

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Aus der Klinik für Gastroenterologie, Stoffwechselkrankheiten und
Endokrinologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Thomas M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Expression der Signaltransduktionsfaktoren MAPK,
Akt/PKB und des Transkriptionsfaktors CREB in
gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Alexandra Stefanie Loest
aus Haan

Marburg 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
23.02.0223

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Frau Prof. Dr. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. Hörsch

1. Koreferent: Herr PD Dr. Seifart

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems	1
1.1.1	Insulinome	5
1.1.2	Gastrinome	7
1.1.3	Karzinoide	9
1.2	Signaltransduktionskaskaden	14
1.2.1	Die MAPK-Signalkaskade	15
1.2.2	Der Signaltransduktionsfaktor Akt	19
1.2.3	Der Transkriptionsfaktor CREB	23
1.3	Aufgabenstellung der Arbeit	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Material	29
2.2	Methoden	29
2.2.1	Gewebe von neuroendokrinen Tumoren	29
2.2.2	INS-1 Zellen und Zellkultur	30
2.2.3	Paraffineinbettung	30
2.2.4	Anfertigen von Schnitten am Mikrotom	31
2.2.5	Die ABC-Methode	31
2.2.6	Kontrollen	32
2.2.7	Durchführung der ABC-Methode	33
2.2.8	Auswertung und Fotodokumentation	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Normales Pankreasgewebe	35
3.2	Expression von MAPK, Akt und CREB in INS-1 Zellen	35

3.3	Referenzgewebe	36
3.4	Expression von MAPK, Akt und CREB in NET	37
4	Diskussion	47
4.1	Normales Pankreasgewebe	47
4.2	Expression von MAPK, Akt und CREB in INS-1 Zellen	48
4.3	Expression von MAPK, Akt und CREB in GEP-NET	49
4.3.1	MAPK	49
4.3.2	Akt	50
4.3.3	CREB	52
4.3.4	Unterschiede zwischen Insulinomen, Gastrinomen und Karzinoiden hinsichtlich der Expression von MAPK, Akt und CREB	54
5	Zusammenfassung	55
6	Literatur	57
7	Anhang	72
7.1	Auflistung verwendeter Materialien	72
7.2	Herstellung der benötigten Materialien	74
7.3	Tabellarischer Lebenslauf	76
7.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	78
7.5	Danksagung	79
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	bovines Serum Albumin
CBP	CREB bindendes Protein
CREB	cAMP response element binding protein
CRE	cAMP response elements
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	extrazellulär signal-regulierte Kinasen
GEP	Gastroenteropankreatisches System
GEP-NET	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore
GLP-1	glucagon-like peptide-1
5-HIES	5-Hydroxy-Indolessigsäure
IEGs	immediate early genes („frühe Gene“)
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
µm	Mikrometer
µU	Mikrounits
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NET	Neuroendokrine Tumoren
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
RTKs	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben

SRS	Somatostatinrezeptor-Szintigraphie
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZES	Zollinger-Ellison-Syndrom

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Prinzip der MAP-Kinasekaskade	16
Abb. 2	Die Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade	18
Abb. 3	Der Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K)/ Akt-Signalweg	21
Abb. 4	Aktivierungsmechanismen von CREB	24
Abb. 5	Die immunhistochemische ABC-Methode	32
Abb. 6	Endothelzellen als interne Gewebereferenzen	37
Abb. 7a	Expression und Verteilung von MAPK, Akt und CREB in den untersuchten Insulinomen	39
Abb. 7b	Expression und Verteilung von MAPK, Akt und CREB in den untersuchten Gastrinomen	39
Abb. 7c	Expression und Verteilung von MAPK, Akt und CREB in den untersuchten Karzinoiden	40
Abb. 8	Die unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von MAPK, Akt und CREB und deren aktivierten Formen in Insulinomen	43-44
Abb. 9	Die unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von MAPK, Akt und CREB und deren aktivierten Formen in Gastrinomen	44-45
Abb. 10	Die unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von MAPK, Akt und CREB und deren aktivierten Formen in Karzinoide	45-46

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Bewertung der Färbeintensität	34
Tab. 2	Expression von MAPK, Akt und CREB in den untersuchte NET in absoluten Zahlen und Prozentzahlen	38

1 Einleitung

1.1 Neuroendokrine Tumoren (NET) des gastroenteropankreatischen Systems (GEP)

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NET) leiten sich von dem System der disseminierten neuroendokrinen Zellen ab, die auch als APUD-Zellen (amine precursor uptake and decarboxylation) bezeichnet werden. Der Begriff neuroendokrin geht auf die phänotypische Verwandtschaft mit neuronalen Zellen zurück, die wie neuroendokrine Tumoren bestimmte Proteine wie Synaptophysin, neuronenspezifische Enolase und Chromogranin A exprimieren [Klöppel 2003]. Diese Proteine können in der klinischen und morphologischen Diagnostik der GEP-NET als generelle Marker eingesetzt werden. Spezifische Marker der normalen sowie der neoplastischen neuroendokrinen Zellen sind die Hormone, die im gastroenteropankreatischen System vorkommen [Capella et al. 1995; Klöppel et al. 2003; Jensen et al. 2005].

Darüber hinaus können NET eine Vielzahl klassischer Wachstumsfaktoren wie IGF1, PDGF- α , bFGF und TGF- α produzieren [Schmoll et al. 1999a; Rindi und Bordi 2003].

Epidemiologie

Insgesamt sind GEP-NET seltene Tumoren [Schmoll et al. 1999a; Plöckinger und Wiedenmann 2002; Wagner et al. 2004], wobei in den letzten Jahrzehnten eine steigende Inzidenz von 2/10.000 auf 5/100.000 beschrieben wurde. Unter anderem ist die höhere Inzidenz bedingt durch die verbesserten diagnostischen Methoden [Hörsch et al. 2011].

Die am häufigsten vorkommenden GEP-NET sind Karzinoide, Gastrinome und Insulinome. Vasoaktives intestinales Polypeptid produzierende Pankreastumore (VIPome), Glukagonome, Somatostatinome und Pankreatisches Polypeptid (PP)-produzierende Tumore finden sich sehr selten [Perry und Vinik 1996; Jensen et al. 2005]. Diese funktionellen Tumoren sind meist nach ihrem Hauptsyntheseprodukt benannt, wobei sie nur ein oder auch mehrere Peptide sezernieren können.

Im Gegensatz dazu setzen nichtfunktionelle NET keine Mediatoren frei, die eine spezifische Symptomatik hervorrufen. Allerdings produzieren sie häufig trotzdem eine Reihe von ektope Peptiden wie Chromogranin A, PP und Neurotensin. Aufgrund der anfänglich fehlenden Symptomatik werden diese Tumoren oft erst spät entdeckt [Plöckinger und Wiedenmann 2002; Jensen et al. 2005].

Die Symptomatik der funktionellen GEP-NET ist sehr variabel, abhängig von der Hormon-/Peptidproduktion, der Lokalisation der Tumoren und einer möglicherweise vorhandenen Metastasierung. Auch bei Größenwachstum, Invasivität und Metastasierungsrate von neuroendokrinen Tumoren zeigen sich beträchtliche Unterschiede [Capella et al. 1995; Klöppel et al. 2003].

Klassifikation

Entsprechend den Richtlinien der WHO von 2000 werden endokrine Tumoren in drei Gruppen eingeteilt:

1. Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor (benigne oder fragliche Dignität)
2. Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom (niedrigmalignes Verhalten)
3. Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom (hohe Malignität)

In der aktuellen Klassifikation von 2019 werden neuroendokrine Tumoren in hoch differenzierte neuroendokrine Tumore (NET) und gering differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC, mit schlechter Prognose) eingeteilt [Popa et al. 2021]:

1. Hoch differenzierte neuroendokrine Tumore (NET, G1, G2, G3)
2. Gering differenzierte (klein- oder großzellige) neuroendokrine Karzinome (NEC, G3)
3. Gemischte neuroendokrine nicht-neuroendokrine Neoplasien (MiNEN, hoch- oder gering differenziert)

Die Klassifikation wird nach Lokalisation und Biologie der Tumoren weiter spezifiziert. Bei der Tumorlokalisation wird zwischen Magen, Duodenum (und proximales Jejunum), Ileum (einschließlich distales Jejunum), Appendix, Kolon-

Rektum und Pankreas unterschieden [Klöppel 2003]. Als morphologisch biologische Kriterien dienen neben der histologischen Differenzierung und Metastasierung/Invasion die Tumorgröße, Angioinvasion und proliferative Aktivität. Außerdem werden die hormonelle Aktivität der Tumoren und die Assoziation mit klinischen Syndromen/Erkrankungen berücksichtigt [Klöppel et al. 2003; Rindi und Bordi 2003].

