregion von *MGMT* und der immunhistochemischen Expression (Mittelwert $12,53 \pm 8,5$ % vs. $12,07 \pm 9,49$ % methylierte Allele; $p = 0,501$ im Mann-Whitney-U-Test) (**Abbildung 31**).

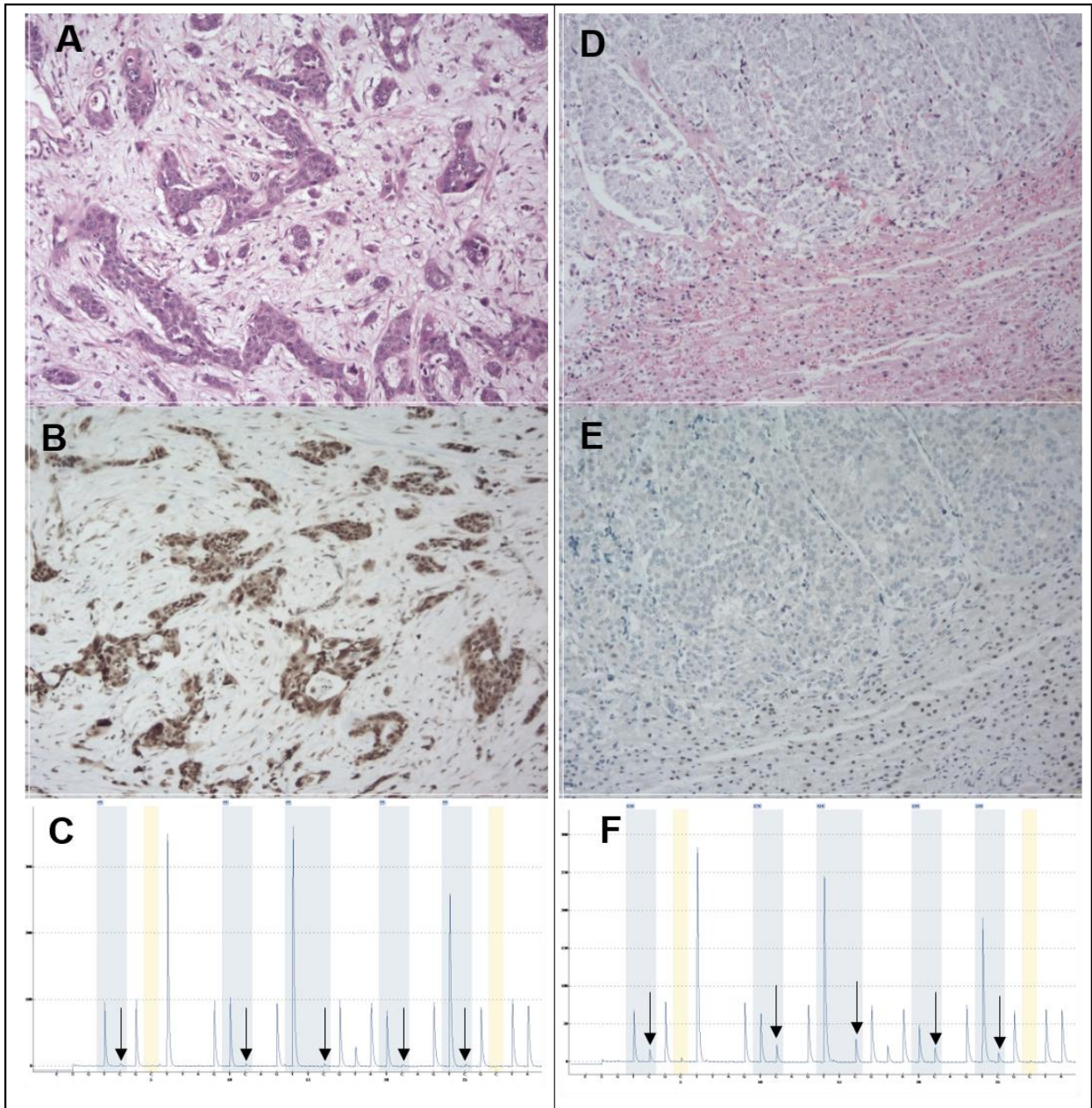


Abbildung 30. Proteinexpression von MGMT mit zugehöriger Pyrosequenzierung der MGMT-Promotorregion bei G1/2 pNEN. Bei zwei unterschiedlichen Patienten sind die jeweils erhobenen Befunde (A-C bzw. D-F) dargestellt. Bei A bzw. D ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung und bei B bzw. E die immunohistochemische Färbung von MGMT abgebildet. C bzw. F zeigen die jeweils dazugehörigen Pyrogramme der Promotormethylierungsanalyse, wobei jeweils der blaue Bereich eine CpG-Insel darstellt (insgesamt 5) und der Anteil methylierter Allele mit Pfeilen gekennzeichnet ist. In A-C sind die Befunde eines Patienten dargestellt bei dem sich immunohistochemisch (B) eine deutliche MGMT-Expression des inselartig im Bindegewebe liegenden Tumors (A) darstellt. In der Pyrosequenzierung (C) zeigte sich nur eine geringgradige Methylierung im Bereich der Promotorregion (Mittelwert 3,8 % der Allele). Bei dem anderen Patienten zeigte sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (D) eine deutliche Abgrenzung des Tumors zum Lebergewebe, wobei sich MGMT nur in den Hepatozyten anfärben ließ (E). Eine Analyse der Promotorregion zeigte einen deutlich erhöhten Anteil methylierter Allele (Mittelwert 27,2 % der Allele).

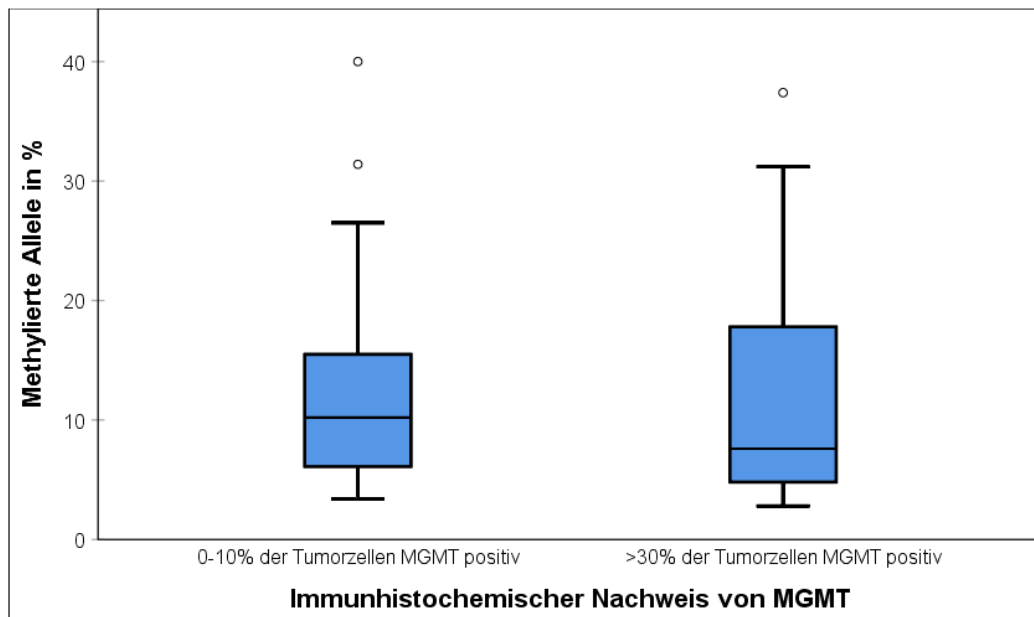


Abbildung 31. Anzahl methylierter Allele im Bereich der *MGMT*-Promotorregion in Abhängigkeit von der *MGMT*-Expression bei G1/2 pNEN. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,501$). Bei keinem Tumor lag die immunohistochemische Expression von *MGMT* bei 10-30 % der Tumorzellen.

Auch nach Dichotomisierung der Methylierungsanalysen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der *MGMT*-Expression und der *MGMT*-Promotormethylierung unabhängig von dem verwendeten Trennwert (**Abbildung 32**). Unabhängig von dem methylierungsspezifischen Trennwert zeigte sich nach erfolgter Korrelation mit dem immunohistochemischen *MGMT*-Status keine signifikante Korrelation mit den klinischen Charakteristika oder dem Gesamtüberleben (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,27 - 0,977$).

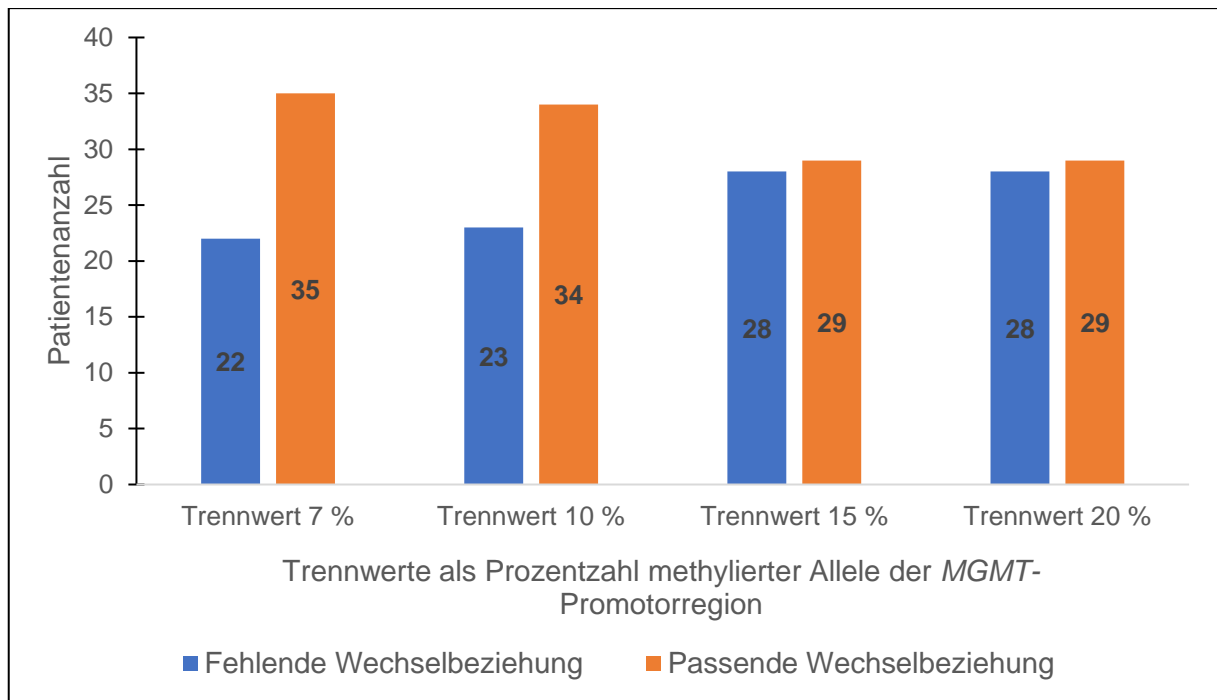


Abbildung 32. Wechselbeziehung der immunhistochemischen Expression von MGMT mit der MGMT-Promotormethylierung bei unterschiedlichen Dichotomisierungswerten bei G1/2 pNEN. Bei 57 Patienten konnte sowohl die MGMT-Expression als auch die MGMT-Promotormethylierung analysiert werden. Als passende Wechselbeziehung des erhobenen MGMT-Status wurde zum einen eine immunhistochemische Expression von MGMT in über 30 % der Tumorzellen bei unmethylierter Promotorregion, zum anderen eine fehlende immunhistochemische Expression von MGMT (0 – 10 % der Tumorzellen) bei methylierter Promotorregion gewertet. Unabhängig von dem verwendeten Trennwert konnte keine Assoziation zwischen immunhistochemisch und via Pyrosequenzierung erhobenem MGMT-Status erfolgen.

3.3.5 MGMT als prädiktiver Biomarker in G1/2 pNEN

Neun Patienten, für die der MGMT-Status erhoben werden konnte, wurden mit Temozolomid behandelt. Das mediane Patientenalter betrug 54 ± 14 Jahre. Bei allen Patienten bestand bereits zum Diagnosezeitpunkt ein fortgeschrittenes Tumorstadium. Bis auf zwei Ausnahmen hatten alle Patienten bereits zum Diagnosezeitpunkt Fernmetastasen (**Tabelle 23**).

In acht Fällen war bekannt, warum die Therapie mit Temozolomid beendet wurde. Bei einem Patienten war kein Grund des Therapieabbruchs dokumentiert. In den anderen Fällen zeigte sich innerhalb von 12 Monaten nach Therapiebeginn nur in einem Fall ein Therapieansprechen im Sinne einer stabilen Erkrankungsphase gemäß RECIST 1.1-Kriterien (**Abbildung 33**).

Im Mittel waren $9,0 \pm 4,8$ % aller Allele im Bereich der Promotorregion von MGMT methyliert. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Therapieansprechen und der Anzahl der methylierten Allele (**Abbildung 34**). Bei keinem der Patienten zeigte sich eine Methylierung in über 20 % der

Allele. Nur bei sieben Patienten konnte die immunhistochemische Expression betrachtet werden. Es zeigte sich auch hier keine Korrelation zum Therapieansprechen.

Tabelle 23. Klinische Daten der mit Temozolomid behandelten Patienten.

Kriterium	Patientenzahl	Prozentualer Anteil (%)
Geschlecht		
- Männlich	7	77,8
- Weiblich	2	22,2
Histopathologische Charakteristika		
- G1	2	22,2
- G2	7	77,8
- Hämangiainvasion	6	66,7
- Lymphangiainvasion	1	11,1
Analysiertes Gewebe		
- Pankreas	6	66,7
- Leber	3	33,3
Initiales Tumorstadium nach UICC)		
- UICC I	0	0
- UICC II	1	11,1
- UICC III	1	11,1
- UICC IV	7	77,8
Funktionalität		
- Funktionell aktiv	2	22,2
- Funktionell inaktiv	7	77,8

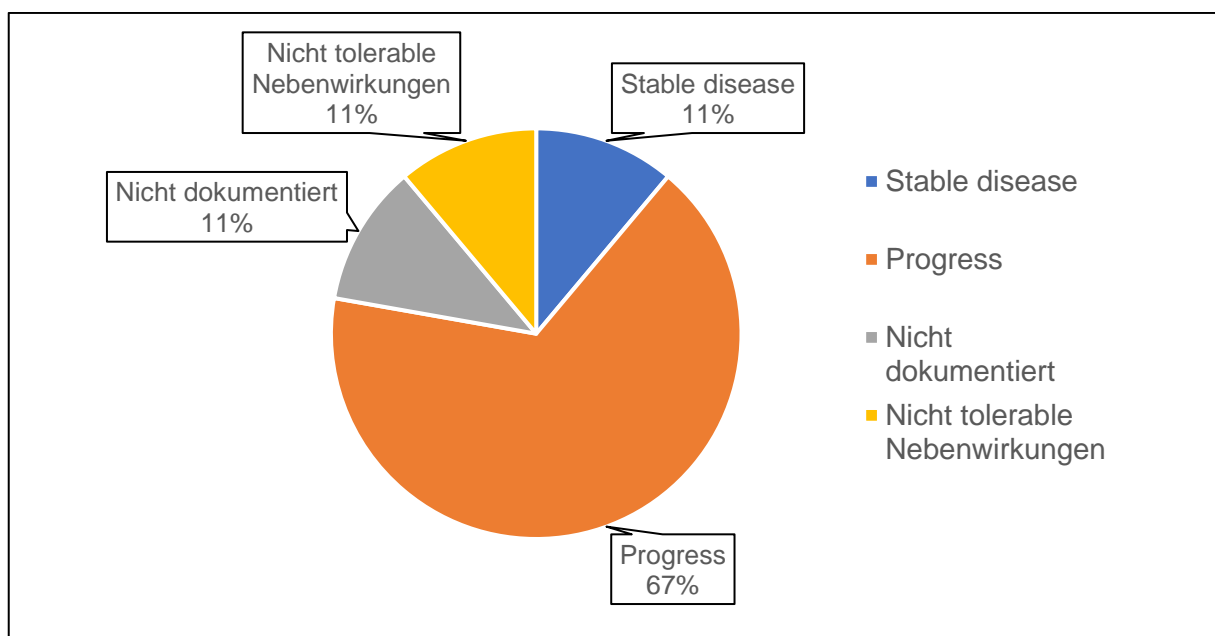


Abbildung 33. Therapieansprechen auf Temozolomid. Bei 6 Patienten zeigte sich ein Progress, bei einem Patienten nicht tolerable Nebenwirkungen unter der Therapie mit TEM. Eine stabile Erkrankungsphase konnte nur bei einem Patienten erreicht werden.