Ätiologie

Die Ätiologie der GEP-NET ist noch weitgehend unklar. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren zeigen endokrine Tumoren des Pankreas und Karzinoide keine Veränderungen in häufigen Onkogenen (Ras, Myc, Fos, Src, Jun) oder häufigen Tumorsuppressorgenen (p53, Retinoblastomsuszeptibilitätsgen) [Delle Fave und Corleto 2001; Grötzinger 2004; Jensen et al. 2005].

Ein Teil der GEP-NET (etwa 20-25% der Gastrinome, 4-5% der Insulinome und einige seltenere NET) ist mit der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN1) assoziiert. Bisher wurden mehr als 300 Mutationen des MEN1-Gens identifiziert, das für das nukleäre Protein Menin kodiert [Calender 2000; Rindi und Bordi 2003; Jensen et al. 2005]. Auch bei einigen sporadischen GEP-NET wurden Veränderungen des MEN1-Gens gefunden [Klöppel et al. 2003; Jensen et al. 2005]. Da dies jedoch bei dem kleineren Teil der GEP-NET der Fall ist, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

Diagnostik

Bei klinischem Verdacht auf einen neuroendokrinen Tumor sollten die entsprechenden Hormone im Plasma quantitativ bestimmt werden. Verschiedene Provokationstests führen zur richtigen Diagnose. Da die Möglichkeit einer Assoziation mit MEN1 besteht, muß auch nach anderen Tumoren gefahndet werden, die in diesem Rahmen vorkommen können.

Die Lokalisation des Tumors und die Suche nach Metastasen gestaltet sich wegen der oft nur geringen Größe der GEP-NET als schwierig. CT und MRT haben selbst bei 5mm dünnen axialen Schnitten eine Sensitivität von nur 40-60%.

Bis vor kurzem war die beste Technik zur Lokalisation pankreatischer NET die Hormonmessung in den suprahepatischen Venen nach sequentieller intaarterieller

Kalziumglukonat-Injektion. Allerdings ist diese Methode technisch anspruchsvoll, invasiv und führt zu keiner präzisen Lokalisationsbestimmung.

Die zur Zeit besten Methoden sind die Somatostatinrezeptor-Szintigraphie (SRS), ^{68}Ga -PET/CT und der endoskopische Ultraschall. Viele NET wie Gastrinome, Karzinoide, Glukagonome, aber auch Tumore nicht-endokrinen Ursprungs besitzen Somatostatinrezeptoren. Durch Bindung von radioaktiv markierten Somatostatinanaloga an den Rezeptor-Subtyp 2 können die Tumoren sichtbar gemacht werden. Für Insulinome eignet sich diese Methode weniger gut, da sie nur in 40% der Fälle diesen Rezeptor exprimieren.

Dagegen hat der endoskopische Ultraschall (EUS) bei Insulinomen eine höhere Sensitivität, nur Tumoren im distalen Pankreas können nicht oder nur schlecht dargestellt werden [Proye und Lokey 2004; Haug und Bartenstein 2012].

Therapie

Die Therapie ist abhängig von der Art, Lokalisation, Dignität und Metastasierung des NET. Auch eine eventuelle Assoziation mit der MEN1 spielt eine Rolle.

Die Behandlung funktionell aktiver Tumoren muß sich sowohl gegen die Hormonüberproduktion und die dadurch hervorgerufenen Symptome als auch gegen den Tumor selbst richten, da ein großer Teil der GEP-NET maligne ist.

Die einzig kurative Therapie ist die Operation. Bei einigen NET können Somatostatinanaloga, Biologika oder eine Chemotherapie eingesetzt werden, allerdings oft nur mit mäßigem Erfolg [Jensen et al. 2005].

In dieser Arbeit sollen die drei häufigsten neuroendokrinen Tumoren, Insulinome, Gastrinome (neuroendokrine Pankreastumoren) und Karzinoide (Serotoninproduzierende NET des Gastrointestinaltraktes) näher betrachtet werden.

Die neuroendokrinen Neoplasien des Pankreas machen 10% aller pankreatischen Tumoren aus [Mignon 2000] und sind meist hoch differenzierte neuroendokrine Tumoren oder neuroendokrine Karzinome. Davon sind 50-60% funktionell aktiv. Obwohl die NET histologisch hoch differenziert sind, verhalten sie sich mit Ausnahme des Insulinoms häufig maligne [Klöppel et al. 2003].

1.1.1 Insulinome

Epidemiologie

Insulinome sind mit etwa 40-70% die häufigsten endokrin aktiven Pankreastumoren. Sie treten bei Männern und Frauen gleich häufig auf und manifestieren sich zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr [Klöppel 2003a]. Die Inzidenz der neuroendokrinen Pankreastumoren wird mit 1-5/Mio Einwohner angegeben [Jensen et al. 2005; Hörsch et al. 2012]. Die tatsächliche Inzidenz scheint jedoch deutlich höher zu liegen, da in Autopsieserien hohe Raten an sehr kleinen, klinisch nicht relevanten neuroendokrinen Tumoren beschrieben wurden [Hörsch et al. 2012].

Im Allgemeinen sind Insulinome klein (>90% haben einen Durchmesser von <2cm), meist solitär (>90%) und nur in 5-15% maligne. Etwa 4% entstehen im Rahmen einer MEN1. Insulinome treten praktisch ausschließlich im Pankreas auf und sind gleichmäßig über Pankreaskopf, -korpus und -schwanz verteilt [Mann und Saller 2000; Jensen et al. 2005]. Ein Teil der Insulinome (50%) enthält nur Insulin, ansonsten können daneben auch noch PP, Gastrin, ACTH, Glukagon, Somatostatin und Serotonin produziert werden [Schmoll et al. 1999a].

Klinik

Die klinische Symptomatik wird durch die autonome Insulinsekretion hervorgerufen und ist durch die Whipple-Trias gekennzeichnet:

- Nüchternhypoglykämien
- Hypoglykämiesymptomatik
- Schlagartige Besserung nach Glukosezufuhr

Zur Hypoglykämiesymptomatik zählen Symptome wie Schwitzen, Tremor, Palpitationen, Tachykardien, Schwäche, Heißhunger, und neuroglykopenische Symptome wie Verwirrtheit, Kopfschmerzen, Verhaltensänderungen, Sehstörungen, Krämpfe oder sogar Koma. Typischerweise treten diese Symptome im Nüchternzustand oder bei starker körperlicher Aktivität auf. Aufgrund der neuroglykopenischen Symptome können Insulinome auch als neuropsychiatrische

Erkrankungen fehldiagnostiziert werden [Schmoll et al. 1999a; Plöckinger und Wiedenmann 2002; Jensen et al. 2005].

Diagnostik

Das zuverlässigste Verfahren zur Diagnose eines Insulinoms ist der 72h dauernde Fastentest mit vier- bis sechsstündlicher Messung von Glukose, C-Peptid und Insulin. Wenn der Patient symptomatisch wird oder der Glukosespiegel dauerhaft unter 2,2mmol/l (40mg/dl) liegt, wird der Versuch abgebrochen. Typisch für ein Insulinom ist die fehlende physiologische Insulinsuppression beim Abfall des Blutzuckers. Eine Glukosekonzentration unter 2,2mmol/l bei einer Insulinkonzentration von über 6 μ U/ml ist nahezu beweisend für ein Insulinom. Der Insulin-/Glukose-Quotient (μ U/ml)/(mg/dl) steigt beim Insulinompatienten auf über 0,3 an [Plöckinger und Wiedenmann 2002; Jensen et al. 2005, Maggio et al. 2020].

Zur präoperativen Lokalisationsdiagnostik wird als Methode der Wahl der endoskopische Ultraschall eingesetzt. Bei etwa 10% der Insulinome, vor allem bei distalen und isoechogenen Tumoren, versagt diese Technik. Hier können CT (mit Kontrastmittel, da die meisten neuroendokrinen Tumoren sehr gut vaskularisiert sind) oder MRT eingesetzt werden [Hörsch et al. 2012].

Therapie

Die Therapie der Wahl beim solitären benignen Insulinom (85-90% der Fälle) ist die kurative chirurgische Exzision. Vor der Operation kann die Hypoglykämie durch häufige kohlenhydratreiche Mahlzeiten und medikamentös durch Diazoxid (hemmt die Insulinfreisetzung) oder eventuell Octreotid (Somatostatinanalogon, wirkt nur bei etwa 40% der Patienten) kontrolliert werden [Wagner et al. 2004; Jensen et al. 2005; Maggio et al. 2020].