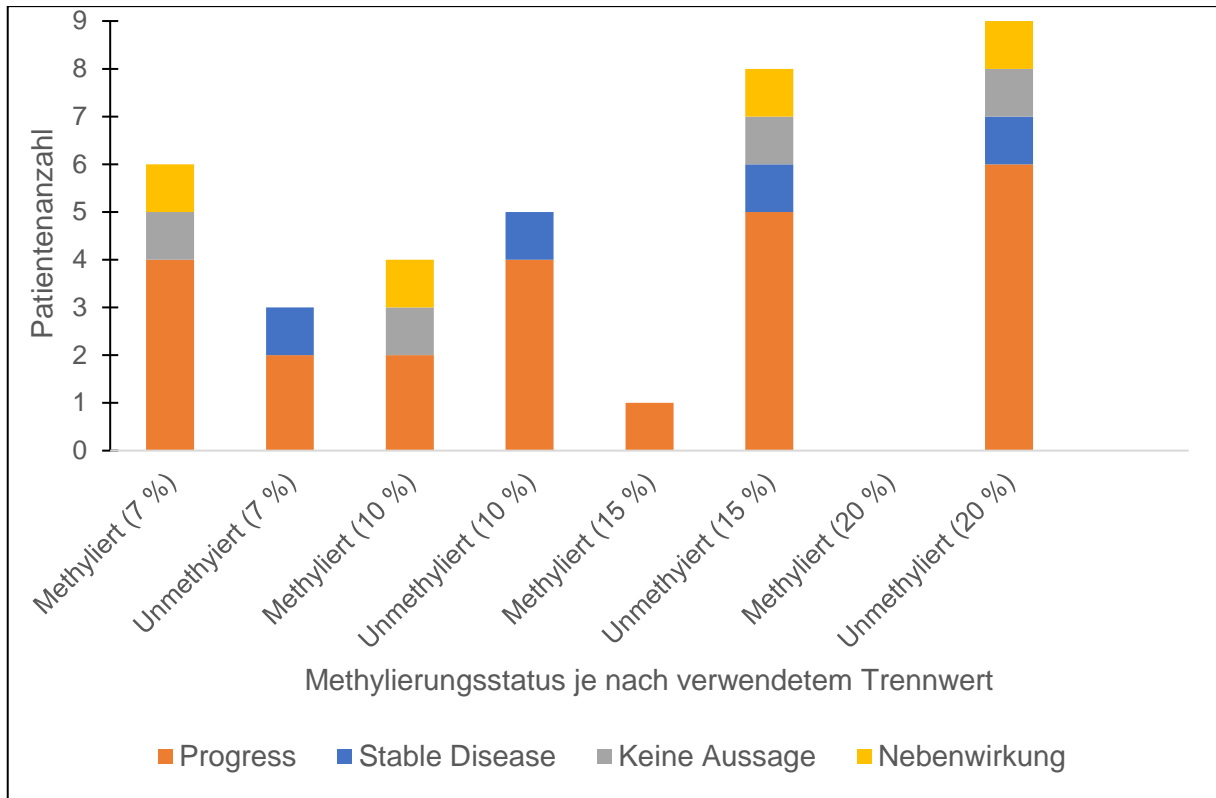


Abbildung 34. Therapieansprechen auf Temozolomid in Abhängigkeit von dem Methylierungsstatus der *MGMT*-Promotorregion bei unterschiedlichen Dichotomisierungswerten.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde bei 75 Patienten mit gut differenzierten (G1/2) pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien die mRNA-Expression von elf für den mTOR-Signalweg kodierenden Genen untersucht. Everolimus, ein mTOR-Inhibitor ist bei pNEN ein Standardtherapeutikum. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, inwiefern sich eine mögliche Dysregulation des mTOR-Signalwegs auf mRNA-Ebene bei pNEN zeigt und inwiefern die mRNA-Expression mit den klinischen Daten korreliert.

Zudem wurde in einem zu über 90 % identischen Patientenkollektiv die immunhistochemische Expression von MGMT und die Methylierung der Promotorregion des *MGMT*-Gens analysiert (n = 76). Temozolomid, ein etabliertes Chemotherapeutikum bei pNEN, zeigte bei Glioblastomen eine erhöhte Wirksamkeit bei einer Hypermethylierung der *MGMT*-Promotorregion. Insbesondere bei älteren Patienten mit Glioblastomen wird abhängig vom Grad der Promotormethylierung eine unterschiedliche Therapie angewendet (Hofer et al., 2019).

Als etablierte prognostische Marker existieren bei pNEN zum aktuellen Zeitpunkt nur das Tumorstadium und der Proliferations- oder Ki-67-Index, aus welchem sich das Grading ergibt. Bei pNEN zeigen sich allerdings sehr heterogene Krankheitsverläufe und etablierte Biomarker für eine Therapiestratifizierung fehlen bisher.

Ziel dieser Arbeit war daher eine Analyse der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene und der *MGMT*-Promotormethylierung beziehungsweise MGMT-Expression in G1/2 pNEN mit einer Korrelation zu den klinischen Daten.

4.1 Beurteilung der Methodik und Auswertung

In Zusammenarbeit mit drei weiteren ENETS-Exzellenzzentren in Bad Berka, Marburg und Oslo konnte eine erfolgreiche Analyse auf mRNA- und DNA Ebene bei 75, respektive 76 Patienten durchgeführt werden. Dies stellt für diese seltene Tumorentität eine verhältnismäßig große Fallzahl dar. Die erhobenen klinischen Daten mit Alters- und Geschlechterverteilung, sowie den prognostischen Einflussfaktoren können für diese Tumorentität als repräsentativ angesehen werden. Andere Studien, die entweder den MGMT-Status oder molekulare Analysen des mTOR-Signalwegs ausschließlich in pNEN analysierten, hatten zumeist ähnliche oder kleinere Patientenkohorten (Missiaglia et al., 2010, Jiao et al., 2011, Han et al., 2013, Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Cives et al., 2016, Raj et al., 2017, Girot et al., 2017, Henfling et al., 2018, Hijioka et al., 2019). Der Schwerpunkt dieser Arbeit wurde auf die Korrelationsanalysen der

mRNA-Expression verschiedener kodierender Gene der mTOR-Signalkaskade und des MGMT-Status mit allgemeinen klinischen Faktoren wie dem Grading, dem UICC-Stadium oder der Prognose gesetzt. Von den untersuchten Patienten erhielten insgesamt neun eine Therapie mit Temozolomid und siebzehn eine Medikation mit Everolimus, so dass die prädiktive Aussagekraft auf Grund der geringen Fallzahl limitiert ist.

Einige der Patienten erhielten bereits systemische Therapien vor Gewinnung des zur Verfügung gestellten Materials. Es ist daher zu berücksichtigen, dass genetische und epigenetische Veränderungen auf mRNA- und DNA-Ebene stattgefunden haben könnten, die sowohl die Methylierungs- und immunhistochemischen Analysen als auch das mRNA-Expressionsverhalten beeinträchtigten. Da TEM oder EVE zumeist keine Erstlinientherapien sind, ist dies unvermeidbar und analog zu anderen, in diesem Kontext relevanten, Studien (Ekeblad et al., 2007, Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Girot et al., 2017).

Durch Makrodissektion und den Ausschluss von Proben mit einem geringen Tumorzellgehalt wurde ein erhöhter Anteil an pankreatischem neuroendokrinen Tumorgewebe erzielt. Dies führte zu einer erhöhten Genauigkeit bei den Untersuchungen auf mRNA- und DNA-Ebene. Ein noch höherer Tumorzellgehalt wäre mit einer deutlichen Reduktion des Patientenkollektivs einhergegangen. Gründe für eine nicht erfolgreiche RNA- und DNA-Extraktion bzw. nachfolgende Analysen, waren insbesondere in der Gewebebeschaffenheit und Menge zu finden.

Für jede Probe erfolgte eine Doppelbestimmung der mRNA-Genexpression mittels quantitativer RT-PCR. Es zeigten sich zwischen den beiden Bestimmungen in keinem Fall große Unterschiede. Die Ergebnisdarstellung mit Hilfe der $40 - \Delta Ct$ -Methode ist ein in anderen Publikationen bereits verwendetes Verfahren (Kaemmerer et al., 2015). Hinsichtlich einer Aussagekraft als Biomarker und der Funktion eines Proteins muss jedoch zwischen der Genexpression durch mRNA-Nachweis, dem Proteinnachweis und der jeweiligen Proteinaktivität unterschieden werden. Posttranslationale Einflussfaktoren können durch die solitäre Analyse auf mRNA-Ebene nicht betrachtet werden. Durch weitergehende immunhistochemische Färbungen könnte hierbei ein zusätzlicher Informationsgewinn erzielt werden.

Die Beurteilung der MGMT-Expression ist bei einer mikroskopischen Evaluation der prozentual angefärbten Zellen mit Eingliederung in einen vorab definierten Bereich nur geringgradig subjektiv. Auf eine zu differenzierte Einteilung wurde zur Maximierung der Objektivität bewusst verzichtet. Eine Beurteilung der Farbtintensität floss nicht in die weitergehenden Analysen ein. Die Promotormethylierungsanalysen erfolgten mit Hilfe bereits etablierter Protokolle, welche auch für die klinische Diagnostik bei Glioblastomen verwendet werden. Bei pNEN existieren weder für den immunhistochemischen Nachweis von MGMT noch für die Anzahl methylierter Allele der

Promotorregion etablierte Referenzwerte oder vergleichende Analysen der verwendeten heterogenen Klassifizierungssysteme.

4.2 mRNA-Expressionsanalysen des mTOR-Signalwegs in G1/2 pNEN

In pankreatischem Normalgewebe sowie bei 75 gut differenzierten pNEN wurde die mRNA-Expression von elf für den mTOR-Signalweg kodierenden Genen (*IGF-1*, *IGFBP-3*, *PIK3CA*, *AKT-1*, *MTOR*, *MLST8*, *DEPTOR*, *RAPTOR*, *RICTOR*, *4EBP1* und *VEGF-A*) analysiert. Während einige Studien die Rolle von IGF-1, IGFBP-3, Akt-1, mTOR und VEGF-A in NEN bereits untersuchten, ist der differenzierte Einfluss der einzelnen Strukturkomponenten des mTORC1 und mTORC2 bisher relativ wenig ergründet (von Wichert et al., 2000, Maitra et al., 2003, Hansel et al., 2004, Couvelard et al., 2005, Furukawa et al., 2005, Shah et al., 2006, O'Toole et al., 2010, Ghayouri et al., 2010, Briest und Grabowski, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich für die Analyse der oben genannten kodierenden Gene entschieden, um Faktoren zu untersuchen, die am Beginn (*IGF-1*, *IGFBP-3* und *PIK3CA*), in der Mitte (*Akt-1*, *mTOR* und weitere Strukturkomponenten des mTORC1 und mTORC2) und am Ende (*4EBP1* und *VEGF-A*) des mTOR-Signalwegs wirken (**Abbildung 3** und **Abbildung 35**). Hintergrund war, die einzelnen sich unmittelbar regulierenden Schritte der Signalkaskade, möglicherweise auf mRNA-Ebene nachvollziehen zu können. Weitergehend wäre noch eine Analyse der mRNA-Expression beispielsweise von *PTEN*, *TSC1* und *TSC2* zur Komplettierung zu erwägen. Missiaglia et al. (2010) fanden im Vergleich zu pankreatischem Normalgewebe eine verminderte Expression von *PTEN* und *TSC2* bei 72 pNEN.

4.2.1 Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs in pankreatischem Normalgewebe und bei G1/2 pNEN

In dieser Arbeit zeigten sich in pankreatischem Normalgewebe und bei pNEN vielfach intergenetische, zumeist mäßig ausgeprägte, Korrelationen der mRNA-Expression der untersuchten Gene des mTOR-Signalwegs. Ein linearer Zusammenhang der mRNA-Expression der einzelnen Gene konnte bis auf die Ausnahme *MTOR* und *AKT-1* nicht festgestellt werden. Auf Grund dieser fehlenden linearen Zusammenhänge konnte hier kein, für eine Signalkaskade möglicherweise zu erwartendes, Genexpressionsverhalten identifiziert werden.

Ursächlich hierfür könnten neben posttranslationalen Mechanismen, welche mittels immunhistochemischer Untersuchungen der Proteinexpression und einem Vergleich mit der mRNA-Expression weiter untersucht werden könnten, auch weitere bereits vorbeschriebene Einflussfaktoren sein. Beispielsweise haben auf die Aktivität des mTORC1 neben

Wachstumsfaktoren auch der Energiemetabolismus (Hardie, 2007), der intrazelluläre Sauerstoffgehalt (Wouters und Koritzinsky, 2008) und Nährstoffe (Guertin und Sabatini, 2007, Laplante und Sabatini, 2009) einen Einfluss. Weiterhin existieren negative Rückkopplungsmechanismen über den PI3K-Akt-Signalweg. Vander Haar et al. (2007) führten aus, dass eine verminderte Akt-1-Aktivität, eine verstärkte Inhibition des mTORC1 durch „*proline rich Akt substrate 40 kDa*“ (PRAS40) hervorruft. Außerdem hat Deptor eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität von mTORC1 (Guertin und Sabatini, 2007). Dies mündet wiederum in einer Abschwächung des negativen Rückkopplungsmechanismus auf Akt-1 (Guertin und Sabatini, 2007). Des Weiteren haben inflammatorische Prozesse, genotoxischer Stress, der Wnt-Signalweg oder Phosphorsäuren eine regulatorische Wirkung auf mTORC1 und damit auf den mTOR-Signalweg (Laplante und Sabatini, 2009). Darüber hinaus wurden verschiedene Querverbindungen zwischen dem mTOR- und dem „*Mitogen-activated-Protein-Kinase*“- (MAPK)-Signalweg beschrieben (O'Reilly et al., 2006, Briest und Grabowski, 2014). Die Signalwege, die die Aktivität von mTORC2 beeinflussen können, sind noch nicht vollständig analysiert (Laplante und Sabatini, 2009). Auf Grund dieser Multidimensionalität der Regulation und möglicher weiterer Mechanismen ist die singuläre Betrachtung des mTOR-Signalwegs nur eingeschränkt möglich.

In dieser Arbeit hatte die mRNA-Expression von *AKT-1* und *MTOR* im pankreatischen Normalgewebe und bei pNEN die stärkste Wechselbeziehung. Bei pNEN zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der *MTOR*- und *AKT-1*-mRNA-Expression. Diese Proportionalität konnte für keines der weiteren Gene identifiziert werden. Die mRNA-Expression von *MTOR* und *AKT-1* korrelierte zwar auch mit der mRNA-Expression weiterer Gene des mTOR-Signalwegs, zumeist jedoch nur schwach.

mTOR und Akt-1 nehmen eine Schlüsselrolle im mTOR-Signalweg bei NEN ein (Laplante und Sabatini, 2009, Briest und Grabowski, 2014). mTOR ist die katalytische Untereinheit des mTORC1 und mTORC2 und damit maßgeblich für die Kinaseaktivität der beiden Komplexe verantwortlich. Akt-1 ist ein wesentlicher Regulator der Proteinbiosynthese und des Zellwachstums und -überlebens (Chen et al., 2001). Im Gegensatz zu O'Toole et al. (2010), welche eine Assoziation der Akt-1-Expression mit dem Ansprechen auf systemische Chemotherapie und auf das Überleben in GEP-NEN beschrieben, hatte eine verminderte mRNA-Expression von *AKT-1* in dieser Arbeit jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Auch in anderen Studien zu GEP-NEN konnte, analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit, keine Assoziation der Expression von Akt-1 zum Tumorstadium, Tumorgröße oder Metastasen identifiziert werden (Shah et al., 2006, Ghayouri et al., 2010). Die Expression und das Maß der Aktivierung von mTOR in GEP-NEN wurden ebenfalls in mehreren Studien untersucht. Es zeigte

sich jedoch zumeist keine Korrelation zu den klinischen Charakteristika oder der Prognose (Catena et al., 2011, Briest und Grabowski, 2014).

Zusammenfassend zeigten sich bei pNEN zwar Assoziationen zwischen der mRNA-Expression der verschiedenen kodierenden Gene des mTOR-Signalwegs, jedoch keine für eine Signalkette typischen Zusammenhänge. Guertin und Sabatini (2007) führten in ihrem Review aus, dass viele verschiedene Faktoren Einfluss auf die Regulation und Aktivität der einzelnen mTOR-Signalwegproteine haben. Außerdem wäre eine Dysregulation dieses Signalwegs bei Genmutationen der für den mTOR-Signalweg kodierenden DNA-Sequenzen im Rahmen des Tumorwachstums eine mögliche Erklärung.

Die lineare Korrelation der mRNA-Expression zwischen *MTOR* und *AKT-1* zeigt die Schlüsselrolle und die enge Verknüpfung dieser beiden Signalproteine, auch wenn sich, wie bereits in anderen Studien, keine Assoziation zu anderen klinischen Charakteristika oder dem kumulativen Überleben zeigte.

4.2.2 Unterschiede zwischen G1/2 pNEN und pankreatischem Normalgewebe hinsichtlich der mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die mRNA der für den mTORC1 kodierenden Gene, mit Ausnahme von *MTOR*, bei pNEN signifikant stärker exprimiert wurde als in pankreatischem Normalgewebe. Bei der mRNA-Expression der für die Effektorproteine VEGF-A und 4EBP1 kodierenden Gene zeigten sich ebenfalls Hinweise auf eine vermehrte Aktivität des mTOR-Signalwegs in pNEN (**Abbildung 35**).

In verschiedenen Publikationen wurde beschrieben, dass durch mTORC1 die Aktivität von 4EBP1 gehemmt wird (Nojima et al., 2003, Inoki et al., 2003, Laplante und Sabatini, 2009). Eine verminderte (RNA-)Expression von 4EBP1 könnte im Folgenden in einer reduzierten Hemmung von eIF4E resultieren, wodurch die Translation weiterer Proteine, z.B. von VEGF-A vermehrt erfolgen könnte (Pause et al., 1994, Zhong et al., 2000, Maity et al., 2000, Richter und Sonenberg, 2005, Karar und Maity, 2011). VEGF-A hat einen proangiogenetischen Effekt und ist daher wichtig für das Tumorwachstum (Inoue et al., 2002, Lammert et al., 2003, Zhang et al., 2007). Eine ergänzende Untersuchung der Proteinexpression zur Bestätigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bei pNEN sollte angestrebt werden.