Bei malignen Insulinomen sollte auch bei Metastasierung ein chirurgisches Tumordebulking in Erwägung gezogen werden, da hierdurch die klinische Symptomatik gelindert und eine langfristige Remission erreicht werden kann.

Bei Lebermetastasen kann eine (Chemo-)Embolisation erfolgen [Wagner et al. 2004; Jensen et al. 2005; Hörsch et al. 2012].

Bei endokrin aktiven Tumoren ist die Therapie der Wahl die Gabe eines Somatostatinanalogon. Zur systemischen Chemotherapie werden vor allem 5-

Fluorouracil/Steptozotocin (bei gut differenzierten NET) und Cisplatin/Etoposid (bei schlecht differenzierten NET) eingesetzt. Weitere Therapieoptionen sind die selektive Radiotherapie, Radiofrequenzablation, Kryotherapie, Laserablation oder Mikrowellen [Hörsch et al. 2012].

Prognose

Zwischen 90 und 95% der Insulinome sind benigne und nach einer Resektion beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 95-100% [Nikfarjam et al. 2008].

1.1.2 Gastrinome

Epidemiologie

Gastrinome sind endokrine Tumoren, die das Hormon Gastrin sezernieren und so zu einer Magensäurehypersekretion führen (Synonym: Zollinger-Ellison-Syndrom, ZES). Die Inzidenz wird mit 1-3/Mio Einwohner/Jahr angegeben [Jensen 2004, Falconi et al. 2016].

Anders als Insulinome kommen Gastrinome auch außerhalb des Pankreas vor. Am häufigsten liegen sie im Duodenum (50-70%), gefolgt vom Pankreas (20-40%), abdominalen Lymphknoten (ca. 10%) und anderen seltenen intra- und extraabdominellen Lokalisationen [Jensen 2004; Jensen et al. 2005]. Gastrinome sind oft maligne, im Pankreas (über 60%) etwas häufiger als im Duodenum. Das ZES manifestiert sich meist zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr, kann jedoch auch bei Kindern und sehr alten Menschen auftreten [Klöppel 2003a].

Bei etwa 25% der Patienten finden sich Gastrinome im Rahmen einer MEN1, die im Gegensatz zu den sporadischen Tumoren gewöhnlich multipel und fast ausschließlich im Duodenum vorkommen [Klöppel et al. 2003].

Klinik

Die Hypergastrinämie führt zu einer Stimulation der Parietalzellen des Magens mit konsekutiver Hyperplasie und exzessiver Salzsäureproduktion. Die Patienten leiden unter rezidivierenden peptischen Ulzera mit abdominalen Schmerzen,

Diarrhöen, gastroösophagealer Refluxkrankheit, manchmal auch Dysphagie, Übelkeit und Erbrechen [Klöppel 2003a; Wagner et al. 2004; Jensen et al. 2005]. An ein Gastrinom sollte vor allem gedacht werden bei Diarrhöen in Kombination mit peptischen Ulzera (fast alle im Duodenum), Ulzera an ungewöhnlichen oder mehreren Stellen, therapierefraktären Ulzera oder Symptomen einer MEN1 [Jensen et al. 2005; Hörsch 2012].

Diagnostik

Da Gastrinome ein seltener Grund für peptische Ulzera sind (etwa 0,1% aller Ulkuspatienten haben ein ZES), wird die Diagnose meist mit einer Verzögerung von 4-7 Jahren gestellt [Klöppel 2003a; Jensen 2004], das heißt Gastrinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose meist schon fortgeschritten oder metastasiert [Hörsch et al. 2012]. Diagnostisch entscheidend ist der Nachweis einer Nüchternhypergastrinämie und einer vermehrten basalen Magensäureausscheidung (nach Absetzen aller säurehemmenden Medikamente). Wenn das Gastrin um mehr als das Zehnfache der Norm erhöht ist und gleichzeitig der pH-Wert unter 2,1 liegt, gilt die Diagnose als gesichert. Ist das nicht der Fall (bei etwa 66% der Patienten), kann ein Sekretin-Provokationstest folgen. Bei diesem Test steigt der Gastrinspiegel nach der Gabe von Sekretin bei Gastrinom-Patienten weiter an, während er bei anderen Ursachen einer Hypergastrinämie abfällt oder unverändert bleibt [Jensen 2004; Wagner et al. 2004].

Für die Lokalisationsdiagnostik werden vorwiegend die Somatostatinrezeptor-Szintigraphie (SRS) und die Single-Photon-Emissionscomputertomographie verwendet, in den letzten Jahren auch vermehrt die Somatostatinrezeptor-Positronemissionstomographie (PET) [Rossi et al. 2021]. Besonders zur Metastasensuche eignet sich die SRS gut. Bei Lokalisation im Pankreas kann auch ein endoskopischer Ultraschall durchgeführt werden [Proye und Lokey 2004; Jensen et al. 2005].

Therapie

Die gastrische Hypersekretion kann bei fast allen Patienten durch Protonenpumpenhemmer (z.B. Omeprazol) beherrscht werden. Auch H₂-

Rezeptorantagonisten sind wirksam, allerdings sind häufigere Gaben und höhere Dosen erforderlich [Jensen et al. 2005].

Eine chirurgische Exzision wird für alle sporadischen Gastrinome ohne Lebermetastasen oder anderen Fernmetastasen empfohlen [Rossi et al. 2021.] Etwa ein Drittel der Patienten stellt sich bereits mit Lebermetastasen vor, von denen weniger als 15% begrenzt und potentiell resektabel sind. Bei einer Assoziation mit der MEN1 ist eine Metastasierung sehr viel seltener.

Patienten mit metastatischen bzw. nicht resektablen Gastrinomen werden mit langwirkenden Somatostatinanaloga wie Octreotid, Vapreotid oder Lanreotid behandelt. Somatostatinanaloga wirken antisekretorisch, außerdem stoppen bzw. verlangsamen sie das Tumorwachstum [Hörsch et al. 2011]. Eine Chemotherapie (Streptozotocin, Doxorubicin, 5-Fluorouracil) führt zwar in vielen Fällen zu einer Abnahme der Tumormasse, verlängert das Überleben jedoch nicht [Jensen 2004].

Prognose

Besonders schlecht ist die Prognose bei Patienten mit aggressivem Tumorwachstum, gekennzeichnet durch einen Primärtumor im Pankreas, Lebermetastasen, eine Tumorgröße von mehr als 3cm und keine Assoziation mit einer MEN1 [Jensen 2004]. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt 44-82% [Schmoll et al.1999a], die 10-Jahresüberlebensrate liegt bei aggressivem Wachstum bei etwa 30% [Jensen 2004].

1.1.3 Karzinoide

Einteilung

Der Begriff des Karzinoids wurde erstmals von Oberndorfer (1907) verwendet, um seltene karzinomähnliche, aber weniger aggressive Tumoren im Darm von den gewöhnlichen Karzinomen abzugrenzen. „Halten wir sie für gutartig (...) so wäre es doch zu überlegen, ob in den alten Begriff des Karzinomes nicht doch Prozesse miteingerechnet werden, die mehr embryonale Missbildungen als Karzinome sind. Vielleicht könnte man sie als Karzinoide bezeichnen.“ [Oberndorfer 1907]. Mit zunehmender Kenntnis reichte diese Bezeichnung aber

nicht mehr aus, um das gesamte morphologische und biologische Spektrum von Neoplasien des disseminierten neuroendokrinen Zellsystems zu beschreiben. Deswegen wurde in der WHO-Klassifikation von 2000 der neutrale und umfassende Begriff des neuroendokrinen Tumors und neuroendokrinen Karzinoms gewählt (s.o.) [Klöppel et al. 2003]. Dennoch wurde die Bezeichnung Karzinoid nicht vollständig aufgegeben und wird heute synonym zum gastroenteralen hochdifferenzierten neuroendokrinen Tumor verwendet. Hinsichtlich der Tumorlokalisation wurde die Einteilung in Vorderdarm-, Mitteldarm- und Enddarm-Karzinoide von Williams und Sandler [1963] weitgehend verlassen. Zum Vorderdarm wurden Respirationstrakt, Magen, Duodenum, Gallengangssystem und Pankreas gezählt, zum Mitteldarm Dünndarm, Appendix, Caecum und proximales Kolon und zum Enddarm distales Kolon und Rektum. Nach der WHO wird heute zwischen Magen, Duodenum (und proximales Jejunum), Ileum (und distales Jejunum), Appendix, Kolon-Rektum und Pankreas unterschieden [Klöppel et al. 2003].