Im Widerspruch zu der vermehrten Aktivität der mTOR-Signalkaskade und zu vorbeschriebenen Ergebnissen steht die geringe mRNA-Expression von *IGF-1* in pNEN in der dieser Studie (von

Wichert et al., 2000, Furukawa et al., 2005, Vitale et al., 2006, Gilbert et al., 2013, Briest und Grabowski, 2014). Auffällig ist jedoch, dass sowohl in pankreatischem Normalgewebe als auch in pNEN die mRNA-Expression des *IGF-1*-Gens im Vergleich zu anderen Genen der mTOR-Signalkaskade am geringsten war. Eine mögliche Erklärung wären andere prostimulatorische Faktoren, welche einen Einfluss auf die mTOR-Signalkaskade ausüben könnten. Unter **Kapitel 4.2.1** sind diese bereits weiter ausgeführt. Ob sich dies zudem auf die Proteinebene übertragen lässt, müsste durch Expressionsanalysen bestätigt werden. Insbesondere in Hinblick auf die, in dieser Arbeit identifizierte, hohe *IGFBP-3*-mRNA-Expression scheint die Stimulation der mTOR-Signalkaskade über IGF-1 eventuell eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Die erhöhte mRNA-Expression von *IGFBP-3* ist auf Grund seiner dualen Funktion als Tumorsuppressor und -promotor allerdings nicht eindeutig einzuordnen (Baxter, 2014).

Weiterhin fanden Jiao et al. (2011) heraus, dass 15 % der am mTOR-Signalweg beteiligten Gene bei pNEN eine Mutation aufweisen. Microarrayanalysen bei 72 pNEN zeigten außerdem, dass TSC2 und PTEN in dieser Tumorentität vermindert exprimiert werden (Missiaglia et al., 2010). Diese beiden Proteine inhibieren den mTOR-Signalweg. Dies könnte ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedliche mRNA-Expression in pNEN und pankreatischem Normalgewebe sein.

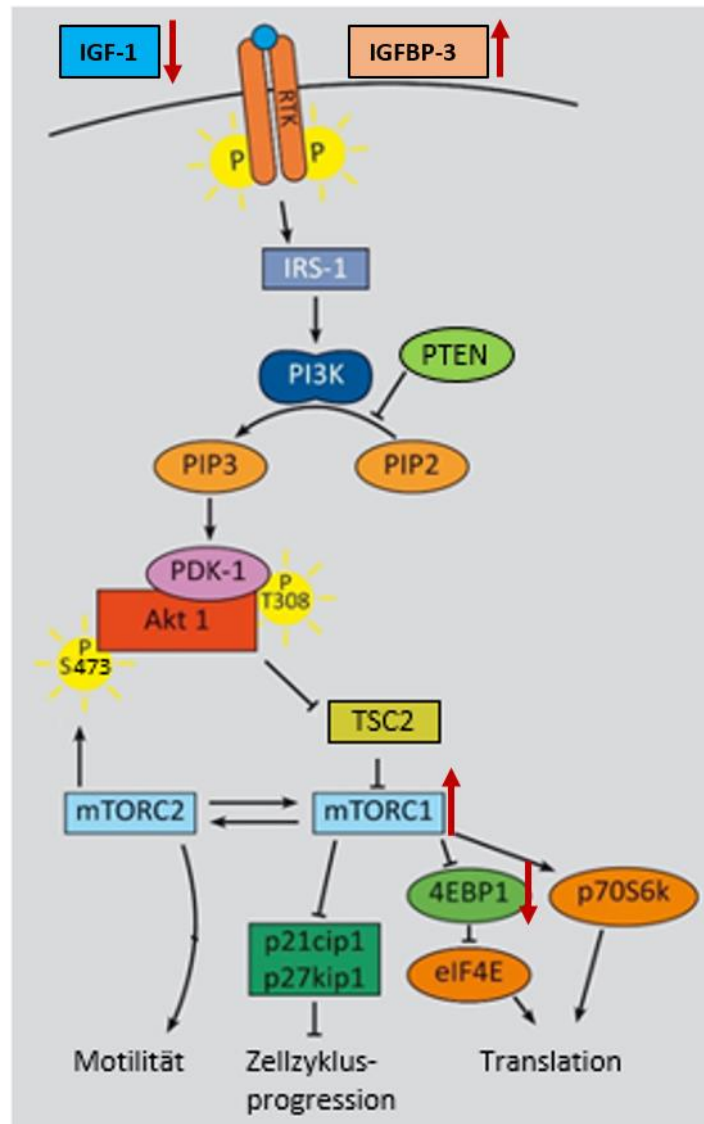


Abbildung 35. Die mRNA-Expression verschiedener für den mTOR-Signalweg kodierender Gene bei einem Vergleich zwischen G1/2 pNEN und pankreatischem Normalgewebe mit Einordnung in den PI3K/mTOR-Signalweg. Der rote Pfeil stellt die signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression der jeweiligen kodierenden Gene in G1/2 pNEN im Vergleich zu pankreatischem Normalgewebe dar. Es wurde die mRNA-Expression von *IGF-1*, *IGFBP-3*, *PIK3CA*, *AKT-1*, *MTOR*, *MLST8*, *DEPTOR*, *RAPTOR*, *RICTOR*, *4EBP1* und *VEGF-A* untersucht. Es zeigten sich auf mRNA-Ebene Hinweise auf eine stärkere Aktivierung des mTOR-Signalwegs in G1/2 pNEN. In G1/2 pNEN war die mRNA-Expression einiger Strukturkomponenten des mTORC1 erhöht und die mRNA-Expression von *4EBP1* vermindert. Für *VEGF-A* wurde eine statistisch signifikant vermehrte Expression in G1/2 pNEN nur knapp verpasst ($p = 0,066$). Modifiziert nach Briest und Grabowski, 2014.

Zusammenfassend zeigten sich signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression von pNEN und pankreatischem Normalgewebe, die auf eine vermehrte Aktivität des mTOR-Signalwegs bei pNEN hindeuten. Inwiefern sich die mRNA-Expression auch auf die tatsächliche Proteinexpression beziehungsweise Proteinaktivität übertragen lässt, müsste weiterführend, beispielsweise mit immunhistochemischen Färbungen, untersucht werden. Etwas limitiert ist die Aussagekraft jedoch auf Grund der geringen Fallzahl in der Kontrollgruppe.

4.2.3 Die mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene als prognostischer oder prädiktiver Biomarker in G1/2 pNEN

Nachdem sich in dieser Arbeit zwar Hinweise auf eine vermehrte Aktivität des mTOR-Signalwegs in pNEN auf Grundlage der mRNA-Expression der hierfür kodierenden Gene zeigten, konnte nur in Ausnahmefällen eine signifikante Korrelation mit den klinischen Charakteristika herausgestellt werden.

Bei zwei Genen (*MLST8* und *RICTOR*) zeigte sich eine verminderte mRNA-Expression bei zum Diagnosezeitpunkt metastasierten pNEN, wobei bei *MLST8* auch eine Geschlechterabhängigkeit bestand. Für *RICTOR* zeigte sich eine verminderte mRNA-Expression bei zum Diagnosezeitpunkt metastasierten pNEN, wobei sich die Expression in pankreatischem Normalgewebe und im M0-Stadium nicht signifikant unterschied.

Eine Depletion von Rictor führt zu einer verminderten Phosphorylierung von Akt S473 (Sarbasov et al., 2005). Hierdurch wird die Kinaseaktivität von Akt-1 verringert. Guertin et al. (2006) zeigten, dass dies jedoch nur einen geringen Einfluss auf den TSC2 und damit mutmaßlich auch auf mTORC1 hat. Durch die verminderte Kinaseaktivität von Akt-1 kann es jedoch durch den fehlenden inhibitorischen Effekt auf sogenannte „Forkhead-Box-Proteine O“, zu einer vermehrten Expression der Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren kommen (Guertin et al., 2006, Manning und Toker, 2017). Hierdurch wäre eine vermehrte Apoptoseinduktion, ein Zellzyklusarrest und ein vermindertes Zellwachstum zu erwarten (Briest und Grabowski, 2014, Manning und Toker, 2017). In diesem Kontext wäre entsprechend eher eine geringere mRNA-Expression von *RICTOR* bei metastasiertem Tumorleiden zu erwarten gewesen. Ob und inwiefern die mRNA-Expression von *RICTOR* jedoch tatsächlichen Einfluss auf die Aktivität von Akt-1 nimmt, ist anhand der hier durchgeführten Untersuchungen nicht zu erörtern. Es bedarf hier weitergehender Untersuchungen, ob sich bei pNEN auch auf Proteinebene eine entsprechende Korrelation zeigt.

Für *IGF-1* und *IGFBP-3* konnte bei hoher mRNA-Expression ein negativer prognostischer Einfluss beobachtet werden, auch wenn eine statistische Signifikanz verpasst wurde. Dies könnte die Vermutung erhärten, dass die hier identifizierte, verminderte mRNA-Expression von *IGF-1* in pNEN im Vergleich zur Kontrollgruppe auch methodischer Genese sein könnte (vergleiche **Kapitel 3.2.4** und **4.2.2**). In verschiedenen Studien wurde eine vermehrte Expression von IGF-1 in GEP-NENs beschrieben (von Wichert et al., 2000, Furukawa et al., 2005, Vitale et al., 2006, Gilbert et al., 2013, Briest und Grabowski, 2014). Die hier gezeigten Resultate bedürfen daher weiterer Bestätigung und Analysen. Der negativ prognostische, jedoch statistisch nicht signifikante, Einfluss einer hohen mRNA-Expression von *IGFBP-3* kann hingegen durch dessen

einerseits tumorsupprimierende Wirkung, andererseits auch den karzinogen-fördernden Effekt erklärbar sein (Baxter, 2014).

Zusammenfassend ist die mRNA-Expression der hier untersuchten für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene daher tendenziell ohne nennenswerte Assoziation zu den klinischen Charakteristika. Auch im Rahmen der Subgruppenanalyse bei den mit EVE behandelten Patienten eignete sich die mRNA-Expression der kodierenden Gene des mTOR-Signalwegs nicht als prädiktiver Biomarker.

4.3 Der MGMT-Status in G1/2 pNEN

4.3.1 Analyse der MGMT-Promotormethylierung und der MGMT-Expression in G1/2 pNEN

Eine Methylierung der Nukleinbasen Cytosin oder Guanin im Bereich von CpG-Inseln der Promotorregion führt häufig zu einer verminderten Expression des jeweiligen Gens (Jaenisch und Bird, 2003). In Glioblastomen korreliert die *MGMT*-Promotormethylierung mit dem Therapieansprechen auf TEM sowie dem Gesamtüberleben. Diese Korrelation ließ sich jedoch nicht auf die MGMT-Expression transferieren (Hegi et al., 2005, Christians et al., 2012, Hofer et al., 2019).

Bei pNEN existieren bislang nur limitierte Daten zur Relevanz von MGMT, obwohl TEM eine etablierte Therapieoption ist (Rinke et al., 2018). Die hier analysierte Kohorte stellt mit 76 Patienten, bei denen die Promotormethylierung des *MGMT*-Gens, respektive 57 Patienten, bei denen die MGMT-Proteinexpression mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht wurde, für diese seltene Tumorentität unter Berücksichtigung von ausschließlich G1/2-differenzierten pNEN eine große Fallzahl dar.

In dieser Arbeit zeigte sich in 44 % der Fälle keine MGMT-Proteinexpression. In 6 von 57 auswertbaren Fällen zeigte sich eine geringgradige, in 46 % eine deutliche Expression von MGMT. Dies liegt in dem vorbeschriebenen Intervall anderer Studien, welche einen Verlust der MGMT-Expression bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien zwischen 16 – 66 % angeben (Ekeblad et al., 2007, Kulke et al., 2009, Gilbert et al., 2013, Schmitt et al., 2014, Yang et al., 2014, Walter et al., 2015, Cives et al., 2016, Raj et al., 2017, Krug et al., 2017, Owen et al., 2017). Bei den verschiedenen Studien wurde jedoch kein einheitliches Quantifizierungssystem verwendet. In dieser Arbeit wurde nur der prozentuale Anteil der MGMT-exprimierenden Tumorzellen beurteilt. Durch Vermeidung einer Beurteilung der Färbeintensität, kann das hier angewandte System als relativ untersucherunabhängig angesehen werden.

Es zeigte sich, abhängig von dem verwendeten Trennwert, eine Hypermethylierung im Bereich der Promotorregion des *MGMT*-Gens in 18,4 - 63,2 % der Fälle. In anderen Studien ist eine Hypermethylierung bei 14 – 56 % der pNEN beschrieben, so dass sich eine weitestgehende Übereinstimmung mit der Literatur ergibt (Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Girot et al., 2017, Raj et al., 2017, Campana et al., 2018). Die marginal höhere Methylierungsrate, die sich bei einer Dichotomisierung bei sieben Prozent methylierter Allele ergab, ist am ehesten auf methodische Unterschiede zurückzuführen. In dieser Arbeit wurden fünf CpG-Inseln via Pyrosequenzierung analysiert, wohingegen in anderen Studien entweder eine methylspezifische PCR oder nur vier CpG-Inseln analysiert wurden (Schmitt et al., 2014, Cros et al., 2016, Raj et al., 2017, Girot et al., 2017, Campana et al., 2018).

In keiner der bisherigen Studien wurde eine Evaluation der *MGMT*-Promotormethylierung bei unterschiedlichen Trennwerten vorgenommen. Zumeist wurde sich auf die bei Glioblastomen verwendete Trennwerte berufen, wobei auch hier unterschiedliche Daten existieren (Quillien et al., 2012, Brigladori et al., 2016, Yuan et al., 2017, Radke et al., 2019). Auf Grund unterschiedlicher Referenzwerte und verwendeter Methoden ist die Vergleichbarkeit daher limitiert. Bisher existiert kein etablierter Referenz- oder Grenzwert für die Anzahl der methylierten Allele im Bereich der Promotorregion bei pNEN.

Ebenso wie in der Mehrzahl der bisherigen Studien bei pNEN korrelierte die Promotormethylierung nicht mit der *MGMT*-Expression (Schmitt et al., 2014, Girot et al., 2017, Raj et al., 2017). Demgegenüber steht die Studie von Walter et al. (2015), die bei NEN bei einer Hypermethylierung eine signifikant verminderte *MGMT*-Expression demonstrierten. Bei Cros et al. (2016) konnten für pNEN analoge Tendenzen zu Walter et al. gefunden werden, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die Gründe für die Diskrepanz zwischen der *MGMT*-Expression und der *MGMT*-Promotormethylierung könnten zum einen an der Methodik, zum anderen an weiteren regulatorischen Mechanismen liegen.

Die Frage der optimalen Methode zur Identifizierung einer klinisch relevanten An- oder Abwesenheit von *MGMT* ist noch nicht abschließend beantwortet (Lattanzio et al., 2015, Switzeny et al., 2016). Kishida et al. (2012) zeigten bei Glioblastomen, dass durch die Methylierung der Promotorregion von *MGMT* via Pyrosequenzierung die enzymatische Aktivität von *MGMT* repräsentiert wird. Wang et al. (2017) verglichen bei Glioblastomen die Erhebung des *MGMT*-Status durch Immunhistochemie, Pyrosequenzierung und quantitative methyl-spezifische PCR. Die Pyrosequenzierung wurde im Rahmen dieser Untersuchungen als Goldstandard angesehen. Hierbei zeigte sich eine Sensitivität in den immunhistochemischen Beurteilungen von 84,4 % und eine Spezifität von 45,7 %, wobei die Übereinstimmungsrate zwischen der Pyrosequenzierung

und der immunhistochemischen Expression nur mit 30,8 % angegeben wurde. Eine Kombination der Immunhistochemie mit der quantitativen methyl-spezifischen PCR-Analyse erzielte eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität (99,5 % respektive 93,9 %).

Neben methodischen Problemen könnten auch andere weitergehende (post-)transkriptionelle Mechanismen die fehlende statistische Korrelation zwischen dem immunhistochemischen und pyrosequenzierungstechnischen MGMT-Status erklären. In Tumor-Zelllinien zeigte sich eine Regulation der MGMT-Expression durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie dem Spezifitätsprotein 1 (Sp1), dem „*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*“ (NF-Kappa B), den „*CCAAT-Enhancer-Binding-Proteinen*“ (CEBP), dem Aktivator-Protein-1 (AP-1) und dem Hypoxie-induzierenden Faktor 1 (Boldogh et al., 1998, Bhakat und Mitra, 2000, Lavon et al., 2007, Bocangel et al., 2009, Pistollato et al., 2010). Bocangel et al. (2009) zeigten, dass das Tumorsuppressorprotein p53 die MGMT-Expression durch Sequestrierung von Sp1 reduziert. Darüber hinaus ist die MGMT-Expression durch Acetylierung und Methylierung von Histonen reguliert (Nakagawachi et al., 2003, Zhao et al., 2005). Weiterhin können sogenannte Mikro-RNAs, kleine nichtkodierende RNA-Sequenzen, ebenfalls die Genexpression von *MGMT* supprimieren (Filipowicz et al., 2005, Sontheimer und Carthew, 2005). Bei Glioblastomen konnte in mehreren Studien eine inverse Korrelation zwischen der MGMT-Expression und verschiedenen Mikro-RNAs dargestellt werden (Ramakrishnan et al., 2011, Zhang et al., 2012, Kushwaha et al., 2014, Cabrini et al., 2015, Jesionek-Kupnicka et al., 2019). Weiterhin identifizierten Chen et al. (2018) in Glioblastom-Zelllinien einen Enhancer, ein Genabschnitt zwischen der Promotorregion von *Ki-67* und *MGMT*, welcher die Expression von MGMT auch bei Hypermethylierung der Promotorregion verstärkt. Clark und Melki (2002) stellten darüber hinaus die Hypothese auf, dass die Methylierung der Promotorregion nicht der Ursprung, sondern das Resultat von verminderter Genexpression ist.

Zusammenfassend sind die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse der Pyrosequenzierung und Immunhistochemie daher sowohl auf der methodischen als auch regulatorischen Ebene zu finden. Aktuell sind für pNEN nur limitierte Daten diesbezüglich vorhanden. Die bisherigen Studienergebnisse weisen jedoch tendenziell darauf hin, dass sich aus der *MGMT*-Promotormethylierung keine Rückschlüsse auf die MGMT-Proteinexpression ziehen lassen. Für Glioblastome gilt die Analyse des Grades der Promotormethylierung als bevorzugte Methode um den MGMT-Status zu klassifizieren.

4.3.2 MGMT als prognostischer und prädiktiver Marker

In der vorliegenden Arbeit korrelierte weder die Expression von MGMT noch die Anzahl der methylierten Allele der entsprechenden Promotorregion unabhängig von dem verwendeten Trennwert bei der Pyrosequenzierung mit den etablierten prognostischen Faktoren wie dem Grading und dem UICC-Stadium. Weiterhin zeigte sich keine signifikante Korrelation zu weiteren klinischen Charakteristika, wie dem Geschlecht, dem Erkrankungsalter, sowie der Lymph- oder Hämangiainvasion. Prognostisch hatte ebenfalls weder die MGMT-Expression noch die Methylierung im Bereich der Promotorregion des *MGMT*-Gens eine signifikante Relevanz.

Dies stimmt mit den Ergebnissen verschiedener Studien überein, in denen der MGMT-Status ebenfalls keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben vom Diagnosezeitpunkt aus hatte (Yang et al., 2014, Walter et al., 2015, Cives et al., 2016). In mehreren Studien wurde jedoch nur die Expression von MGMT, nicht jedoch die Methylierung im Bereich der Promotorregion untersucht (Yang et al., 2014, Cives et al., 2016). Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien bei NEN handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um ein verhältnismäßig homogenes Patientenkollektiv, da nur gut differenzierte neuroendokrine Neoplasien mit pankreatischem Ursprung untersucht wurden. Die meisten größeren Studien, die MGMT als prognostischen oder prädiktiven Biomarker untersuchten, schlossen NEN mit unterschiedlichem Primarius ein (Yang et al., 2014, Walter et al., 2015). Darüber hinaus wurden in diesen Studien auch Tumore mit einem Proliferationsindex über 20 % inkludiert (Yang et al., 2014, Walter et al., 2015). Auf Grund ihrer biologischen Besonderheiten nehmen NEN mit einem hohen Proliferationsindex jedoch eine Sonderrolle ein (Rinke et al., 2018).

Im Gegensatz hierzu demonstrierten Schmitt et al. (2014), dass ein Verlust der Proteinexpression von MGMT in NEN mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Diese Beobachtungen waren in einer multivariaten Analyse jedoch abhängig von den etablierten prognosebeeinflussenden Faktoren wie Tumorstadium und Grading. Für die Promotormethylierung zeigten sich allerdings ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit (Schmitt et al., 2014).

Darüber hinaus wurde in verschiedenen Studien auch die prädiktive Bedeutung von MGMT auf das Therapieansprechen mit Alkylanzien bei (pankreatischen) NEN untersucht (Ekeblad et al., 2007, Kulke et al., 2009, Schmitt et al., 2014, Dussol et al., 2015, Walter et al., 2015, Cives et al., 2016, Cros et al., 2016, Girot et al., 2017, Krug et al., 2017, Owen et al., 2017, Raj et al., 2017, Campana et al., 2018, Hijioka et al., 2019). In der aktuellen Arbeit zeigte sich bei einer nur sehr geringen Fallzahl kein Hinweis darauf, dass anhand des MGMT-Status, weder durch eine Beurteilung der Immunhistochemie noch via Pyrosequenzierung, das Therapieansprechen auf TEM bei pNEN vorhergesagt werden kann. Auch andere retrospektive kleinere (Ekeblad et al.,

2007) und größere Studien mit bis zu 52 Patienten (Cives et al., 2016, Raj et al., 2017, Girot et al., 2017) bei pNEN kamen zu denselben Schlüssen. Auch die Studie von Krug et al. (2017) kam, trotz Inklusion von fortgeschrittenen neuroendokrinen Neoplasien mit unterschiedlichem Primarius, zu einem ähnlichen Ergebnis. Die verwendeten Methoden zur Untersuchung des MGMT-Status variierten allerdings. Teilweise wurde ausschließlich die MGMT-Expression (Ekeblad et al., 2007, Cives et al., 2016, Krug et al., 2017) oder nur die Methylierung der Promotorregion mittels Pyrosequenzierung oder methylspezifischer PCR ermittelt. In anderen Publikationen wurden sowohl die Methylierung der Promotorregion und simultan die Proteinexpression untersucht (Raj et al., 2017, Girot et al., 2017).

Andere Arbeitsgruppen konnten im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit einen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf Alkylanzien und dem MGMT-Status bei NEN aufzeigen. Owen et al. (2017) publizierten, dass sich bei einer geringen Expression von MGMT bessere Ansprechraten auf die Kombinationstherapie Capecitabine/ TEM bei 38 NEN zeigten. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht und die MGMT-Expression nur bei 20 Patienten untersucht. Schmitt et al. (2014) zeigten in einer kleinen Fallserie mit 10 pNEN, dass die Promotormethylierung, welche mittels methylspezifischer PCR untersucht wurde, signifikant mit dem Ansprechen auf TEM korreliert. Auf Grund der geringen Fallzahl kann es sich hierbei jedoch um eine Stichprobenverzerrung handeln. Auch die unterschiedliche Methodik zur Untersuchung der Promotormethylierung könnte die Unterschiede im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit erklären. Interessanterweise ließ sich in derselben Studie kein unterschiedliches Therapieansprechen in Abhängigkeit von der MGMT-Expression feststellen (Schmitt et al., 2014).

Kulke et al. (2009) zeigten in einer kleinen Fallserie, dass das Ansprechen auf TEM signifikant schlechter war, wenn eine vermehrte Expression von MGMT vorlag. Der Bezug zu dieser Arbeit ist eingeschränkt, da nur acht der NEN pankreatischen Ursprungs waren. Bei fünf von acht pNEN war eine fehlende MGMT-Expression festzustellen. Die weiteren 13 nicht-pankreatischen NEN exprimierten MGMT. Eine Analyse isoliert für die pNEN erfolgte nicht. Auch zu weiteren klinischen Charakteristika wurde kein Bezug genommen. Auf Grund des kleinen und heterogenen Kollektivs ist die Aussagekraft daher eingeschränkt. Eine weitere kleine Studie bei 13 pNEN lieferte ähnliche Resultate (Hijioka et al., 2019). Die Methylierung im Bereich der Promotorregion des *MGMT*-Gens wurde weder von Kulke et al. (2009) noch Hijioka et al. (2019) untersucht.

Walter et al. (2015) fanden sowohl bei niedriger MGMT-Proteinexpression als auch bei *MGMT*-Promotormethylierung ein längeres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben ab dem Zeitpunkt einer Therapie mit Alkylanzien. Die Promotormethylierung wurde, analog der vorliegenden Arbeit, durch Pyrosequenzierung analysiert. Bei der Untersuchung der Promotormethylierung durch methylspezifische PCR bestätigte sich der prädiktive Einfluss jedoch

nicht (Walter et al., 2015). Dies bekräftigt erneut die Abhängigkeit der Aussagekraft des MGMT-Status von der verwendeten Methodik. Der im Vergleich zu dieser Arbeit unterschiedliche prognostische und prädiktive Einfluss des MGMT-Status könnte außerdem auch in den unterschiedlichen Kollektiven begründet sein. So hatten in der Studie von Walter et al. (2015) nur 63,4 % der NEN einen pankreatischen Primarius. Durch die Ergebnisse der Studie von Dussol et al. (2015), kann die Relevanz der unterschiedlichen Patientenkollektive untermauert werden. Bei 42 GEP-NEN, 13 davon pNEN, zeigte sich im Rahmen von Pyrosequenzierungsanalysen ein signifikant besseres Therapieansprechen auf Alkylanzien bei einer Hypermethylierung der *MGMT*-Promotorregion in GEP-NEN. Diese signifikanten Unterschiede konnten jedoch nicht auf die Subgruppe der pNEN übertragen werden (Dussol et al., 2015).

Cros et al. (2016) untersuchten später gezielt bei 43 mit TEM-behandelten Patienten mit gut differenzierten pNEN die MGMT-Expression und die Methylierung der Promotorregion von *MGMT* durch Pyrosequenzierung. Die Promotormethylierung wurde im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit nur bei vier anstelle von fünf CpG-Inseln und lediglich bei 29 Patienten analysiert. Chai et al. (2019) zeigten, dass bei Glioblastomen vier CpG-Inseln zur Beurteilung des Methylierungsstatus ausreichen. Bei pNEN existieren hierzu jedoch keine spezifischen Daten. Grundsätzlich ist vorstellbar, dass eine Betrachtung mehrerer CpG-Inseln die Fehlerwahrscheinlichkeit reduziert. Darüber hinaus wurde durch ein komplexes Punktesystem, bei dem die Intensität der Anfärbbarkeit (zwischen 0-3) mit der prozentual angefärbten Tumorzellzahl multipliziert wurde, die MGMT-Expression beurteilt (Cros et al., 2016). Entsprechend zeigte sich eine große Spannweite der immunhistochemischen Ergebnisse. In Anbetracht der vielen negativen Publikationen hinsichtlich der prädiktiven Bedeutung von MGMT und des komplizierten Punktesystems wäre eine zweite bestätigende Publikation, welche diese Ergebnisse mit dem dort verwendeten System reproduziert, wünschenswert. Bei den 29 Patienten, bei denen die *MGMT*-Promotormethylierung untersucht wurde, zeigte sich ein längeres progressionsfreies Überleben. Der Zusammenhang des MGMT-Status mit dem Gesamtüberleben, welcher in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, wurde von Cros et al. nicht berichtet. Ob sich das verlängerte progressionsfreie Überleben auch auf ein verlängertes Gesamtüberleben überträgt, bleibt daher unklar. Grundsätzlich wären jedoch ähnliche Studien mit entsprechend homogenen Patientenkollektiven bei NEN wünschenswert.

Campana et al. (2018) zeigten bei 95 NEN, hiervon 43 pNEN, dass bei einer methylierten *MGMT*-Promotorregion ein besseres Therapieansprechen auf TEM zu erwarten ist. In dieser Studie wurden jedoch auch NEN mit einem Ki-67-Proliferationsindex von über 20 % eingeschlossen, so dass das Kollektiv nicht nur auf Grund der unterschiedlichen Tumorprimaria heterogen ist. Bei Campana et al. (2018) konnte zudem im Gegensatz zu der vorliegenden Dissertationsarbeit ein längeres Gesamtüberleben bei Patienten mit methylierter *MGMT*-

Promotorregion festgestellt werden. Die prädiktive Relevanz der Immunhistochemie, die Cros et al. (2016) noch herausstellten, wurde von Campana et al. (2018) nicht untersucht.

In einer aktuellen Metaanalyse von Qi und Tan (2020) wurden verschiedene Studien, die den Zusammenhang zwischen dem MGMT-Status und dem Ansprechen auf Alkylanzien bei NEN beschrieben, zusammengefasst. Grundlage waren insgesamt elf der zuvor bereits weitestgehend erwähnten und beschriebenen Studien. Die Studien von Ekeblad et al. (2007), Yang et al. (2014), Schmitt et al. (2014) und Girot et al. (2017) wurden jedoch nicht berücksichtigt. Dafür wurde eine Studie zu schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinomen miteingeschlossen (Welin et al., 2011). Nach aktueller Leitlinie sollten diese Tumorentitäten jedoch auf Grund des heterogenen Verhaltens getrennt voneinander betrachtet werden (Rinke et al., 2018).

Qi und Tan (2020) kamen auf Grundlage der elf verschiedenen retrospektiven Studien zu dem Ergebnis, dass Patienten mit NEN bei niedriger Expression von MGMT oder einer Hypermethylierung im Bereich der *MGMT*-Promotorregion eine erhöhte Ansprechrate auf Alkylanzien hätten und MGMT daher als prädiktiver Biomarker herangezogen werden könnte. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Neben den Unterschieden in der Tumorentität ist zudem der häufig heterogene Krankheitsverlauf bei NEN zu berücksichtigen. Im Rahmen einer genaueren Betrachtung der Metaanalyse zeigt sich, dass nur drei der elf Studien die Pyrosequenzierung als Methode zur Determinierung der Promotormethylierung nutzten (Walter et al., 2015, Campana et al., 2018, Dussol et al., 2015). Zwei weitere Studien untersuchten die Promotormethylierung mit Hilfe der methylspezifischen PCR (Welin et al., 2011, Raj et al., 2017). Die weiteren Studien analysierten insbesondere die MGMT-Expression (Kulke et al., 2009, Cros et al., 2016, Cives et al., 2016, Krug et al., 2017, Owen et al., 2017, Hijioka et al., 2019).

Eine Goldstandardmethode zur Evaluation des MGMT-Status ist bei pNEN noch nicht definiert. Insbesondere immunhistochemische Untersuchungen können jedoch sehr untersucherabhängig sein. Die Aussagekraft der Metaanalyse ist dahingehend durch die unterschiedlichen Methoden und die heterogenen Beurteilungskriterien der Primärstudien weiter limitiert.

Durch die Vielzahl an Studien ohne Beschränkung auf einen Primarius war die Patientenzahl für diese seltene Tumorentität in der Metaanalyse groß ($n = 382$). Es erfolgte allerdings keine differenzierte Beurteilung der verschiedenen NEN abhängig vom Primarius. Zudem wurden einige der oben genannten Studien nicht berücksichtigt, dafür eine Studie zu neuroendokrinen Karzinomen (Welin et al., 2011). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die prädiktive Bedeutung des MGMT-Status beurteilt.

Auffallend ist außerdem, dass bei individueller Betrachtung der einzelnen Studienergebnisse nur 54,5 % der Primärpublikationen (Kulke et al., 2009, Dussol et al., 2015, Cros et al., 2016,

Campana et al., 2018, Hijioka et al., 2019) eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem MGMT-Status und dem Ansprechen auf Alkylanzien aufweisen, wohingegen drei Studien (Cives et al., 2016, Raj et al., 2017, Krug et al., 2017) dieser Meinung widersprechen. Bei den verbleibenden in der Metaanalyse inkludierten Studien zeigten sich zwar Trends, eine signifikante Korrelation konnte jedoch nicht beschrieben werden (Welin et al., 2011, Owen et al., 2017). Die oben erwähnten nicht inkludierten Publikationen zeigten wiederum ausnahmslos kein statistisch signifikant unterschiedliches Therapieansprechen auf Alkylanzien in Abhängigkeit vom MGMT-Status (Ekeblad et al., 2007, Schmitt et al., 2014).

Die größte Tumorerogenität hinsichtlich des Primarius weisen außerdem die beiden größten Studien auf, die MGMT als prädiktiven Biomarker empfehlen (Walter et al., 2015, Campana et al., 2018). Demgegenüber bestanden die Studien, die keinen prädiktiven Wert des MGMT-Status herausstellten, nahezu komplett aus Patientenkollektiven mit pNEN (Cives et al., 2016, Raj et al., 2017, Krug et al., 2017).

Da die vorliegende Arbeit ausschließlich G1/2-differenzierte pNEN einschloss, ist das Ergebnis gut mit der vorliegenden Literatur in Einklang zu bringen. Möglich wäre, dass sich MGMT als Biomarker für NEN, nicht jedoch für NEN mit pankreatischem Primarius eignet. Einschränkend ist jedoch, dass es sich bei der vorliegenden Dissertationsarbeit primär um prognostische und nicht um prädiktive Einschätzungen handelt.

Die Autoren der Metaanalyse schlussfolgerten, dass der MGMT-Status als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf Alkylanzien bei NEN verwendet werden könnte (Qi und Tan, 2020). Eine Einschätzung der adäquaten Methodik hierfür wurde jedoch nicht abgegeben. Man sollte diesbezüglich allerdings, insbesondere in Anbetracht der unter **Kapitel 4.3.1** aufgeführten Gesichtspunkte, vorsichtig sein. Auf Grund der limitierten Datenlage, der unterschiedlichen Methoden, die zur Erhebung des MGMT-Status herangezogen wurden und der heterogenen Tumorentität, wäre der Zeitpunkt für eine abschließende Beurteilung zu früh gewählt.

Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass bisher ausschließlich retrospektive Studien, die den MGMT-Status als prädiktiven oder prognostischen Marker untersuchten, durchgeführt wurden. Auf Grund der oftmals geringen Fallzahlen in den Studien ist eine Stichprobenverzerrung möglich. Es existieren bisher keine prospektiven Studien, die diese Einschätzung untermauern. Mit Spannung sind daher die Ergebnisse der prospektiven Studie von Lemelin et al. (2019) zu erwarten.

4.4 Mögliche Therapiestratifizierung anhand der mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene und der MGMT-Promotormethylierung

In den Kapiteln des Ergebnisteils wurde die mRNA-Expression elf verschiedener Mitglieder des mTOR-Signalwegs, sowie die Promotormethylierung des *MGMT*-Gens und die Expression von *MGMT* mit der entsprechenden Korrelation zu den klinischen Daten beschrieben.

Ein Ziel der Arbeit war, auf Grundlage der laborexperimentellen Ergebnisse, eine Therapiestratifizierung zwischen TEM und EVE für eine weitergehende prospektive Studie zu ermöglichen. Obwohl die erhobenen Daten mit den klinischen Charakteristika nur in Ausnahmefällen korrelierten, wäre für eine weitergehende prospektive Studie die Fallzahl interessant, für die - gemäß theoretischer Überlegungen - ein Therapieansprechen auf TEM oder EVE wahrscheinlich wäre.

In pNEN zeigte lediglich die mRNA-Expression von *AKT-1* und *MTOR* eine ausgeprägte lineare Korrelation zueinander. In Anbetracht der fehlenden Korrelation zu den klinischen Daten und dem Wirkmechanismus von EVE als mTOR-Inhibitor würde sich daher am ehesten die mRNA-Expression dieser beiden Gene für eine mögliche Therapiestratifizierung eignen. Entsprechend wäre bei Patienten mit einer hohen mRNA-Expression von *MTOR* und *AKT-1* dann eine antineoplastische Wirkung von EVE zu erwarten.