Epidemiologie

Karzinoide sind Serotonin-produzierende NET. Diese Neoplasien kommen selten vor, finden sich jedoch weit häufiger als pankreatische NET [Mignon 2000]. Die Inzidenz ist in den letzten Jahren von 1-2/100.000 Einwohner [Modlin und Sandor 1997; Schmoll et al. 1999b] auf etwa 7/100.000 Einwohner angestiegen [Dasari et al. 2017]. Karzinoide entwickeln sich in den meisten Fällen aus den enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen) des diffusen neuroendokrinen Systems. Sie treten vor allem in höherem Lebensalter auf, können aber auch bei Kindern beobachtet werden.

Die häufigsten Lokalisationen von Karzinoiden werden je nach Studie mit unterschiedlichen Prozentzahlen angegeben: Rektum (14-27%), Dünndarm (25-42%), Appendix (4-12%) Magen (7-9%) und Kolon (7-11%). Der Rest verteilt sich auf Ösophagus, Gallengangssystem und extragastrointestinale Lokalisationen wie Bronchialsystem/Lunge (23%) und Ovar [Robertson et al. 2006, Modlin et al. 2003, Modlin et al. 2005].

Makroskopisch imponieren die meisten gastrointestinalen NET als harte submuköse Knoten. Mit zunehmender Größe und Infiltrationstiefe kommt es zu

Lymphknotenmetastasen, die oft wesentlich größer sind als der Primärtumor. Immunhistologisch können je nach Lokalisation des Karzinoids neben Serotonin, auch Substanz P, Enteroglukagon, Somatostatin, Pankreatisches Polypeptid, Kalzitonin oder Gastrin nachgewiesen werden [Klöppel 2003b].

Klinik

Die im Magen vorkommenden Karzinoide werden in vier Subtypen eingeteilt. Der häufigste (Typ1) ist mit einer chronisch atrophischen Gastritis assoziiert und führt zu einem unspezifischen gastralen Beschwerdebild. Die meisten duodenalen NET produzieren Gastrin (s.o.), außerdem werden noch Somatostatin-, Serotonin- und Kalzitonin-produzierende NET sowie das gangliozytotische Paragangliom unterschieden. Neuroendokrine Tumoren im Jejunum und Ileum treten in 40% der Fälle multipel auf. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegen oft eine Lymphknotenmetastasierung und seltener Lebermetastasen vor. Durch die Sekretion von Serotonin, Bradykinin und Substanz P entwickelt sich bei einigen der Patienten ein Karzinoidsyndrom (s.u.). Karzinoide sind die häufigsten Appendixtumoren und können auch bei Kindern vorkommen. Die Metastasierungsrate ist sehr viel geringer als bei den ilealen NET (nur 2% der Fälle), hämatogene Metastasen finden sich in der Regel nicht. Klinisch stehen die Symptome einer akuten Appendizitis im Vordergrund.

Während es sich bei den NET des Kolons um relativ große, oft ulzerierte und niedrig differenzierte neuroendokrine Karzinome handelt, sind die NET des Rektum meist benigne [Klöppel 2003b].

Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen und Hormonproduktion können Karzinoide sehr viele verschiedene Symptome verursachen, z.B. gastrointestinale Blutungen, abdominelle Schmerzen, Obstruktionen, Hämatochezie, Obstipation, Diarrhö und hormonell bedingte Symptome, insbesondere das Karzinoidsyndrom.

Karzinoidsyndrom

Das Karzinoidsyndrom tritt nur auf, wenn ausreichende Konzentrationen der Tumorsekretionsprodukte die systemische Zirkulation erreichen. In seiner klassischen Form, obwohl bezeichnend für die Klinik der Karzinoide, findet sich das Karzinoidsyndrom nur bei 2-8% der Patienten [Schmoll et al. 1999b, Ito et al

2018]. Da die vom Tumor sezernierten Hormone/Peptide (besonders Serotonin) normalerweise in der Leber abgebaut werden, zeigt sich ein Karzinoidsyndrom meist nach hepatischer Metastasierung. Selten kann es auch ohne Lebermetastasen vorkommen, dann vor allem bei Lymphknotenmetastasen, exzessiver retroperitonealer Invasion und NET der Lunge oder Ovarien mit direktem Anschluß an die systemische Zirkulation.

Nicht alle Tumoren metastasieren gleich häufig, so entwickeln Patienten mit Dünndarmtumoren relativ oft ein Karzinoidsyndrom, während dieses bei Appendixumoren eine absolute Rarität darstellt.

Typische Symptome sind anfallsweiser Flush (Hitzewallungen), wässrige Diarrhöen, kolikartige Leibschmerzen und asthmaähnliche Symptome. Im weiteren Verlauf können pellagraähnliche Hautveränderungen, Teleangiektasien der Haut und eine Endokardfibrose des rechten Herzens mit Pulmonalstenose und Herzinsuffizienz (Hedinger-Syndrom: kardiale Manifestation des Karzinoid-Syndroms) auftreten [Schmoll 1999; Klöppel 2003b; Jensen et al. 2005, Ito et al. 2018].

Eine lebensbedrohliche Komplikation des Karzinoidsyndroms ist die Karzinoidkrise mit intensiven Hitzewallungen, abdominalen Schmerzen, schweren Diarrhöen, Tachykardie, Hypertonie oder Hypotonie bis hin zu Bewußtseinsstörungen und Koma [Mann und Saller 2000; Jensen et al. 2005].

Diagnostik

Die Diagnose eines Karzinoidsyndroms wird durch die Ausscheidung von 5-Hydroxy-Indolessigsäure (5-HIES, ein Abbauprodukt von Serotonin) im Urin belegt. Werte von >10mg/24h sind verdächtig, >30mg/24h nahezu beweisend für ein Karzinoidsyndrom. Vor der Bestimmung dürfen serotoninhaltige Lebensmittel (z.B. Bananen, Ananas, Walnüsse) und bestimmte Medikamente, die die 5-HIES-Messung beeinflussen können (z.B. Phenothiazine, Paracetamol), nicht eingenommen werden [Mann und Saller 2000; Jensen et al. 2005].

Da aber auch ein nicht Serotonin-produzierender Tumor oder ein Karzinoid ohne Anschluß an die systemische Zirkulation vorliegen kann, schließen normale 5-HIES-Werte ein Karzinoid nicht aus [Mann und Saller 2005].

Die Lokalisationsdiagnostik umfaßt die Sonographie, endoskopische Maßnahmen wie Ösophagogastroduodenoskopie und Koloskopie, Endosonographie,

Röntgenkontrastdarstellung des Dünndarms, Computertomographie des Abdomens, MRT und PET. Das derzeit sensitivste Verfahren ist die Somatostatinrezeptor-Szintigraphie mit radioaktiv markiertem Octreotid [Mann und Saller 2000].

Therapie

Wenn möglich sollte eine chirurgische Entfernung erfolgen. Im Magen kann das bei kleinen Tumoren endoskopisch geschehen, bei Appendixtumoren ist bei einer Größe unter 2,0 cm eine Appendektomie ausreichend. Bei einer Tumorgöße in Dünndarm oder Rektum von über 2cm sollte eine großzügige en bloc Resektion erfolgen [Klöppel 2003b; Jensen et al. 2005]. Auch beim Vorliegen von Metastasen kann eine Resektion von Primärtumor und Metastasen sinnvoll sein [Mann und Saller 2000; Öberg 2004].

Falls eine kurative chirurgische Intervention nicht möglich ist, gibt es verschiedene medikamentöse Ansätze. Das Medikament der Wahl zur Behandlung des Karzinoids ist das Somatostatinanalogon Octreotid bzw. Lanreotid. Octreotid bindet spezifisch an Somatostatinrezeptoren (hemmende G-Protein Rezeptoren), die von 96% aller Karzinoide exprimiert werden. Bei vielen Patienten kommt es zu einer Verbesserung der Symptomatik und Stabilisierung der Progression [Schmoll et al. 1999b, Hörsch et al. 2011]. Außerdem werden je nach Symptomatik zusätzlich Antidiarrhoika, Diuretika (Herzinsuffizienz), Bronchodilatoren (asthmaartige Symptome) und Serotoninrezeptorantagonisten eingesetzt [Jensen et al. 2005].

Eine antineoplastische Therapie sollte bei Versagen oben genannter Therapiemöglichkeiten und nachgewiesener Progression erfolgen [Mann und Saller 2000]. Insbesondere schlecht differenzierte schnell wachsende Karzinoide sprechen auf eine Chemotherapie an, jedoch oft nur mit einer kurzen Remission. Zu den wirksamsten Substanzen gehören Etoposid, Cisplatin, Doxorubicin, Streptozotocin, Melphalan und 5-Fluorouracil. Interferon α wird wegen seiner ausgeprägten Nebenwirkungen nur selten verwendet [Hörsch et al. 2011]. Bei einer Lebermetastasierung führt eine Chemoembolisation zu teilweise lang anhaltenden Remissionen [Schmoll et al. 1999b].