Für TEM war bei dem untersuchten Patientenkollektiv weder ein eindeutiger optimaler Trennwert bei der Promotormethylierung des *MGMT*-Gens zur Dichotomisierung auszumachen, noch zeigte die *MGMT*-Expression einen Hinweis darauf, der Promotormethylierung bezüglich der Assoziation zu weiteren klinischen Charakteristika überlegen zu sein. Einschränkend muss man jedoch berücksichtigen, dass es sich lediglich um prognostische Abschätzungen handelt. Auf Grund der wenigen mit TEM behandelten Patienten ist die prädiktive Aussagekraft begrenzt. Für eine Therapie mit TEM kämen aus theoretischen Überlegungen diejenigen Patienten in Frage, bei denen die *MGMT*- Promotorregion hypermethyliert ist. In Anbetracht des in anderen Studien zumeist verwendeten Trennwertes von 7 bzw. 8% methylierter Allele empfiehlt sich daher am ehesten die Nutzung eines ähnlichen Trennwertes (Cros et al., 2016, Walter et al., 2015, Campana et al., 2018).

Bei einer anzunehmenden vermehrten Signaltransduktion der mTOR-Signalkaskade bei einer mRNA-Expression oberhalb der 75. Perzentile für *MTOR* ($40 - \Delta \text{Ct-Wert} = 38,575$) und *AKT-1* ($40 - \Delta \text{Ct-Wert} = 38,225$) kämen acht von 70 Patienten (= 11,4 %) für eine Therapie mit EVE in Betracht (**Abbildung 36**). Von diesen acht Patienten würden je nach verwendetem Trennwert 50 – 75 % auch für eine Therapie mit TEM in Frage kommen. Für eine alleinige Therapie mit TEM ohne EVE als weitere Therapieoption könnten zwischen 12,9 - 52,9 % der Patienten zur Auswahl

stehen. 35,7 - 75,7 % der Patienten wären für keine der beiden Therapieoptionen geeignet (**Abbildung 36**).

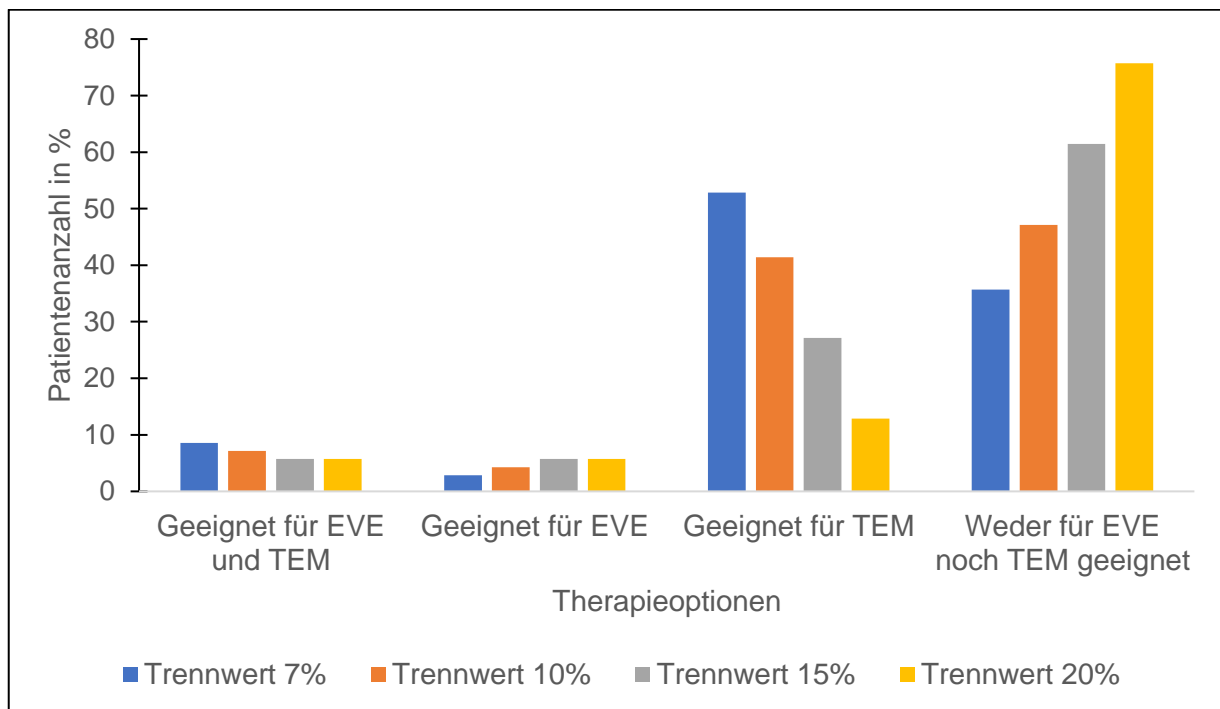


Abbildung 36. Geeignete Patienten für die Therapieoptionen EVE oder TEM bei einer unterschiedlichen Anzahl methylierter Allele der *MGMT*-Promotorregion bei einer mRNA-Expression von *MTOR* und *AKT-1* oberhalb der 75. Perzentile bei G1/2 pNEN. Der $40 - \Delta Ct$ -Wert der 75. Perzentile in pNEN für *MTOR* betrug 38,575 und für *AKT-1* 38,225. Je nach verwendetem Trennwert zur Dichotomisierung zwischen methylierter und nicht methylierter Promotorregion ergibt sich eine unterschiedliche Patientenzahl, die für eine Therapie mit TEM geeignet wäre.

Sofern man für die Therapieoption EVE eine mRNA-Expression von *MTOR* ($40 - \Delta Ct$ -Wert = 38,01) und *AKT-1* ($40 - \Delta Ct$ -Wert = 37,64) oberhalb des ermittelten Medians als Einschlusskriterium nutzen würde, würde sich der Anzahl der mit EVE-behandelbaren Patienten auf 30 % erhöhen. Für 31,4 - 62,9 % der Patienten käme dann keine der beiden Therapieoptionen in Frage (**Abbildung 37**).

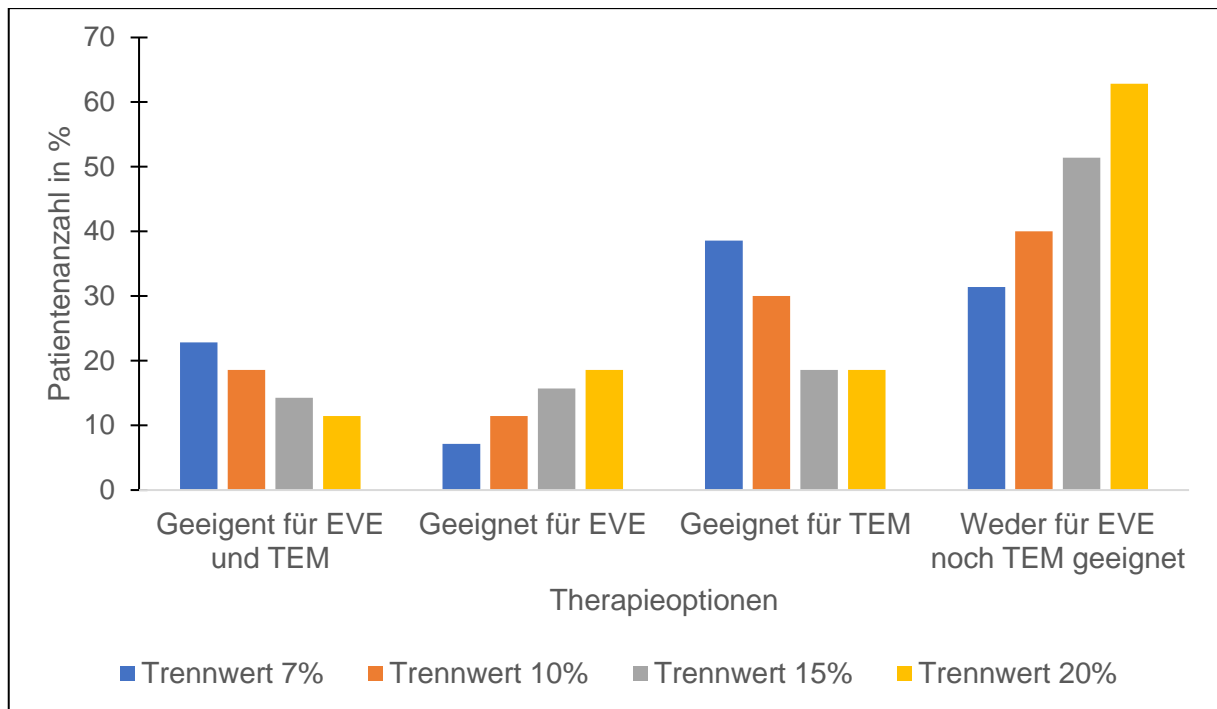


Abbildung 37. Geeignete Patienten für die Therapieoptionen EVE oder TEM bei einer unterschiedlichen Anzahl methylierter Allele der *MGMT*-Promotorregion bei einer mRNA-Expression von *MTOR* und *AKT-1* oberhalb des Medians bei G1/2 pNEN. Der $40 - \Delta$ Ct-Wert des Medians in pNEN für *MTOR* betrug 38,01 und für *AKT-1* 37,64. Je nach verwendetem Trennwert zur Dichotomisierung zwischen methylierter und nicht methylierter Promotorregion ergibt sich eine unterschiedliche Patientenzahl, die für eine Therapie mit TEM geeignet wäre.

Von den 70 Patienten, bei denen sowohl der mTOR-Signalweg als auch die Promotormethylierung laborexperimentell untersucht werden konnte, erhielten 17 Patienten EVE und 9 Patienten TEM (Vergleiche **Kapitel 3.2.5** und **3.3.5**). Die Ergebnisse bezüglich des Therapieansprechens auf TEM sind in **Kapitel 3.3.5** hinreichend beschrieben. Es zeigte sich keine Assoziation zwischen dem MGMT-Status und dem Therapieansprechen, jedoch ist dies auf Grund der geringen Fallzahl nur eingeschränkt zu beurteilen. Von diesen neun Patienten wären drei Patienten möglicherweise für eine Therapie mit EVE in Frage gekommen.

Von den mit EVE behandelten Patienten wäre bei einer sehr hohen *MTOR* und *AKT-1*-mRNA-Expression (oberhalb der 75. Perzentile) nur ein Patient mit EVE zu behandeln gewesen. Dieser war unter der Therapie progredient. Bei einer Dichotomisierungswert auf Grundlage der medianen mRNA-Expression von *MTOR* und *AKT-1* wären drei Patienten für eine EVE-Therapie in Frage gekommen, bei denen der Grund des Therapieabbruchs bekannt war. Einer dieser drei Patienten sprach auf die Therapie an. Bei den anderen 14 Patienten zeigte sich ebenfalls nur in einem Fall eine stabile Erkrankungsphase. Auf Grund der geringen Patientenzahl wären hier größere möglichst prospektive Studien wünschenswert.

4.5. Zusammenfassende Schlussfolgerungen und Ausblick

In einem homogenen Patientenkollektiv mit gut differenzierten pNEN wurde gezielt die mRNA-Expression der für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene und die Proteinexpression von MGMT, sowie die *MGMT*-Promotormethylierung untersucht.

Everolimus, ein mTOR-Inhibitor, zeigte in verschiedenen Studien eine antitumorale Wirkung bei neuroendokrinen Neoplasien. Bisher ist es trotz verschiedener Versuche und Studien nicht möglich, dass Therapieansprechen auf EVE vorherzusagen.

Anhand der mRNA-Expression elf verschiedener Mitglieder der mTOR-Signalkaskade, zeigte sich, dass der mTOR-Signalweg in pNENs im Verhältnis zu pankreatischem Normalgewebe auf mRNA-Ebene hochreguliert scheint, auch wenn dies nicht auf alle Gene übertragbar ist. Insbesondere die für die Strukturkomponenten des mTORC1 kodierenden Gene wurden im Vergleich zu dem pankreatischen Normalgewebe vermehrt transkribiert. Ebenso zeigte sich eine erhöhte mRNA-Expression von *IGFBP-3*, wohingegen die Transkription von *4EBP1* und *IGF-1* verhältnismäßig verringert war.

Interessanterweise stellten sich zwar zwischen den Genen mehrfach signifikante monotone Korrelationen der mRNA-Expression dar, jedoch war ein linearer Zusammenhang nur für die mRNA-Expression von *MTOR* und *AKT-1* zu finden. Dies deutet auf eine Schlüsselposition dieser beiden Proteine mit möglicherweise sich unmittelbar bedingender Genregulation hin. Die oftmals fehlenden unmittelbaren Zusammenhänge der mRNA-Expression, der sich gegenseitig aktivitätssteuernden Proteine, weisen darauf hin, dass verschiedene Faktoren oder Genmutationen Einfluss auf die Regulation der Aktivität des mTOR-Signalwegs haben können. Als prognostischer oder prädiktiver Biomarker scheint die mRNA-Expression keines der untersuchten für den mTOR-Signalweg kodierenden Gene weitere Informationen zur Abschätzung der Prognose oder des Therapieansprechens auf EVE in pNEN liefern zu können. Auf Grund der geringen Patientenzahl, die eine Therapie mit EVE erhielten, ist die Aussagekraft dahingehend jedoch eingeschränkt.

Temozolomid ist ein Chemotherapeutikum, welches über Alkylierung der DNA eine antineoplastische Wirkung entfaltet. MGMT hingegen entfernt über eine stöchiometrische Reaktion eine Methylgruppe an der O⁶-Position von Guanin und wirkt damit dem Effekt von TEM entgegen. Während in bei Glioblastomen anhand der Promotormethylierung des *MGMT*-Gens bei bestimmten Patienten eine Therapiestratifizierung bezüglich TEM erfolgt, existieren bei NEN widersprüchliche Ergebnisse, auch wenn eine erste Metaanalyse MGMT als prädiktiven Biomarker empfiehlt.

Bisher sind bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien ausschließlich retrospektive Analysen vorhanden, die die Bedeutung des MGMT-Status, mit oftmals heterogenen Tumorentitäten und heterogenen Methoden, untersuchten. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit zeigten, dass aus der Methylierung der Promotorregion nicht auf die Expression von MGMT geschlossen werden kann. Es zeigte sich, dass es in nahezu der Hälfte der Fälle zu einem Verlust der MGMT-Expression kommt und bei vielen pNEN eine Hypermethylierung der *MGMT*-Promotorregion vorliegt. In dem hier untersuchten Patientenkollektiv war ein fehlender prognostischer Einfluss der *MGMT*-Promotormethylierung und MGMT-Expression bei pNEN festzustellen. Da nur wenige Patienten dieses Patientenkollektives eine Therapie mit TEM erhielten, ist die Aussagefähigkeit hinsichtlich einer Korrelation zum Therapieansprechen sehr begrenzt.

Gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit eignen sich die hier untersuchten Methoden und Biomarker nicht für eine bessere Abschätzung der Prognose oder des Therapieansprechens bei gut differenzierten pNEN. Da man aus theoretischen Überlegungen bei einer hohen *MTOR*- und *AKT-1*-mRNA-Expression, sowie bei einer Hypermethylierung der *MGMT*-Promotorregion ein Therapieansprechen für EVE respektive TEM vermuten könnte, kämen gemäß den vorliegenden Ergebnissen bis zu zwei Drittel für mindestens eine der beiden Therapieoptionen in Betracht. Prospektive Analysen zur Bedeutung des MGMT-Status und der mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs als prognostischer und prädiktiver Biomarker in einem homogenen Kollektiv wären daher wünschenswert.

5. Literaturverzeichnis

- ALESSI, D. R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P.,HEMMINGS, B. A. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J*, 15, 6541-51.
- ANGELOUSI, A., KAMP, K., KALTSATOU, M., O'TOOLE, D., KALTSAS, G.,DE HERDER, W. 2017. Sequential Everolimus and Sunitinib Treatment in Pancreatic Metastatic Well-Differentiated Neuroendocrine Tumours Resistant to Prior Treatments. *Neuroendocrinology*, 105, 394-402.
- ARNOLD, C. N., SOSNOWSKI, A., SCHMITT-GRAFF, A., ARNOLD, R.,BLUM, H. E. 2007. Analysis of molecular pathways in sporadic neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *Int J Cancer*, 120, 2157-64.
- BAXTER, R. C. 2014. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat Rev Cancer*, 14, 329-41.
- BEGUM, N., MAASBERG, S.,PAPE, U. F. 2017. Epidemiologische Daten des Deutschen NET-Registers. *TumorDiagnostik & Therapie*, 38, 30-34.
- BEGUM, N., MAASBERG, S., PLÖCKINGER, U., ANLAUF, M., RINKE, A., PÖPPERL, G., LEHNERT, H., IZBICKI, J. R., KRAUSCH, M., VASHIST, Y. K., RAFFEL, A., BÜRK, C. G., HOFFMANN, J., GORETZKI, P.,PAPE, U. F. 2014. Neuroendokrine Tumoren des Verdauungstrakts – Daten des deutschen NET-Registers. *Zentralbl Chir*, 139, 276-283.
- BHAKAT, K. K.,MITRA, S. 2000. Regulation of the human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene by transcriptional coactivators cAMP response element-binding protein-binding protein and p300. *J Biol Chem*, 275, 34197-204.
- BOCANGEL, D., SENGUPTA, S., MITRA, S.,BHAKAT, K. K. 2009. p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Res*, 29, 3741-50.
- BOCCHINI, M., NICOLINI, F., SEVERI, S., BONGIOVANNI, A., IBRAHIM, T., SIMONETTI, G., GRASSI, I.,MAZZA, M. 2020. Biomarkers for Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms (PanNENs) Management-An Updated Review. *Frontiers in oncology*, 10, 831-831.
- BOLDOGH, I., RAMANA, C. V., CHEN, Z., BISWAS, T., HAZRA, T. K., GRÖSCH, S., GROMBACHER, T., MITRA, S.,KAINA, B. 1998. Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. *Cancer Res*, 58, 3950-6.
- BOSMAN, F. T., CARNEIRO, F., HRUBAN, R. H.,THEISE, N. D. 2010. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*, World Health Organization.
- BRIEST, F.,GRABOWSKI, P. 2014. PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: the complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Theranostics*, 4, 336-65.
- BRIGLIADORI, G., FOCA, F., DALL'AGATA, M., RENGUCCI, C., MELEGARI, E., CERASOLI, S., AMADORI, D., CALISTRI, D.,FAEDI, M. 2016. Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity in glioblastoma. *J Neurooncol*, 128, 333-9.
- CABRINI, G., FABBRI, E., LO NIGRO, C., DECHECCHI, M. C.,GAMBARI, R. 2015. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). *Int J Oncol*, 47, 417-28.
- CAMPANA, D., WALTER, T., PUSCEDDU, S., GELSOMINO, F., GRAILLOT, E., PRINZI, N., SPALLANZANI, A., FIORENTINO, M., BARRITAU, M., DALL'OLIO, F., BRIGHI, N.,BIASCO, G. 2018. Correlation between MGMT promoter methylation and response to temozolomide-based therapy in neuroendocrine neoplasms: an observational retrospective multicenter study. *Endocrine*, 60, 490-498.
- CANTLEY, L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296, 1655-7.
- CAPOZZI, M., CATERINA, I., DE DIVITIIS, C., VON ARX, C., MAIOLINO, P., TATANGELO, F., CAVALCANTI, E., DI GIROLAMO, E., IAFFAIOLI, R. V., SCALA, S., TAFUTO, S.,NAPLES, E. C. O. E. M. G. F. N. T. I. 2015. Everolimus and pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): Activity, resistance and how to overcome it. *Int J Surg*, 21 Suppl 1, S89-94.