Prognose

Je nach biologischem Verhalten bzw. verschiedenen Lokalisationen und Stadien der Karzinoide fällt die Prognose extrem unterschiedlich aus. An sich haben Karzinoide eine relativ gute Prognose mit teilweise langen Verläufen, auch bei fortgeschrittener Metastasierung. In der SEER-Studie wurde die mittlere 5-Jahresüberlebensrate aller Karzinoide mit 50,4% angegeben. Bei lokalisierten Tumoren betrug die 5-Jahresüberlebensrate 79,7%, bei regionaler Metastasierung 50,6% und bei Patienten mit Fernmetastasen nur 21,8%. Die beste Prognose hatten Appendixkarzinoide mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 85,9% [Modlin und Sandor 1997].

Die molekularbiologischen Veränderungen, die zur Entstehung von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren führen, sind weitgehend unbekannt. Jedoch scheinen bestimmte Signaltransduktionswege, die insbesondere das Wachstum und Überleben von Zellen kontrollieren, bei der Tumorigenese eine Rolle zu spielen. Zwei dieser Signaltransduktionswege sind die MAPK-Kaskade und der PI3K/Akt-Weg. Es gibt einige Hinweise, daß diese Signalwege auch in GEP-NET eine Rolle spielen [Hörsch et al. 2011]. Guo et al. [2003] beschrieben eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges in pankreatischen NET, wobei die MAPK-Kaskade herunterreguliert war. In IGF-1-stimulierten BON-Karzinoidzellen waren sowohl die PI3K/Akt- als auch die MAPK-Kaskade aktiviert [von Wichert et al. 2000]. Bei einigen NET zeigte sich eine Überexpression des Protoonkogens Ras, welches beide genannten Signalwege aktivieren kann [Rindi et al. 2000].

In dieser Arbeit sollen MAPK, Akt und der Transkriptionsfaktor CREB, der u.a. das Überleben der β -Zellen vermittelt [Jhala et al. 2003] und über MAPK und Akt stimuliert werden kann, näher betrachtet werden.

1.2 Signaltransduktionskaskaden

Durch Signaltransduktionskaskaden werden externe Stimuli wie Hormone und Zytokine nach intrazellulär weitergeleitet. Nach Bindung an spezifische

Rezeptoren kommt es an der Innenseite der Zellmembran zur Aktivierung sequentiell agierender Proteinkinasen, die über reversible Phosphorylierung gesteuert werden. Die Endglieder dieser Kaskaden können in den Zellkern translozieren. Hier werden die Signale in Form einer veränderten Expression von Genen umgesetzt, welche Einfluss auf den Stoffwechsel und andere Prozesse wie z.B. die Differenzierung der Zelle nimmt.

Charakteristisch für die Signaltransduktion ist eine häufige Verzweigung der Signalwege, wobei sich verschiedene Kaskaden über Schnittstellen, gemeinsame Aktivatoren oder Substrate gegenseitig beeinflussen können.

1.2.1 Die MAPK-Signalkaskade

Die MAP-Kinasen (mitogen aktivierte Protein-Kinasen) sind Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden. Säugetierzellen besitzen mindestens sechs Untergruppen der MAP-Kinase Familien, von denen bisher drei näher beschrieben sind: die p38-MAP-Kinasen, die Jun amino-terminalen Kinasen (JNKs) oder auch stressaktivierte Proteinkinasen (SAPKs) genannt und die extrazellulär signal-regulierten Kinasen (ERKs) [Roux und Blenis 2004].

Alle MAP-Kinasekaskaden funktionieren nach dem gleichen Prinzip: eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) phosphoryliert eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK), die wiederum ihrerseits eine MAP-Kinase (MAPK) phosphoryliert und somit aktiviert. Die MAPK aktiviert weitere Proteinkinasen oder phosphoryliert im Zellkern Transkriptionsfaktoren [Kolch 2000, Burotto et al. 2014] (Abb. 1).

Auf die p38-MAP-Kinasen und JNKs/SAPKs, die insbesondere durch zellulären Streß, Entzündungsmediatoren und Ischämie aktiviert werden, soll hier nicht näher eingegangen werden. ERK, in der Literatur oft gleichgesetzt mit MAPK, kontrolliert in der Zelle fundamentale Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Überleben und Apoptose [Kolch 2000; Hunter 1995; Marshall 1995].

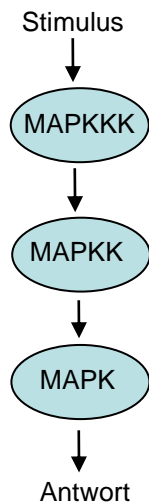


Abbildung 1: Prinzip der MAP-Kinasekaskade

Aktivierung und Substrate

ERK kann über unterschiedliche extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, neurotrophische Faktoren und Neurotransmitter aktiviert werden. Diese Signalmoleküle stimulieren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), die dann das Signal über Adapterproteine (Shc, Grb-2) und Sos (ein GTP-Austauschfaktor) an das GTP-bindende Protein Ras weitergeben. Durch die Bindung von Sos an Ras und den Austausch von GDP gegen GTP erfolgt die Aktivierung von Ras.

Ras funktioniert als Adapter, der Raf-Kinasen (das sind MAPKKK) mit hoher Affinität bindet und ihre Translokation zur Zellmembran bewirkt. Hier findet die Aktivierung dieser Serin/Threonin-spezifischen Raf-Kinasen statt. In neuroendokrinen Zellen kann das kleine G-Protein Rap Raf (B-Raf) aktivieren. Ursprünglich wurde Rap als ein Raf-Inhibitor entdeckt, es kann aber unter bestimmten Umständen auch eine Stimulation des MAPK-Signalweges bewirken [Hagemann und Rapp 1999; Kolch 2000; Aksamitiene et al. 2012]. Sowohl Ras als auch Raf sind Proto-Onkogene [Hunter 1995; Kolch 2000].

In Säugetierzellen sind drei Raf-Isoformen vorhanden: Raf-1, A-Raf und B-Raf. Alle drei Raf-Proteine haben als Substrat die zytoplasmatische MEK1/2 (MAP- oder ERK-Kinase), eine MAPKK. Diese doppelspezifische Kinase phosphoryliert ERK1 und ERK2 (p44/p42-MAPK) an Threonin- und Tyrosinresten, die so

aktiviert werden. Beide Isoformen von ERK sind funktionell gleichwertig, es ist unklar warum zwei Gene für ERK existieren [Kolch 2000].

ERK ist eine Serin/Threonin-Kinase, die viele verschiedene Substrate in allen zellulären Kompartimenten phosphorylieren kann, darunter Membranproteine, zytoskeletale Proteine, nukleäre Substrate (z.B. ELK-1, SRC-1, NF-AT, MEF2, c-Myc, STAT3) und mehrere MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MKs, z.B. RSK1/2) [Roux und Blenis 2004].

Die Proteinkinase RSK2 phosphoryliert unter anderem den Transkriptionsfaktor CREB und inaktiviert das proapoptische Bad [Bonni et al. 1999]. Auch ELK-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der aber direkt durch ERK im Nukleus aktiviert wird [Hunter 1995; Xing et al. 1996]. ELK-1 bindet zusammen mit dem Serum Response Faktor (SRF) an das Serum Response Element (SRE) in IEG-Promotoren. IEGs (immediate early genes), sogenannte „frühe Gene“, werden in deutlichem Abstand vor dem Eintritt der Zellen in die S-Phase induziert. Viele dieser IEGs kodieren für Transkriptionsfaktoren, so auch das Proto-Onkogen c-fos. Die Induktion der c-fos Transkription (Wachstumsfaktor-induziert) benötigt neben SRE-bindenden Proteinen noch den Transkriptionsfaktor CREB, der den c-fos Promotor an anderen Stellen, den sogenannten CREs bindet [Ginty et al. 1994] (Abb. 2).

Spezifität der einzelnen Kaskaden wird gewährleistet über Substratspezifität, spezifische Bindungsdomänen und Gerüstproteine wie Ksr und 14-3-3. Solche Gerüstproteine organisieren Signalwege in spezifischen Modulen durch gleichzeitige Bindung von mehreren Komponenten [Xing et al. 1997; Kolch 2000].

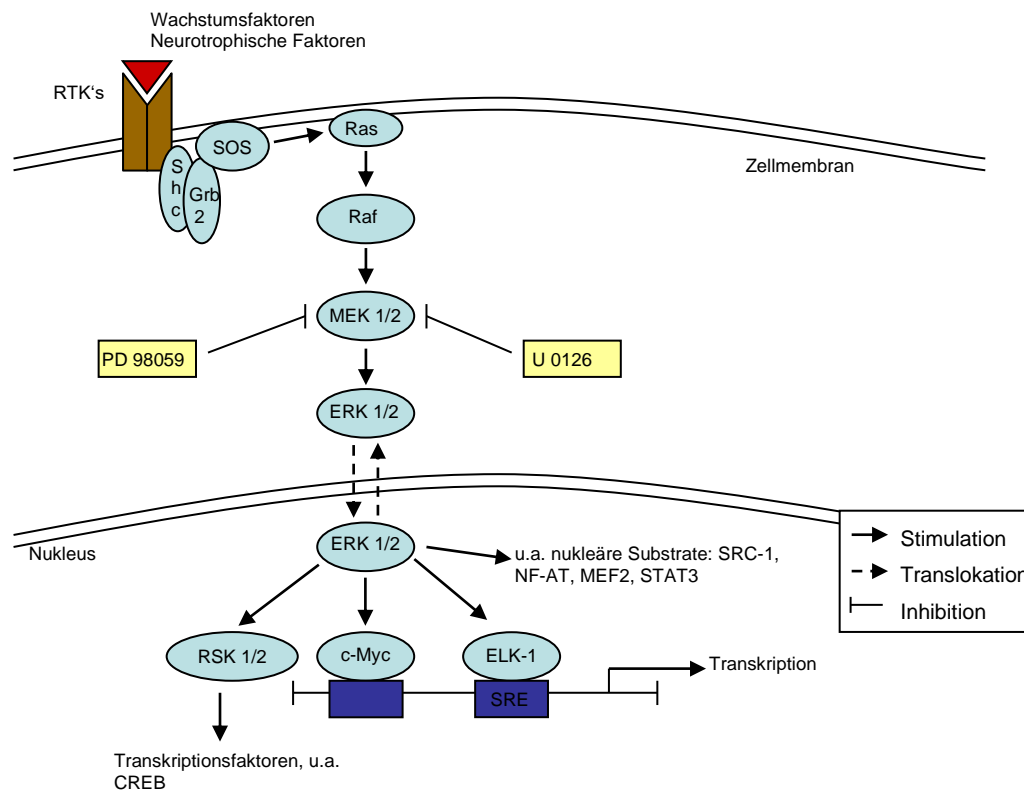


Abbildung 2: Die Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade.

Inaktivierung

Die Inaktivierung der MAP-Kinasen erfolgt über dual-spezifische MAPK-Phosphatasen (MKP). Auch die meisten anderen Komponenten der MAPK-Signaltransduktionswege werden durch Dephosphorylierung inaktiviert [Hunter 1995; Cobb 1999].

MAPK und Tumorigenese

In einer Reihe von Tumorarten konnte ein Zusammenhang zwischen der MAPK-Aktivität und Tumorstadium nachgewiesen werden. Im Experiment führte eine konstitutiv aktive MAPK zur Bildung von Tumoren in vivo [Mansour 1994]. Hoshino et al. [1999] fanden erhöhte MAPK-Level vor allem in Tumorzelllinien von Pankreas, Lunge, Kolon, Ovar und Niere. Auch in histologischen Schnitten konnte dies bestätigt werden. In Meningeomen [Mawrin et al. 2005] und Melanomen [AlQathama und Prieto 2015; Mirmohammadsadegh et al. 2007; Brose et al. 2002] scheint die MAPK ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen.

Bisher wurden zwar keine Mutationen gefunden, welche die MAPK selbst aktivieren [Cobb 1999], aber häufig war eine erhöhte MAPK-Aktivität mit Ras- oder Raf-Mutationen vergesellschaftet [Brose et al. 2002; Davies et al. 2002].

Inhibitoren des MAPK-Signaltransduktionsweges

Auf der Suche nach Substanzen, die diesen Signalweg spezifisch blockieren fand man U0126 und PD98059. Beide sind nichtkompetitive Inhibitoren von MEK und verhindern die Aktivierung von ERK [Cobb 1999; Davies et al. 2002; Roux und Blenis 2004]. Ein weiterer Inhibitor von MEK1/2 ist Selumetinib, welches in einigen Studien zur Behandlung von Karzinomen eingesetzt wurde [Burotto et al. 2014]. Auch der Raf-Inhibitor BAY43-9006 (Sorafenib) verhindert die Signaltransduktion über die MAPK [Wilhelm et al. 2004; Murphy et al. 2006].

1.2.2 Der Signaltransduktionsfaktor Akt

Aktivierung und Substrate

Ein weiterer wichtiger Signaltransduktionsweg ist der Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg. Die Proteinkinase Akt, auch PKB (Proteinkinase B) genannt, spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle grundlegender zellulärer Funktionen wie Proliferation und Überleben. Zuerst wurde Akt als ein zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-Akt beschrieben. Inzwischen sind in Säugetieren drei Isoformen bekannt: Akt1, Akt2 und Akt3 [Datta et al. 1999; Coffey et al. 1998; Dancy 2004]. Die Aktivität von Akt wird durch Wachstumsfaktoren wie IGF-1, PDGF, EGF, bFGF und Insulin reguliert, welche über Rezeptoren (v.a. RTKs) die PI3-Kinase aktivieren [Burgering und Coffey 1995; Franke et al. 1997; Datta et al. 1999].

Spezifische Phosphotyrosinreste am Rezeptor oder assoziierten Adapterproteinen binden an SH2-Domänen (Src-homology 2) der PI3K und rekrutieren diese zur Zellmembran. Hier stimuliert die PI3K, die aus den beiden Untereinheiten p85 und p110 besteht, die Produktion von Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PI-3,4P2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PI-3,4,5P3). Es kommt zu einer Translokation von Akt aus dem Zytosol zur Zellmembran, wo Akt mit seiner

PH-Domäne (pleckstrin-homology) an diese Lipide bindet. Durch die Lokalisation an der Zellmembran kann Akt von PDK 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase) in Interaktion mit anderen Proteinen an Thr308 und Ser473 phosphoryliert und somit aktiviert werden [Franke et al. 1997; Coffey et al. 1998; Datta et al. 1999].

Die Aktivierung der PI3K (und damit von Akt) kann auch über die GTPase Ras erfolgen. Der Raf/MEK/ERK-Transduktionsweg kann gleichzeitig aktiviert werden [Rommel et al. 1999; Aksamitiene et al. 2012] oder unbeeinflusst bleiben [Franke et al. 1997]. Akt kann mit Raf interagieren und auf diese Weise den MAPK-Signalweg inhibieren [Rommel et al. 1999; Zimmermann und Moelling 1999; Brose et al. 2002]. Nach der Aktivierung wird Akt wieder ins Zytosol freigesetzt und phosphoryliert dort oder auch im Zellkern [Du und Montminy 1998; Pugazhenti et al. 2000] verschiedene Proteine.

Für die Onkogenese bedeutsame Substrate von Akt sind Bad, Caspase 9 und Forkhead Transkriptionsfaktoren. Diese Substrate führen in aktiviertem Zustand über unterschiedliche Mechanismen zu Apoptose. Akt inaktiviert Bad, Caspase 9 und Forkhead Transkriptionsfaktoren mittels Phosphorylierung und verhindert so den Zelltod [Datta et al. 1999] (siehe Abb. 3).

Neben der Forkhead Familie werden noch andere Transkriptionsfaktoren direkt oder indirekt von Akt reguliert, so auch CREB und NF- κ B. Beide werden von Akt aktiviert und fördern das Überleben der Zelle [Datta et al. 1999; Pugazhenti et al. 2000; Luo et al. 2003]. Ein weiteres Substrat von Akt ist mTOR, eine Kinase, die die Translation bestimmter mRNA-Abschnitte reguliert [Luo et al. 2003; Dancey 2004].

Es wird angenommen, daß eine Überexpression von Akt die physiologische Apoptose blockiert und es auf diese Weise zu Tumorwachstum kommen kann [Vivanco und Sawyers 2002].