- CATENA, L., BAJETTA, E., MILIONE, M., DUCCESCHI, M., VALENTE, M., DOMINONI, F., COLONNA, V. 2011. Mammalian target of rapamycin expression in poorly differentiated endocrine carcinoma: clinical and therapeutic future challenges. *Target Oncol*, 6, 65-8.
- CHAI, R.-C., ZHANG, K.-N., LIU, Y.-Q., WU, F., ZHAO, Z., WANG, K.-Y., JIANG, T., WANG, Y.-Z. 2019. Combinations of four or more CpGs methylation present equivalent predictive value for MGMT expression and temozolomide therapeutic prognosis in gliomas. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25, 314-322.
- CHEN, W. S., XU, P. Z., GOTTLÖB, K., CHEN, M. L., SOKOL, K., SHIYANOVA, T., RONINSON, I., WENG, W., SUZUKI, R., TOBE, K., KADOWAKI, T., HAY, N. 2001. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev*, 15, 2203-8.
- CHEN, X., ZHANG, M., GAN, H., WANG, H., LEE, J. H., FANG, D., KITANGE, G. J., HE, L., HU, Z., PARNEY, I. F., MEYER, F. B., GIANNINI, C., SARKARIA, J. N., ZHANG, Z. 2018. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Nat Commun*, 9, 2949.
- CHOE, J., KIM, K. W., KIM, H. J., KIM, D. W., KIM, K. P., HONG, S. M., RYU, J. S., TIRUMANI, S. H., KRAJEWSKI, K., RAMAIIYA, N. 2019. What Is New in the 2017 World Health Organization Classification and 8th American Joint Committee on Cancer Staging System for Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms? *Korean J Radiol*, 20, 5-17.
- CHRISTIANS, A., HARTMANN, C., BENNER, A., MEYER, J., VON DEIMLING, A., WELLER, M., WICK, W., WEILER, M. 2012. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS One*, 7, 13.
- CIACCIO, C. 1907. Sopra speciali cellule granulose della mucosa intestinale. *Arch Ital Anat Embryol*, 6, 482-498.
- CIVES, M., GHAYOURI, M., MORSE, B., BRELSFORD, M., BLACK, M., RIZZO, A., MEEKER, A., STROSBERG, J. 2016. Analysis of potential response predictors to capecitabine/temozolomide in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*, 23, 759-67.
- CLARK, S. J., MELKI, J. 2002. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene*, 21, 5380-7.
- CLEWEMAR ANTONODIMITRAKIS, P., SUNDIN, A., WASSBERG, C., GRANBERG, D., SKOGSEID, B., ERIKSSON, B. 2016. Streptozocin and 5-Fluorouracil for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Efficacy, Prognostic Factors and Toxicity. *Neuroendocrinology*, 103, 345-53.
- COUVELARD, A., O'TOOLE, D., TURLEY, H., LEEK, R., SAUVANET, A., DEGOTT, C., RUSZNIEWSKI, P., BELGHITI, J., HARRIS, A. L., GATTER, K., PEZZELLA, F. 2005. Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *Br J Cancer*, 92, 94-101.
- CRESPO, G., JIMENEZ-FONSECA, P., CUSTODIO, A., LOPEZ, C., CARMONA-BAYONAS, A., ALONSO, V., NAVARRO, M., ALLER, J., SEVILLA, I., GRANDE, E., GAJATE, P., ALONSO-GORDOA, T., MATOS, I., CAPDEVILA, J., NIETO, B., BARRIUSO, J. 2017. Capecitabine and temozolomide in grade 1/2 neuroendocrine tumors: a Spanish multicenter experience. *Future Oncol*, 13, 615-624.
- CROS, J., HENTIC, O., REBOURS, V., ZAPPA, M., GILLE, N., THEOU-ANTON, N., VERNEREY, D., MAIRE, F., LEVY, P., BEDOSSA, P., PARADIS, V., HAMMEL, P., RUSZNIEWSKI, P., COUVELARD, A. 2016. MGMT expression predicts response to temozolomide in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*, 23, 625-33.
- DARBA, J., MARSÀ, A. 2019. Exploring the current status of neuroendocrine tumours: a population-based analysis of epidemiology, management and use of resources. *BMC Cancer*, 19, 1226.
- DASARI, A., SHEN, C., HALPERIN, D., ZHAO, B., ZHOU, S., XU, Y., SHIH, T., YAO, J. C. 2017. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*, 3, 1335-1342.
- DASKALAKIS, K., TSOLI, M., ANGELOUSI, A., KASSI, E., ALEXANDRAKI, K. I., KOLOMODI, D., KALTSAS, G., KOUMARIANOU, A. 2019. Anti-tumour activity of everolimus and sunitinib in neuroendocrine neoplasms. *Endocr Connect*, 8, 641-653.
- DE MESTIER, L., WALTER, T., EVRARD, C., DE BOISSIEU, P., HENTIC, O., CROS, J., TOUGERON, D., LOMBARD-BOHAS, C., REBOURS, V., HAMMEL, P., RUSZNIEWSKI, P. 2020. Temozolomide Alone or Combined

- with Capecitabine for the Treatment of Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumor. *Neuroendocrinology*, 110, 83-91.
- DILZ, L. M., DENECKE, T., STEFFEN, I. G., PRASAD, V., VON WEIKERSTHAL, L. F., PAPE, U. F., WIEDENMANN, B., PAVEL, M. 2015. Streptozocin/5-fluorouracil chemotherapy is associated with durable response in patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Cancer*, 51, 1253-62.
- DUCREUX, M., DAHAN, L., SMITH, D., O'TOOLE, D., LEPERE, C., DROMAIN, C., VILGRAIN, V., BAUDIN, E., LOMBARD-BOHAS, C., SCOAZEC, J. Y., SEITZ, J. F., BITOUN, L., KONE, S., MITRY, E. 2014. Bevacizumab combined with 5-FU/streptozocin in patients with progressive metastatic well-differentiated pancreatic endocrine tumours (BETTER trial)--a phase II non-randomised trial. *Eur J Cancer*, 50, 3098-106.
- DUSSOL, A. S., JOLY, M. O., VERCHERAT, C., FORESTIER, J., HERVIEU, V., SCOAZEC, J. Y., LOMBARD-BOHAS, C., WALTER, T. 2015. Gemcitabine and oxaliplatin or alkylating agents for neuroendocrine tumors: Comparison of efficacy and search for predictive factors guiding treatment choice. *Cancer*, 121, 3428-34.
- EISENHAUER, E. A., THERASSE, P., BOGAERTS, J., SCHWARTZ, L. H., SARGENT, D., FORD, R., DANCEY, J., ARBUCK, S., GWYTHYER, S., MOONEY, M., RUBINSTEIN, L., SHANKAR, L., DODD, L., KAPLAN, R., LACOMBE, D., VERWEIJ, J. 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 45, 228-47.
- EKEBLAD, S., SUNDIN, A., JANSON, E. T., WELIN, S., GRANBERG, D., KINDMARK, H., DUNDER, K., KOZLOVACKI, G., ORLEFORS, H., SIGURD, M., OBERG, K., ERIKSSON, B., SKOGSEID, B. 2007. Temozolomide as monotherapy is effective in treatment of advanced malignant neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 13, 2986-91.
- ESTELLER, M., HAMILTON, S. R., BURGER, P. C., BAYLIN, S. B., HERMAN, J. G. 1999. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*, 59, 793-7.
- FAIVRE, S., KROEMER, G., RAYMOND, E. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 671-88.
- FEYRTER, F. 1938. *Über diffuse endokrine epitheliale Organe*, Leipzig, J.A. Barth.
- FILIPOWICZ, W., JASKIEWICZ, L., KOLB, F. A., PILLAI, R. S. 2005. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 331-41.
- FIRTH, S. M., BAXTER, R. C. 2002. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*, 23, 824-54.
- FOULSTONE, E., PRINCE, S., ZACCHEO, O., BURNS, J. L., HARPER, J., JACOBS, C., CHURCH, D., HASSAN, A. B. 2005. Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol*, 205, 145-53.
- FRAENKEL, M., FAGGIANO, A., VALK, G. D. 2015. Epidemiology of Neuroendocrine Tumors. *Front Horm Res*, 44, 1-23.
- FRIAS, M. A., THOREEN, C. C., JAFFE, J. D., SCHRODER, W., SCULLEY, T., CARR, S. A., SABATINI, D. M. 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*, 16, 1865-70.
- FROMMER, M., MCDONALD, L. E., MILLAR, D. S., COLLIS, C. M., WATT, F., GRIGG, G. W., MOLLOY, P. L., PAUL, C. L. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1827-31.
- FURNARI, F. B., HUANG, H. J., CAVENEE, W. K. 1998. The phosphoinositidase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res*, 58, 5002-8.
- FURUKAWA, M., RAFFELD, M., MATEO, C., SAKAMOTO, A., MOODY, T. W., ITO, T., VENZON, D. J., SERRANO, J., JENSEN, R. T. 2005. Increased expression of insulin-like growth factor I and/or its receptor in gastrinomas is associated with low curability, increased growth, and development of metastases. *Clin Cancer Res*, 11, 3233-42.

- GHAYOURI, M., BOULWARE, D., NASIR, A., STROSBURG, J., KVOLS, L., COPPOLA, D. 2010. Activation of the serine/threonine protein kinase Akt in enteropancreatic neuroendocrine tumors. *Anticancer Res*, 30, 5063-7.
- GILBERT, J. A., ADHIKARI, L. J., LLOYD, R. V., HALFDANARSON, T. R., MUDERS, M. H., AMES, M. M. 2013. Molecular markers for novel therapeutic strategies in pancreatic endocrine tumors. *Pancreas*, 42, 411-421.
- GIROT, P., DUMARS, C., MOSNIER, J. F., MUZELLE, L., SENELLART, H., FOUBERT, F., CAROLI-BOSC, F. X., CAUCHIN, E., REGENET, N., MATYSIAK-BUDNIK, T., TOUCHEFEU, Y. 2017. Short article: Evaluation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase as a predicting factor of response to temozolomide-based chemotherapy in well-differentiated metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 29, 826-830.
- GOSSET, A., MASSON, P. 1914. Tumeurs endocrines de l'appendice. *La Presse Médicale*, 237-40.
- GRABOWSKI, P., GRISS, S., ARNOLD, C. N., HÖRSCH, D., GÖKE, R., ARNOLD, R., HEINE, B., STEIN, H., ZEITZ, M., SCHERÜBL, H. 2005. Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease. *Neuroendocrinology*, 81, 1-9.
- GRABOWSKI, P., SCHINDLER, I., ANAGNOSTOPOULOS, I., FOSS, H. D., RIECKEN, E. O., MANSMANN, U., STEIN, H., BERGER, G., BUHR, H. J., SCHERÜBL, H. 2001. Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IV colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13, 405-11.
- GUERTIN, D. A., SABATINI, D. M. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 12, 9-22.
- GUERTIN, D. A., STEVENS, D. M., THOREN, C. C., BURDS, A. A., KALAANY, N. Y., MOFFAT, J., BROWN, M., FITZGERALD, K. J., SABATINI, D. M. 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell*, 11, 859-71.
- HALFDANARSON, T. R., RABE, K. G., RUBIN, J., PETERSEN, G. M. 2008. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann Oncol*, 19, 1727-33.
- HAN, X., JI, Y., ZHAO, J., XU, X., LOU, W. 2013. Expression of PTEN and mTOR in pancreatic neuroendocrine tumors. *Tumour Biol*, 34, 2871-9.
- HANSEL, D. E., RAHMAN, A., HOUSE, M., ASHFAQ, R., BERG, K., YEO, C. J., MAITRA, A. 2004. Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Clin Cancer Res*, 10, 6152-8.
- HARDIE, D. G. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 774-85.
- HEGI, M. E., DISERENS, A. C., GORLIA, T., HAMOU, M. F., DE TRIBOLET, N., WELLER, M., KROS, J. M., HAINFELLNER, J. A., MASON, W., MARIANI, L., BROMBERG, J. E., HAU, P., MIRIMANOFF, R. O., CAIRNCROSS, J. G., JANZER, R. C., STUPP, R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 997-1003.
- HEIDENHAIN, R. 1870. Untersuchungen über den Bau der Labdrüsen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 6, 368-406.
- HENFLING, M., PERREN, A., SCHMITT, A. M., SADDIG, C. M., STARKE, A. A., RIEDL, R. G., VERSLEIJEN-JONKERS, Y. M. H., SPRIJ-MOOIJ, D. M., RAMAEKERS, F. C. S., HOFLAND, L., SPEEL, E. M. 2018. The IGF pathway is activated in insulinomas but downregulated in metastatic disease. *Endocr Relat Cancer*.
- HIJIOKA, S., SAKUMA, K., AOKI, M., MIZUNO, N., KUWAHARA, T., OKUNO, N., HARA, K., YATABE, Y. 2019. Clinical and in vitro studies of the correlation between MGMT and the effect of streptozocin in pancreatic NET. *Cancer Chemother Pharmacol*, 83, 43-52.
- HOFER, S., BULLINGER, L., DIERLAMM, J., ANCA-LIGIA GROSU, A.-L., HAU, P., HENSE, J., PFLUGSHAUPT, T., PREUSSER, M., PROESCHOLDT, M., PUKROPT., RUSHING, E. J., SINN, M., WÖRMANN, B. 2019. *Gliome im Erwachsenenalter* [Online]. Available:

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter/@@guideline/html/index.html#litID0EKTBI> [Accessed 2021/04/01 2021].

- INOKI, K., LI, Y., XU, T., GUAN, K.-L. 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development*, 17, 1829-1834.
- INOKI, K., LI, Y., ZHU, T., WU, J., GUAN, K. L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4, 648-57.
- INOUE, M., HAGER, J. H., FERRARA, N., GERBER, H. P., HANAHAN, D. 2002. VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. *Cancer Cell*, 1, 193-202.
- JAENISCH, R., BIRD, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 Suppl, 245-54.
- JESIONEK-KUPNICKA, D., BRAUN, M., TRĄBSKA-KLUCH, B., CZECH, J., SZYBKA, M., SZYMAŃSKA, B., KULCZYCKA-WOJDALA, D., BIENKOWSKI, M., KORDEK, R., ZAWLIK, I. 2019. MiR-21, miR-34a, miR-125b, miR-181d and miR-648 levels inversely correlate with MGMT and TP53 expression in primary glioblastoma patients. *Arch Med Sci*, 15, 504-512.
- JIAO, Y., SHI, C., EDIL, B. H., DE WILDE, R. F., KLIMSTRA, D. S., MAITRA, A., SCHULICK, R. D., TANG, L. H., WOLFGANG, C. L., CHOTI, M. A., VELCULESCU, V. E., DIAZ, L. A., JR., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K. W., HRUBAN, R. H., PAPADOPOULOS, N. 2011. DAXX/ATRAX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*, 331, 1199-1203.
- KAEMMERER, D., REIMANN, C., SPECHT, E., WIRTZ, R. M., SAYEG, M., BAUM, R. P., SCHULZ, S., LUPP, A. 2015. Differential expression and prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Oncotarget*, 6, 3346-58.
- KANAKIS, G., KALTSAS, G. 2012. Biochemical markers for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (GEP-NETs). *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 26, 791-802.
- KARAR, J., MAITY, A. 2011. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*, 4.
- KISHIDA, Y., NATSUME, A., TODA, H., TOI, Y., MOTOMURA, K., KOYAMA, H., MATSUDA, K., NAKAYAMA, O., SATO, M., SUZUKI, M., KONDO, Y., WAKABAYASHI, T. 2012. Correlation between quantified promoter methylation and enzymatic activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioblastomas. *Tumour Biol*, 33, 373-81.
- KLÖPPEL, G., PERREN, A., HEITZ, P. U. 2004. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci*, 1014, 13-27.
- KOUMARIANOU, A., KALTSAS, G., KULKE, M. H., OBERG, K., STROSBERG, J. R., SPADA, F., GALDY, S., BARBERIS, M., FUMAGALLI, C., BERRUTI, A., FAZIO, N. 2015. Temozolomide in Advanced Neuroendocrine Neoplasms: Pharmacological and Clinical Aspects. *Neuroendocrinology*, 101, 274-88.
- KRUG, S., BOCH, M., DANIEL, H., NIMPHIUS, W., MULLER, D., MICHL, P., RINKE, A., GRESS, T. M. 2015. Streptozocin-Based Chemotherapy in Patients with Advanced Neuroendocrine Neoplasms-- Predictive and Prognostic Markers for Treatment Stratification. *PLoS One*, 10, e0143822.
- KRUG, S., BOCH, M., REXIN, P., GRESS, T. M., MICHL, P., RINKE, A. 2017. Impact of Therapy Sequence with Alkylating Agents and MGMT Status in Patients with Advanced Neuroendocrine Tumors. *Anticancer Res*, 37, 2491-2500.
- KULKE, M. H., HORNICK, J. L., FRAUENHOFFER, C., HOOSHMANN, S., RYAN, D. P., ENZINGER, P. C., MEYERHARDT, J. A., CLARK, J. W., STUART, K., FUCHS, C. S., REDSTON, M. S. 2009. O6-methylguanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 15, 338-45.
- KULKE, M. H., RUSZNIEWSKI, P., VAN CUTSEM, E., LOMBARD-BOHAS, C., VALLE, J. W., DE HERDER, W. W., PAVEL, M., DEGTYAREV, E., BRASE, J. C., BUBUTEISHVILI-PACAUD, L., VOI, M., SALAZAR, R., BORBATH, I., FAZIO, N., SMITH, D., CAPDEVILA, J., RIECHELMANN, R. P., YAO, J. C. 2017. A randomized, open-label, phase 2 study of everolimus in combination with pasireotide LAR or everolimus alone in advanced, well-differentiated, progressive pancreatic neuroendocrine tumors: COOPERATE-2 trial. *Ann Oncol*, 28, 1309-1315.