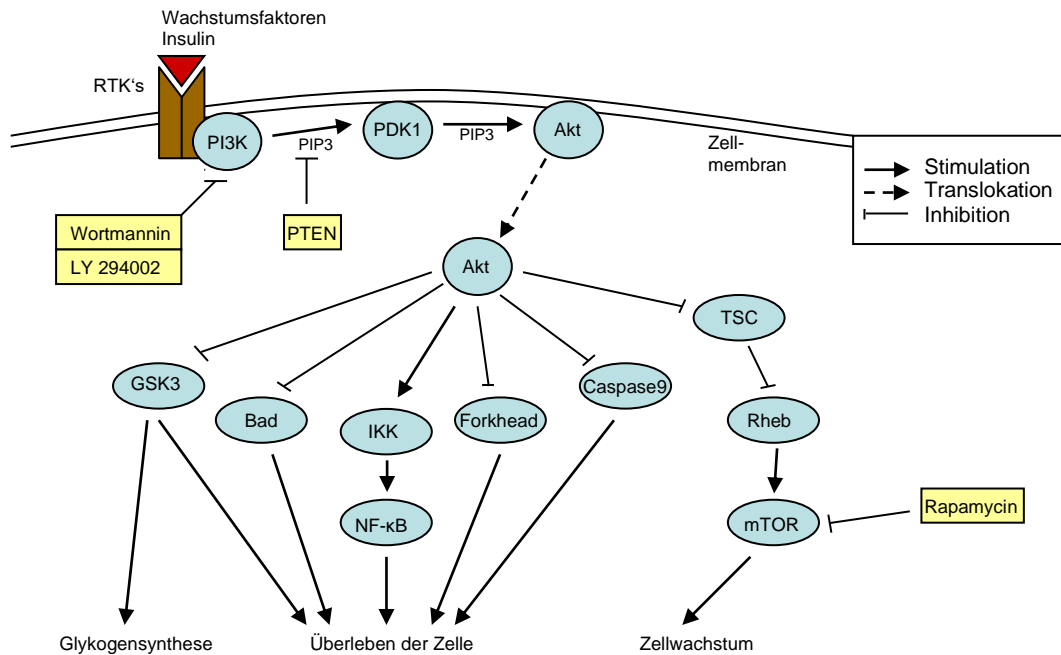


Abbildung 3: Der Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K)/ Akt-Signalweg. Erläuterungen siehe Text.

Inaktivierung

Die Inaktivierung von PI3K und Akt erfolgt durch Dephosphorylierung. Der wahrscheinlich bedeutendste negative Regulator des PI3K/Akt-Signalweg ist der Tumorsuppressor PTEN. PTEN ist eine Phosphatase, die PI-3,4,5P₃ dephosphoryliert und auf diese Weise Akt herunterreguliert [Datta et al. 1999; Luo et al. 2003; Dancey 2004].

Akt und Tumorigenese

Verluste von PTEN, Erhöhung der PI3K-Level und Überexpression von Akt konnten in vielen Tumorarten nachgewiesen werden [Datta et al. 1999; Khwaja 1999; Vivanco und Sawyers 2002; Wang et al. 2016]. Außerdem führte eine anhaltende Signaltransduktion über den PI3K/Akt-Weg zu Resistenzen auf zytotoxische Substanzen, Bestrahlung und EGF-Rezeptor-Inhibitoren [Dancey 2004].

Vor allem in Ovar-, Mamma-, Pankreaskarzinomen, Kolonkarzinomen [Vivanco und Sawyers 2002; Wang et al. 2016] und kleinzelligen Bronchialkarzinomen

[Krystal et al. 2002] wurden Veränderungen des PI3K/Akt-Signalweges identifiziert. Mutationen im PTEN-Gen waren sehr häufig bei Glioblastomen, Melanomen, Prostatakarzinomen und Endometriumkarzinomen, nicht ganz so oft bei Mammatumoren, Bronchialkarzinomen und Lymphomen zu finden [Cantley und Neel 1999].

Weiterhin vermuten einige Autoren einen Zusammenhang zwischen Akt-Überexpression und Aggressivität bzw. Invasivität von Tumoren [Bellacosa et al. 1995; Coffey et al. 1998; Mitsiades et al. 2004, Wang et al. 2016]. Mawrin et al. [2005] beschrieben hohe Akt-Level besonders in atypischen und anaplastischen Meningeomen, wobei benigne Tumoren eine deutlich geringere Expression zeigten. Hier waren aber im Gegensatz zu malignen Meningeomen die Kinasen Raf und MAPK vermehrt aktiviert.

Inhibitoren des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges

Die Komponenten der PI3K/Akt-Kaskade sind vielversprechende Angriffspunkte für eine therapeutische Intervention. Deswegen wurde auch intensiv nach Substanzen gesucht, die diesen Transduktionsweg blockieren. Wortmannin und LY294002 sind PI3K-Inhibitoren, die die katalytische Untereinheit p110 als Ziel haben. Beide Substanzen hemmen das Zellwachstum und induzieren in höheren Konzentrationen Apoptose sowohl in vitro als auch (in Mausmodellen) in vivo [Luo et al. 2003; Dancey 2004]. Da aber die Tumorigenese nur einen Teil der zellulären Prozesse ausmacht, die durch die PI3K gesteuert werden, wäre eine Blockade relativ unspezifisch und würde wahrscheinlich nachteilige Effekte z.B. auf den Metabolismus haben. Besser bzw. spezifischer wäre die Hemmung weiter „stromabwärts“ liegender Komponenten. Eine solche weiter flußabwärts liegende Komponente ist die Kinase mTOR, die durch Rapamycin inhibiert werden kann [Phan und Dave 2016]. Rapamycin hat fungizide, immunsuppressive und antiproliferative Eigenschaften, außerdem scheint es die Wirkung einiger zytotoxischer Substanzen zu verstärken [Dancey 2004].

1.2.3 Der Transkriptionsfaktor CREB

Aktivierung und Substrate

CREB (cAMP response element binding protein) ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Leuzinzipper-Superfamilie gehört. Er ist eng mit CREM und ATF-1 (ebenfalls Transkriptionsfaktoren) verwandt und hat eine große Bedeutung bei vielen zellulären Funktionen. Dazu gehören Proliferation, Differenzierung, adaptive und metabolische Prozesse. Weiterhin wird angenommen, daß CREB wichtig für Erinnerung und Lernprozesse ist und zur neuronalen Adaptation bei Drogenabusus beiträgt [Shaywitz und Greenberg 1999].

CREB kann über eine Vielzahl extrazellulärer Signale aktiviert werden. Neurotransmitter, Hormone, Membrandepolarisation, Wachstumsfaktoren, Steß, Chemotherapeutika und neurotrophische Faktoren führen über verschiedenste Signaltransduktionswege zu einer Phosphorylierung an Ser133 und damit zur Aktivierung von CREB [Sheng et al. 1991; Ginty et al. 1994; Muthusamy und Leiden 1998; Shaywitz und Greenberg 1999; Steven et al. 2020]. Die Phosphorylierung an anderen Serin Thyrosin- und Threonin-Resten wird seltener beobachtet [Johanessen et al 2004].

Die Aktivierung kann über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK), den Ras-abhängigen MAPK-Transduktionsweg [Muthusamy und Leiden 1998; Ginty et al. 1994; Lonze und Ginty 2002] und/oder über den PI3K/Akt-Signalweg [Du und Montminy 1998; Pugazhenti et al. 2000] erfolgen. Mehrere Kinasen können CREB direkt phosphorylieren: PKA, Akt, CaMK II/IV, außerdem RSK und MSK, die am Ende der MAPK-Kaskade stehen [Shaywitz und Greenberg 1999; Lonze und Ginty 2002]. Weiterhin kann CREB durch schädliche Stimuli (z.B. Hypoxie) über steßaktivierte Kinasen wie SAPK2/p38MAPK bzw. die stomabwärts liegenden MAPKAP-Kinasen und MSK aktiviert werden [Lonze und Ginty 2000].

CREB bindet als Homodimer oder Heterodimer (mit CREM oder ATF-1) an der DNA bestimmte Regulatorsequenzen, sogenannte cAMP response elements (CREs). Diese CREs bestehen aus der palindromischen Konsensussequenz TGACGTCA. Abhängig davon, welche zusätzlichen Basen außer der Konsensussequenz die CRE-Stelle enthält, binden CREB und ATF-1 mit unterschiedlicher Affinität an die DNA (Abb. 4).

Die Phosphorylierung an Ser133 führt zur Rekrutierung und Bindung des Coaktivators CBP (CREB-bindendes Protein). CBP und sein enger Verwandter p300 sind große Moleküle, die eine Komplexbildung zwischen den verschiedenen Transkriptionskomponenten erleichtern. Durch die Interaktion des CREB-CBP Komplexes mit der basalen Transkriptionsmaschinerie und die daraus folgende transkriptionelle Aktivierung der Zielgene greift CREB in eine Vielzahl physiologischer Prozesse ein [Hunter 1995; Muthusamy und Leiden 1998; Shaywitz und Greenberg 1999; Lonze und Ginty 2002].