- KULTSCHITZKY, N. 1897. Zur Frage über den Bau des Darmkanals. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 49, 7-35.
- KUSHWAHA, D., RAMAKRISHNAN, V., NG, K., STEED, T., NGUYEN, T., FUTALAN, D., AKERS, J. C., SARKARIA, J., JIANG, T., CHOWDHURY, D., CARTER, B. S., CHEN, C. C. 2014. A genome-wide miRNA screen revealed miR-603 as a MGMT-regulating miRNA in glioblastomas. *Oncotarget*, 5, 4026-39.
- LAMBERTI, G., BRIGHI, N., MAGGIO, I., MANUZZI, L., PETERLE, C., AMBROSINI, V., RICCI, C., CASADEI, R., CAMPANA, D. 2018. The Role of mTOR in Neuroendocrine Tumors: Future Cornerstone of a Winning Strategy? *International journal of molecular sciences*, 19, 747.
- LAMMERT, E., GU, G., MCLAUGHLIN, M., BROWN, D., BREKKEN, R., MURTAUGH, L. C., GERBER, H. P., FERRARA, N., MELTON, D. A. 2003. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol*, 13, 1070-4.
- LANGHANS, T. 1867. Ueber einen Drüsenpolyp im Ileum. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 38, 559-560.
- LAPLANTE, M., SABATINI, D. M. 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122, 3589-94.
- LATTANZIO, L., BORGOGNONE, M., MOCELLINI, C., GIORDANO, F., FAVATA, E., FASANO, G., VIVENZA, D., MONTEVERDE, M., TONISSI, F., GHIGLIA, A., FILLINI, C., BERNUCCI, C., MERLANO, M., LO NIGRO, C. 2015. MGMT promoter methylation and glioblastoma: a comparison of analytical methods and of tumor specimens. *Int J Biol Markers*, 30, e208-16.
- LAVON, I., FUCHS, D., ZRIHAN, D., EFRONI, G., ZELIKOVITCH, B., FELLIG, Y., SIEGAL, T. 2007. Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Res*, 67, 8952-9.
- LEMELIN, A., BARRITAU, M., HERVIEU, V., PAYEN, L., PERON, J., COUVELARD, A., CROS, J., SCOAZEC, J. Y., BIN, S., VILLENEUVE, L., LOMBARD-BOHAS, C., WALTER, T. 2019. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) status in neuroendocrine tumors: a randomized phase II study (MGMT-NET). *Dig Liver Dis*, 51, 595-599.
- LEPAGE, C., BOUVIER, A. M., PHELIP, J. M., HATEM, C., VERNET, C., FAIVRE, J. 2004. Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well defined French population. *Gut*, 53, 549-53.
- LEPAGE, C., CICCOLALLO, L., DE ANGELIS, R., BOUVIER, A. M., FAIVRE, J., GATTA, G. 2010. European disparities in malignant digestive endocrine tumours survival. *Int J Cancer*, 126, 2928-34.
- LI, J., YEN, C., LIAW, D., PODSYPANINA, K., BOSE, S., WANG, S. I., PUC, J., MILIARESI, C., RODGERS, L., MCCOMBIE, R., BIGNER, S. H., GIOVANELLA, B. C., ITTMANN, M., TYCKO, B., HIBSHOOSH, H., WIGLER, M. H., PARSONS, R. 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275, 1943-7.
- LIU, I. H., FORD, J. M., KUNZ, P. L. 2016. DNA-repair defects in pancreatic neuroendocrine tumors and potential clinical applications. *Cancer Treat Rev*, 44, 1-9.
- LLOYD, R. V., OSAMURA, R. Y., KLÖPPEL, G., ROSAI, J. 2017. *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs*, World Health Organization.
- LUBARSCH, O. 1888. Ueber den primären Krebs des Ileum nebst Bemerkungen über das gleichzeitige Vorkommen von Krebs und Tuberculose. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 111, 280-317.
- LUO, Y., HURWITZ, J., MASSAGUE, J. 1995. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*, 375, 159-61.
- MAASBERG, S., PAPE, U.-F., FOTTNER, C., GORETZKI, P. E., ANLAUF, M., HÖRSCH, D., CREMER, B., SCHULTE, D. M., QUIETZSCH, D., SCHEERER, F., PÖPPERL, G., POEPEL, T. D., BEGUM, N., GROHÉ, C., RINKE, A. 2018. Neuroendokrine Neoplasien im deutschen NET-Register. *Z Gastroenterol*, 56, 1237-1246.
- MAITRA, A., HANSEL, D. E., ARGANI, P., ASHFAQ, R., RAHMAN, A., NAJI, A., DENG, S., GERADTS, J., HAWTHORNE, L., HOUSE, M. G., YEO, C. J. 2003. Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res*, 9, 5988-95.
- MAITY, A., PORE, N., LEE, J., SOLOMON, D., O'ROURKE, D. M. 2000. Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human

- glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res*, 60, 5879-86.
- MALMSTROM, A., GRONBERG, B. H., MAROSI, C., STUPP, R., FRAPPAZ, D., SCHULTZ, H., ABACIOGLU, U., TAVELIN, B., LHERMITTE, B., HEGI, M. E., ROSELL, J., HENRIKSSON, R. 2012. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 13, 916-26.
- MANNING, B. D. 2004. Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol*, 167, 399-403.
- MANNING, B. D., TOKER, A. 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169, 381-405.
- MISSIAGLIA, E., DALAI, I., BARBI, S., BEGHELLI, S., FALCONI, M., DELLA PERUTA, M., PIEMONTI, L., CAPURSO, G., DI FLORIO, A., DELLE FAVE, G., PEDERZOLI, P., CROCE, C. M., SCARPA, A. 2010. Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *J Clin Oncol*, 28, 245-55.
- MODLIN, I. M., LYE, K. D., KIDD, M. 2003. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*, 97, 934-59.
- MODLIN, I. M., OBERG, K., CHUNG, D. C., JENSEN, R. T., DE HERDER, W. W., THAKKER, R. V., CAPLIN, M., DELLE FAVE, G., KALTSAS, G. A., KRENNING, E. P., MOSS, S. F., NILSSON, O., RINDI, G., SALAZAR, R., RUSZNIEWSKI, P., SUNDIN, A. 2008. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol*, 9, 61-72.
- MODLIN, I. M., SHAPIRO, M. D., KIDD, M. 2004. Siegfried Oberndorfer: origins and perspectives of carcinoid tumors. *Hum Pathol*, 35, 1440-51.
- MOERTEL, C. G., HANLEY, J. A., JOHNSON, L. A. 1980. Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 303, 1189-94.
- MOERTEL, C. G., LEFKOPOULOU, M., LIPSITZ, S., HAHN, R. G., KLAASSEN, D. 1992. Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 326, 519-23.
- MUELLER, D., KRUG, S., MAJUMDER, M., RINKE, A., GRESS, T. M. 2016. Low dose DTIC is effective and safe in pretreated patients with well differentiated neuroendocrine tumors. *BMC Cancer*, 16, 016-2642.
- NAKAGAWACHI, T., SOEJIMA, H., URANO, T., ZHAO, W., HIGASHIMOTO, K., SATOH, Y., MATSUKURA, S., KUDO, S., KITAJIMA, Y., HARADA, H., FURUKAWA, K., MATSUZAKI, H., EMI, M., NAKABEPPU, Y., MIYAZAKI, K., SEKIGUCHI, M., MUKAI, T. 2003. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene*, 22, 8835-44.
- NATARAJAN, A. T., VERMEULEN, S., DARROUDI, F., VALENTINE, M. B., BRENT, T. P., MITRA, S., TANO, K. 1992. Chromosomal localization of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis*, 7, 83-5.
- NEWLANDS, E. S., STEVENS, M. F., WEDGE, S. R., WHEELHOUSE, R. T., BROCK, C. 1997. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews*, 23, 35-61.
- NOJIMA, H., TOKUNAGA, C., EGUCHI, S., OSHIRO, N., HIDAYAT, S., YOSHINO, K., HARA, K., TANAKA, N., AVRUCH, J., YONEZAWA, K. 2003. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*, 278, 15461-4.
- NOURSE, J., FIRPO, E., FLANAGAN, W. M., COATS, S., POLYAK, K., LEE, M. H., MASSAGUE, J., CRABTREE, G. R., ROBERTS, J. M. 1994. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature*, 372, 570-3.
- O'REILLY, K. E., ROJO, F., SHE, Q. B., SOLIT, D., MILLS, G. B., SMITH, D., LANE, H., HOFMANN, F., HICKLIN, D. J., LUDWIG, D. L., BASELGA, J., ROSEN, N. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 66, 1500-8.
- O'TOOLE, D., COUVELARD, A., REBOURS, V., ZAPPA, M., HENTIC, O., HAMMEL, P., LEVY, P., BEDOSSA, P., RAYMOND, E., RUSZNIEWSKI, P. 2010. Molecular markers associated with response to

- chemotherapy in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*, 17, 847-56.
- ÖBERG, K. 2013. The genetics of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol*, 40, 37-44.
- ÖBERG, K. 2018. Management of functional neuroendocrine tumors of the pancreas. *Gland Surg*, 7, 20-27.
- OBERNDORFER, S. 1907. Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frankfurter Zeitschrift für Pathologie*, 1, 426-432.
- ONO, H., KUDO, A., AKAHOSHI, K., OGURA, T., OGAWA, K., BAN, D., TANAKA, S., TANABE, M. 2020. Combination of weekly streptozocin and oral S-1 treatment for patients of unresectable or metastatic pancreatic neuroendocrine neoplasms. *J Cancer Res Clin Oncol*, 146, 793-799.
- OWEN, D. H., ALEXANDER, A. J., KONDA, B., WEI, L., HEMMINGER, J. A., SCHMIDT, C. R., ABDEL-MISIH, S. R. Z., DILLHOFF, M. E., SIPOS, J. A., KIRSCHNER, L. S., SHAH, M. H. 2017. Combination therapy with capecitabine and temozolomide in patients with low and high grade neuroendocrine tumors, with an exploratory analysis of O(6)-methylguanine DNA methyltransferase as a biomarker for response. *Oncotarget*, 8, 104046-104056.
- PAPE, U. F., BÖHMIG, M., TILING, N., WIEDENMANN, B. 2000. Diagnostik und Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumore aus internistischer Sicht. *Onkologie*, 7, 624-633.
- PATTERSON, K., MOLLOY, L., QU, W., CLARK, S. 2011. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp*.
- PAUSE, A., BELSHAM, G. J., GINGRAS, A. C., DONZE, O., LIN, T. A., LAWRENCE, J. C., JR., SONENBERG, N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, 371, 762-7.
- PAVEL, M. E., HAINSWORTH, J. D., BAUDIN, E., PEETERS, M., HORSCH, D., WINKLER, R. E., KLIMOVSKY, J., LEBWOHL, D., JEHL, V., WOLIN, E. M., OBERG, K., VAN CUTSEM, E., YAO, J. C. 2011. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*, 378, 2005-2012.
- PEARSE, A. 1979. The diffuse endocrine system and the implications of the APUD concept. *Int Surg*, 64, 5-7.
- PEGG, A. E. 1990. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res*, 50, 6119-29.
- PERREN, A., KOMMINOTH, P., SAREMASLANI, P., MATTER, C., FEURER, S., LEES, J. A., HEITZ, P. U., ENG, C. 2000. Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *The American journal of pathology*, 157, 1097-1103.
- PERREN, A., SCHMITT, A., KOMMINOTH, P., ANLAUF, M., KLÖPPEL, G. 2010. Klassifikation und Pathologie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren. *Visceral Medicine*, 26, 234-240.
- PETERSON, T. R., LAPLANTE, M., THOREEN, C. C., SANCAK, Y., KANG, S. A., KUEHL, W. M., GRAY, N. S., SABATINI, D. M. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137, 873-86.
- PISTOLLATO, F., ABBADI, S., RAMPAZZO, E., PERSANO, L., DELLA PUPPA, A., FRASSON, C., SARTO, E., SCIENZA, R., D'AVELLA, D., BASSO, G. 2010. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells*, 28, 851-62.
- PLOECKINGER, U., KLOEPEL, G., WIEDENMANN, B., LOHMANN, R. 2009. The German NET-registry: an audit on the diagnosis and therapy of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*, 90, 349-63.
- POTTER, C. J., PEDRAZA, L. G., XU, T. 2002. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol*, 4, 658-65.
- QI, Z., TAN, H. 2020. Association between MGMT status and response to alkylating agents in patients with neuroendocrine neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Biosci Rep*, 40.

- QUAEDVLIEG, P. F., VISSER, O., LAMERS, C. B., JANSSEN-HEIJEN, M. L., TAAL, B. G. 2001. Epidemiology and survival in patients with carcinoid disease in The Netherlands. An epidemiological study with 2391 patients. *Ann Oncol*, 12, 1295-300.
- QUILLIEN, V., LAVENU, A., KARAYAN-TAPON, L., CARPENTIER, C., LABUSSIÈRE, M., LESIMPLE, T., CHINOT, O., WAGER, M., HONNORAT, J., SAIKALI, S., FINA, F., SANSON, M., FIGARELLA-BRANGER, D. 2012. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer*, 118, 4201-11.
- RADKE, J., KOCH, A., PRITSCH, F., SCHUMANN, E., MISCH, M., HEMPT, C., LENZ, K., LÖBEL, F., PASCHEREIT, F., HEPPNER, F. L., VAJKOCZY, P., KOLL, R., ONKEN, J. 2019. Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol Commun*, 7, 89.
- RAJ, N., KLIMSTRA, D. S., HORVAT, N., ZHANG, L., CHOU, J. F., CAPANU, M., BASTURK, O., DO, R. K. G., ALLEN, P. J., REIDY-LAGUNES, D. 2017. O6-Methylguanine DNA Methyltransferase Status Does Not Predict Response or Resistance to Alkylating Agents in Well-Differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*, 46, 758-763.
- RAMAKRISHNAN, V., KUSHWAHA, D., KOAY, D. C., REDDY, H., MAO, Y., ZHOU, L., NG, K., ZINN, P., CARTER, B., CHEN, C. C. 2011. Post-transcriptional regulation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase MGMT in glioblastomas. *Cancer Biomark*, 10, 185-93.
- RANSOM, W. 1890. A case of primary carcinoma of the ileum. *The Lancet*, 136, 1020-1023.
- RAYMOND, E., DAHAN, L., RAOUL, J. L., BANG, Y. J., BORBATH, I., LOMBARD-BOHAS, C., VALLE, J., METRAKOS, P., SMITH, D., VINIK, A., CHEN, J. S., HORSCH, D., HAMMEL, P., WIEDENMANN, B., VAN CUTSEM, E., PATYNA, S., LU, D. R., BLANCKMEISTER, C., CHAO, R., RUSZNIEWSKI, P. 2011. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*, 364, 501-13.
- RAYMOND, E., KULKE, M. H., QIN, S., YU, X., SCHENKER, M., CUBILLO, A., LOU, W., TOMASEK, J., THIISEVENSEN, E., XU, J. M., CROITORU, A. E., KHASRAW, M., SEDLACKOVA, E., BORBATH, I., RUFF, P., OBERSTEIN, P. E., ITO, T., JIA, L., HAMMEL, P., SHEN, L., SHRIKHANDE, S. V., SHEN, Y., SUFLIARSKY, J., KHAN, G. N., MORIZANE, C., GALDY, S., KHOSRAVAN, R., FERNANDEZ, K. C., ROSBROOK, B., FAZIO, N. 2018. Efficacy and Safety of Sunitinib in Patients with Well-Differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *Neuroendocrinology*, 107, 237-245.
- RICHTER, J. D., SONENBERG, N. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 433, 477-80.
- RINDI, G., KLERSY, C., ALBARELLO, L., BAUDIN, E., BIANCHI, A., BUCHLER, M. W., CAPLIN, M., COUVELARD, A., CROS, J., DE HERDER, W. W., DELLE FAVE, G., DOGLIONI, C., FEDERSPIEL, B., FISCHER, L., FUSAI, G., GAVAZZI, F., HANSEN, C. P., INZANI, F., JANN, H., KOMMINOTH, P., KNIGGE, U. P., LANDONI, L., LA ROSA, S., LAWLOR, R. T., LUONG, T. V., MARINONI, I., PANZUTO, F., PAPE, U. F., PARTELLI, S., PERREN, A., RINZIVILLO, M., RUBINI, C., RUSZNIEWSKI, P., SCARPA, A., SCHMITT, A., SCHINZARI, G., SCOAZEC, J. Y., SESSA, F., SOLCIA, E., SPAGGIARI, P., TOUMPANAKIS, C., VANOLI, A., WIEDENMANN, B., ZAMBONI, G., ZANDEE, W. T., ZERBI, A., FALCONI, M. 2018. Competitive Testing of the WHO 2010 versus the WHO 2017 Grading of Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms: Data from a Large International Cohort Study. *Neuroendocrinology*, 107, 375-386.
- RINKE, A., ARNOLD, R. 2014. Aktuelle Therapie neuroendokriner Tumoren. *Arzneimitteltherapie*, 32, 2-13.
- RINKE, A., WIEDENMANN, B., AUERNHAMMER, C., BARTENSTEIN, P., BARTSCH, D. K., BEGUM, N., FAISS, S., FOTTNER, C., GEBAUER, B., GORETZKI, P., JANSEN, P. L., PÖPPERL, G., SCHERÜBL, H., WEBER, M. M., GRESS, T. M., PAVEL, M. 2018. S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore, AWMF-Reg. 021-27. *Z Gastroenterol*, 56, 583-681.
- ROQUIN, G., BAUDIN, E., LOMBARD-BOHAS, C., CADIOT, G., DOMINGUEZ, S., GUIMBAUD, R., NICCOLI, P., LEGOUX, J. L., MITRY, E., ROHMER, V., RUSZNIEWSKI, P., WALTER, T., DUCREUX, M., COUVELARD, A., SCOAZEC, J. Y., RAMOND-ROQUIN, A., CAROLI-BOSC, F. X., HENTIC, O. 2018. Chemotherapy for Well-Differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumours with a Ki-67 Index $\geq 10\%$: Is There a

- More Effective Antitumour Regimen? A Retrospective Multicentre Study of the French Group of Endocrine Tumours (GTE). *Neuroendocrinology*, 106, 38-46.
- SAIF, M. W., KALEY, K., BRENNAN, M., GARCON, M. C., RODRIGUEZ, G., RODRIGUEZ, T. 2013. A retrospective study of capecitabine/temozolomide (CAPTEM) regimen in the treatment of metastatic pancreatic neuroendocrine tumors (pNETs) after failing previous therapy. *Jop*, 14, 498-501.
- SAMANI, A. A., YAKAR, S., LEROITH, D., BRODT, P. 2007. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev*, 28, 20-47.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M., SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SCARPA, A. 2019. The landscape of molecular alterations in pancreatic and small intestinal neuroendocrine tumours. *Annales d'Endocrinologie*, 80, 153-158.
- SCHERÜBL, H., STRELLER, B., STABENOW, R., HERBST, H., HÖPFNER, M., SCHWERTNER, C., STEINBERG, J., EICK, J., RING, W., TIWARI, K., ZAPPE, S. M. 2013. Clinically detected gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors are on the rise: epidemiological changes in Germany. *World journal of gastroenterology*, 19, 9012-9019.
- SCHMITT-GRÄFF, A., NITSCHKE, R., WIEDENMANN, B. 2001. Gastroenteropankreatische neuroendokrine/endokrine Tumoren. Aktuelle pathologisch-diagnostische Sicht. *Pathologe*, 22, 105-13.
- SCHMITT, A. M., PAVEL, M., RUDOLPH, T., DAWSON, H., BLANK, A., KOMMINOTH, P., VASSELLA, E., PERREN, A. 2014. Prognostic and predictive roles of MGMT protein expression and promoter methylation in sporadic pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Neuroendocrinology*, 100, 35-44.
- SCHRADER, J., HENES, F. O., BLAEKER, M., ZIMMERMANN-FRAEDRICH, K., PACE, A., PEREZ, D., IZBICKI, J. R., LOHSE, A. W., BENTEN, D. 2019. Extended cycle streptozotocin/5-FU chemotherapy for maintenance therapy in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrine*, 65, 460-467.
- SCHULER, W., SEDRANI, R., COTTENS, S., HÄBERLIN, B., SCHULZ, M., SCHUURMAN, H.-J., ZENKE, G., ZERWES, H.-G., SCHREIER, M. H. 1997. SDZ RAD, a new rapamycin derivate: Pharmacological Properties In Vitro and In Vivo. *Transplantation*, 64, 36-42.
- SCHULZE HEULING, E., KNAB, F., RADKE, J., ESKILSSON, E., MARTINEZ-LEDESMA, E., KOCH, A., CZABANKA, M., DIETERICH, C., VERHAAK, R. G., HARMS, C., EUSKIRCHEN, P. 2017. Prognostic Relevance of Tumor Purity and Interaction with MGMT Methylation in Glioblastoma. *Mol Cancer Res*, 15, 532-540.
- SHAH, T., HOCHHAUSER, D., FROW, R., QUAGLIA, A., DHILLON, A. P., CAPLIN, M. E. 2006. Epidermal growth factor receptor expression and activation in neuroendocrine tumours. *J Neuroendocrinol*, 18, 355-60.
- SHIRAISHI, A., SAKUMI, K., SEKIGUCHI, M. 2000. Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis*, 21, 1879-83.
- SIGAL, M., PAPE, U., WIEDENMANN, B. 2012. Neuroendokrine Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems *Ther Umsch*, 69, 591-6.
- SOEJIMA, H., ZHAO, W., MUKAI, T. 2005. Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer. *Biochem Cell Biol*, 83, 429-37.
- SOGA, J., YAKUWA, Y. 1997. Historical research background of gut-endocrinomas (carcinoids). *Bull Coll Biomed Technol Niigata Univ*, 6, 5-29.
- SOLCIA, E., KLÖPPEL, G., SOBIN, L. H. 2000. *Histological Typing of Endocrine Tumours*, Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- SONTHEIMER, E. J., CARTHEW, R. W. 2005. Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, 122, 9-12.
- STECK, P. A., PERSHOUSE, M. A., JASSER, S. A., YUNG, W. K., LIN, H., LIGON, A. H., LANGFORD, L. A., BAUMGARD, M. L., HATTIER, T., DAVIS, T., FRYE, C., HU, R., SWEDLUND, B., TENG, D. H., TAVTIGIAN, S. V. 1997. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 15, 356-62.

- STROSBERG, J. R., FINE, R. L., CHOI, J., NASIR, A., COPPOLA, D., CHEN, D. T., HELM, J.,KVOLS, L. 2011. First-line chemotherapy with capecitabine and temozolomide in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *Cancer*, 117, 268-75.
- SWITZENY, O. J., CHRISTMANN, M., RENOVANZ, M., GIESE, A., SOMMER, C.,KAINA, B. 2016. MGMT promoter methylation determined by HRM in comparison to MSP and pyrosequencing for predicting high-grade glioma response. *Clin Epigenetics*, 8, 49.
- TREESE, C., SANCHEZ, P., GRABOWSKI, P., BERG, E., BLÄKER, H., KRUSCHEWSKI, M., HAASE, O., HUMMEL, M.,DAUM, S. 2016. Poorly Differentiated Medullary Phenotype Predicts Poor Survival in Early Lymph Node-Negative Gastro-Esophageal Adenocarcinomas. *PLoS One*, 11, e0168237.
- TURAGA, K. K.,KVOLS, L. K. 2011. Recent progress in the understanding, diagnosis, and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *CA Cancer J Clin*, 61, 113-32.
- VANDER HAAR, E., LEE, S. I., BANDHAKAVI, S., GRIFFIN, T. J.,KIM, D. H. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 9, 316-23.
- VITALE, L., LENZI, L., HUNTSMAN, S. A., CANAIDER, S., FRABETTI, F., CASADEI, R., FACCHIN, F., CARINCI, P., ZANNOTTI, M., COPPOLA, D.,STRIPPOLI, P. 2006. Differential expression of alternatively spliced mRNA forms of the insulin-like growth factor 1 receptor in human neuroendocrine tumors. *Oncol Rep*, 15, 1249-56.
- VON NOTTHAFFT, A. 1895. Ueber die entstehung der carcinome. *Dtsch Arch Klin Med*, 54, 555-587.
- VON WICHERT, G., JEHL, P. M., HOEFLICH, A., KOSCHNICK, S., DRALLE, H., WOLF, E., WIEDENMANN, B., BOEHM, B. O., ADLER, G.,SEUFFERLEIN, T. 2000. Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res*, 60, 4573-81.
- WALTER, T., VAN BRAKEL, B., VERCHERAT, C., HERVIEU, V., FORESTIER, J., CHAYVIALLE, J. A., MOLIN, Y., LOMBARD-BOHAS, C., JOLY, M. O.,SCOAZEC, J. Y. 2015. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase status in neuroendocrine tumours: prognostic relevance and association with response to alkylating agents. *Br J Cancer*, 112, 523-31.
- WANG, L., LI, Z., LIU, C., CHEN, L., LIU, L., HU, Z., ZHAO, L., LU, D.,TENG, L. 2017. Comparative assessment of three methods to analyze MGMT methylation status in a series of 350 gliomas and gangliogliomas. *Pathol Res Pract*, 213, 1489-1493.
- WELIN, S., SORBYE, H., SEBJORNSEN, S., KNAPPSKOG, S., BUSCH, C.,OBERG, K. 2011. Clinical effect of temozolomide-based chemotherapy in poorly differentiated endocrine carcinoma after progression on first-line chemotherapy. *Cancer*, 117, 4617-22.
- WICK, W., PLATTEN, M., MEISNER, C., FELSBERG, J., TABATABAI, G., SIMON, M., NIKKHAH, G., PAPSDORF, K., STEINBACH, J. P., SABEL, M., COMBS, S. E., VESPER, J., BRAUN, C., MEIXENSBERGER, J., KETTER, R., MAYER-STEINACKER, R., REIFENBERGER, G.,WELLER, M. 2012. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 13, 707-15.
- WILLIAMS, E. D.,SANDLER, M. 1963. The classification of carcinoid tumours. *Lancet*, 281, 238-9.
- WITTEKIND, C. 2017. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*, John Wiley & Sons.
- WOO, S. Y., KIM, D. H., JUN, C. B., KIM, Y. M., HAAR, E. V., LEE, S. I., HEGG, J. W., BANDHAKAVI, S., GRIFFIN, T. J.,KIM, D. H. 2007. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem*, 282, 25604-12.
- WORST, T. S., WEIS, C.-A., STÖHR, R., BERTZ, S., ECKSTEIN, M., OTTO, W., BREYER, J., HARTMANN, A., BOLENZ, C., WIRTZ, R. M.,ERBEN, P. 2018. CDKN2A as transcriptomic marker for muscle-invasive bladder cancer risk stratification and therapy decision-making. *Scientific Reports*, 8, 14383.
- WOUTERS, B. G.,KORITZINSKY, M. 2008. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 851-64.
- YACHIDA, S., VAKIANI, E., WHITE, C. M., ZHONG, Y., SAUNDERS, T., MORGAN, R., DE WILDE, R. F., MAITRA, A., HICKS, J., DEMARZO, A. M., SHI, C., SHARMA, R., LAHERU, D., EDIL, B. H., WOLFGANG, C. L., SCHULICK, R. D., HRUBAN, R. H., TANG, L. H., KLIMSTRA, D. S.,IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. 2012. Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and

- distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol*, 36, 173-84.
- YANG, Q., GUAN, K. L. 2007. Expanding mTOR signaling. *Cell Res*, 17, 666-81.
- YANG, Q. C., WANG, Y. H., LIN, Y., XUE, L., CHEN, Y. J., CHEN, M. H., CHEN, J. 2014. Expression of O(6)-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) and its clinical significance in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 4204-12.
- YAO, J. C., HASSAN, M., PHAN, A., DAGOHOY, C., LEARY, C., MARES, J. E., ABDALLA, E. K., FLEMING, J. B., VAUTHEY, J. N., RASHID, A., EVANS, D. B. 2008. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol*, 26, 3063-72.
- YAO, J. C., LOMBARD-BOHAS, C., BAUDIN, E., KVOLS, L. K., ROUGIER, P., RUSZNIEWSKI, P., HOOSEN, S., ST PETER, J., HAAS, T., LEBWOHL, D., VAN CUTSEM, E., KULKE, M. H., HOBDAV, T. J., O'DORISIO, T. M., SHAH, M. H., CADIOT, G., LUPPI, G., POSEY, J. A., WIEDENMANN, B. 2010. Daily oral everolimus activity in patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: a phase II trial. *J Clin Oncol*, 28, 69-76.
- YAO, J. C., SHAH, M. H., ITO, T., BOHAS, C. L., WOLIN, E. M., VAN CUTSEM, E., HOBDAV, T. J., OKUSAKA, T., CAPDEVILA, J., DE VRIES, E. G., TOMASSETTI, P., PAVEL, M. E., HOOSEN, S., HAAS, T., LINCY, J., LEBWOHL, D., OBERG, K. 2011. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*, 364, 514-23.
- YOO, C., CHO, H., SONG, M. J., HONG, S. M., KIM, K. P., CHANG, H. M., CHAE, H., KIM, T. W., HONG, Y. S., RYU, M. H., KANG, Y. K., KIM, S. C., RYOO, B. Y. 2017. Efficacy and safety of everolimus and sunitinib in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor. *Cancer Chemother Pharmacol*, 79, 139-146.
- YUAN, G., NIU, L., ZHANG, Y., WANG, X., MA, K., YIN, H., DAI, J., ZHOU, W., PAN, Y. 2017. Defining optimal cutoff value of MGMT promoter methylation by ROC analysis for clinical setting in glioblastoma patients. *J Neurooncol*, 133, 193-201.
- ZARATE, X., WILLIAMS, N., HERRERA, M. F. 2012. Pancreatic incidentalomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 26, 97-103.
- ZHANG, J., JIA, Z., LI, Q., WANG, L., RASHID, A., ZHU, Z., EVANS, D. B., VAUTHEY, J. N., XIE, K., YAO, J. C. 2007. Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer*, 109, 1478-86.
- ZHANG, W., ZHANG, J., HOADLEY, K., KUSHWAHA, D., RAMAKRISHNAN, V., LI, S., KANG, C., YOU, Y., JIANG, C., SONG, S. W., JIANG, T., CHEN, C. C. 2012. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro Oncol*, 14, 712-9.
- ZHAO, W., SOEJIMA, H., HIGASHIMOTO, K., NAKAGAWACHI, T., URANO, T., KUDO, S., MATSUKURA, S., MATSUO, S., JOH, K., MUKAI, T. 2005. The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. *J Biochem*, 137, 431-40.
- ZHONG, H., CHILES, K., FELDSER, D., LAUGHNER, E., HANRAHAN, C., GEORGESCU, M. M., SIMONS, J. W., SEMENZA, G. L. 2000. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60, 1541-5.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Adrian Constantin Lock, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die mRNA-Expression des mTOR-Signalwegs und der Status der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase als potenzielle prädiktive Biomarker bei gut differenzierten pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien“ (Englisch: „The mRNA expression of the mTOR pathway and the status of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase as potential predictive biomarkers in well differentiated pancreatic neuroendocrine neoplasias“) 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Hamburg, den 15.04.2021

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Briest, F., Wang, Y., Arsenic, R., Elezkurtaj, S., Berg, E., Greshake, S., **Lock, A. C.**, Hörsch, D., Arnold, C. N., Hummel, M., Siegmund, B., Grabowski, P. 2018. Immunohistochemical Study of Mitosis-regulatory Proteins in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Anticancer Res*, 38, 3863-3870.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei allen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben und ohne deren Mithilfe die Anfertigung diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Frau PD Dr. Patricia Grabowski für die Überlassung des Promotionsthemas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Durch ihre langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der neuroendokrinen Tumore und ihren guten Kontakten zu den anderen Tumorzentren, war die Erhebung der Daten und Organisation des Gewebematerials erst möglich. Ich möchte mich bei ihr insbesondere für die Möglichkeit bedanken, einige der Ergebnisse auf dem 13. Treffen der „European Neuroendocrine Tumor Society“ in Barcelona vorzustellen. Der jederzeit mögliche konstruktive Dialog auf fachlicher und persönlicher Ebene war eine große Hilfe für mich und hat mich stets positiv beeinflusst und ermutigt.

Allen weiteren KollegInnen der Arbeitsgruppe möchte ich darüber hinaus für die schöne gemeinsame Zeit in und außerhalb des Labors danken.

Bei Herrn PD Dr. Arend Koch, meinem weiteren Betreuer, möchte ich mich ausdrücklich für den immerzu möglichen regen und sehr konstruktiven Austausch bezüglich der immunhistochemischen und pyrosequenzierungstechnischen Analysen bedanken.

Insbesondere die Nutzung der durch ihn zur Verfügung gestellten Materialien und oft auch persönlichen Ressourcen ließen diese Untersuchungen erst zu. Auch den weiteren Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Claire Gehlhaar, möchte ich ausdrücklich für die Unterstützung der laborexperimentellen Versuche danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Ralph Wirtz und seinem Team der STRATIFYER Molecular Pathology GmbH. Ich hatte unter anderem die Möglichkeit vor Ort zu hospitieren, um die RNA-Extraktion zu erlernen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Ruza Arsenic für die Überlassung des Tumormaterials und die Hilfe bei der Beurteilung des relevanten Tumorareals. Auch den Kolleginnen und Kollegen aus den anderen Kliniken Marburg, Bad Berka und Oslo möchte ich für die Überlassung des Gewebematerials danken. Hierbei danke ich insbesondere Herrn Prof. Dr. Dieter Hörsch für die initiale Planung der Studie.

Darüber hinaus möchte ich meinen Eltern, allen Freunden und insbesondere meiner Freundin für die immerwährende und vielseitige Unterstützung während des Verfassens der Arbeit danken.