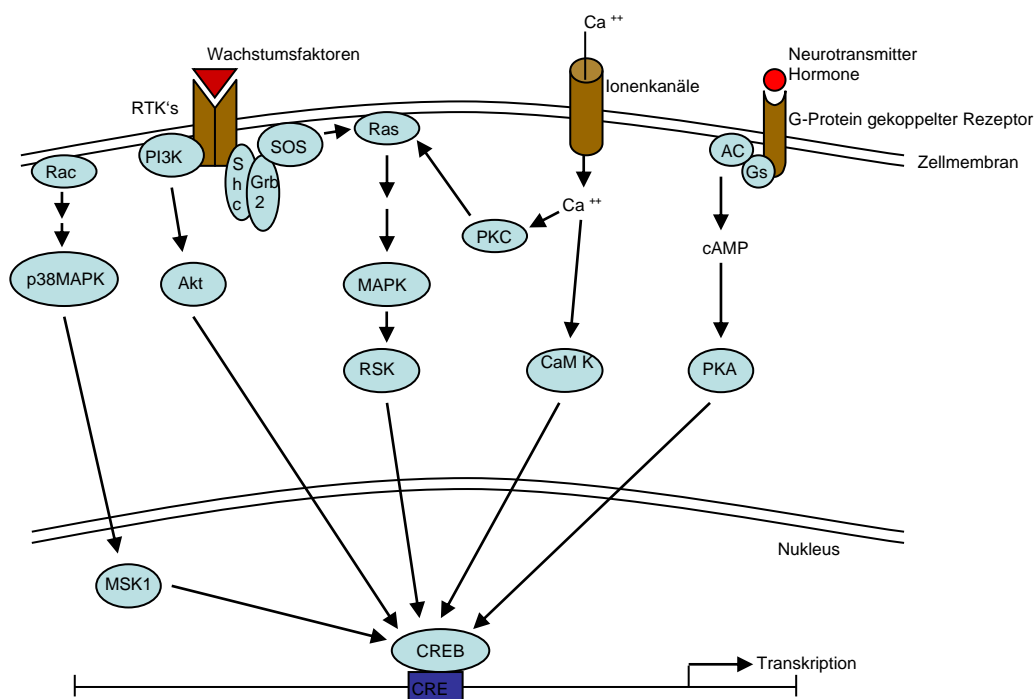


Abbildung 4: Aktivierungsmechanismen von CREB. Erläuterungen siehe Text.

Die CREB-Aktivität und Spezifität kann durch Assoziation mit weiteren Proteinen oder Phosphorylierung zusätzlicher Reste moduliert werden [Shaywitz und Greenberg 1999].

Zu den zahlreichen Zielgenen von CREB gehören unter anderem Gene, die die Signaltransduktion, Transkription, Neurotransmission und den Metabolismus kontrollieren. Per Definition besitzen alle Zielgene ein oder mehrere CREs in

ihren Promotoren, ansonsten haben diese Gene wenige Gemeinsamkeiten. Dazu gehören, um nur einige wenige zu nennen, die Gene für Somatostatin, Proglucagon, Acetylcholinesterase, Vasopressin, IGF-1, Fibronectin, GLUT2, Na/K-ATPase, Cyclooxygenase-2, Cytochrom c, Bcl-2, 14-3-3, STAT-3, c-fos [Lonze und Ginty 2002].

Das am besten untersuchte von CREB gesteuerte Gen ist das Onkogen c-fos, das für Transkriptionsfaktoren kodiert.

Insbesondere für das Überleben der Zelle scheint CREB durch die Regulation von Pro-Überlebensfaktoren wie z.B. Bcl-2 eine wichtige Rolle zu spielen [Bonni et al. 1999; Pugazhenti et al. 2000; Lonze und Ginty 2002]. Bcl-2 hemmt die Apoptose und wird neben dem p38MAPK-Weg auch über den PI3K/Akt-Signalweg stimuliert [Pugazhenti et al. 2000].

Inaktivierung

CREB wird wie MAPK und Akt mittels Dephosphorylierung inaktiviert. Dies erfolgt durch die Phosphatasen PP1, PP2A und die nukleäre PTEN Phosphatase [Lonze und Ginty 2002, Gu et al. 2011].

CREB und Tumoren

In Tumoren wurden unterschiedliche Mechanismen bzw. Ursachen einer CREB-Überexpression entdeckt. Rosenberg et al. [2002] fanden in Wachstumshormonproduzierenden Adenomen Veränderungen des cAMP/PKA-Signalweges mit einer verstärkten Phosphorylierung von CREB. Auch beim Brustkrebs wurden erhöhte cAMP-abhängige CREB-Level beschrieben [Sofi et al. 2003]. Mukoepidermoid- und Warthin-Tumoren (Speicheldrüsentumoren) produzierten aufgrund einer Translokation ein Fusionsprotein, das die CREB-abhängige Transkription induzierte [Wu et al. 2005]. Weiterhin zeigten Jean und Bar-Eli [2000], daß CREB und assoziierte Proteine eine wichtige Rolle für Tumorwachstum und Metastasierung von Melanomzellen spielen. Auch im Knochenmark von Patienten mit akuter Leukämie wurde CREB vermehrt exprimiert [Crans-Vargas et al. 2002; Shankar et al. 2005; Cho et. Al. 2011]. Hierbei war eine erhöhte CREB-Expression mit einer Persistenz der Krankheit, einem erhöhten Rückfallrisiko und einem verminderten ereignisfreien Überleben

assoziiert [Shankar et al. 2005]. Weiterhin können auch virale Onkoproteine wie das humane T-Zell Leukämie-Virus (HTLV-1) und das Hepatitis B-Virus (HBV) CREB aktivieren.

Aber nicht in allen untersuchten Tumoren war eine CREB-Überexpression festzustellen. In Nebennierenrindenzarzinomen [Peri et al. 2001; Rosenberg et al. 2003] und Schilddrüsenkarzinomen [Luciani et al. 2003] wurden signifikant niedrigere CREB-Level gefunden als in den korrespondierenden normalen Geweben und Adenomen.

CREB-Inhibitoren

Da CREB nicht nur für das Zellüberleben, sondern auch in vielen anderen physiologischen Prozessen eine zentrale Position einnimmt, wäre eine Blockade in vivo relativ schwerwiegend. Eine komplette Unterbrechung der CREB-Funktion in Mäusen war nicht mit dem Leben vereinbar, bei inkompletter Unterbrechung zeigten sich verschiedene pathologische Zustände [Rudolph et al. 1998]. Obwohl CREB in vielen Tumoren vermehrt exprimiert wird, scheint eine therapeutische Inhibierung von CREB selbst deshalb nicht sinnvoll.

Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus können die depolarisationsinduzierte Aktivierung von CREB verhindern, wahrscheinlich durch die Hemmung des Coaktivators CBP [Oetjen et al. 2005].

Weitere Möglichkeiten der Einflußnahme auf die CREB-Aktivität bestehen in der Blockade von Komponenten der Signaltransduktionswege, die CREB stimulieren.

1.3 Aufgabenstellung

Die molekulare Pathogenese von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren ist größtenteils unbekannt. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren kommen in GEP-NET Mutationen in klassischen Onkogenen wie Ras, myc, Fos, Src und Jun oder Tumorsuppressorgenen wie p53 und dem Retinoblastomsuszeptibilitäts-gen nicht vor. Auch eine Überexpression von EGF-Rezeptoren wurde in NET nicht beobachtet. Zwar finden sich in einigen NET Veränderungen des MEN1-Gens oder des RET-Protoonkogens, aber in den meisten GEP-NET sind diese Mutationen nicht vorhanden [Calender 2000; Jensen 2005].

In vielen Tumoren wurde eine vermehrte Aktivierung von zellulären Signaltransduktionswegen festgestellt, die vor allem das Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen regulieren und die Apoptose inhibieren. Sowohl die MAPK-Signalkaskade als auch der PI3K/Akt-Transduktionsweg vermitteln eben diese Funktionen.

Eine Aktivierung der MAPK-Kaskade wurde vor allem in Pankreas-, Lungen-, Kolonkarzinomen, Ovarial- und Nierentumoren nachgewiesen [Hoshino et al. 1999]. In Mamma-, Ovarial-, Pankreas-, Magen-, Bronchialkarzinomen [Coffer et al. 1998] und Melanomen [Luo et al. 2003] fand sich oft eine Erhöhung der Komponenten des PI3K/Akt-Weges. Auch für die Aktivierung dieser Signalkaskaden in neuroendokrinen Tumoren gibt es einige Hinweise [von Wichert et al. 2000; Guo et al. 2003].

Die Komponenten beider Wege und ihre stromabwärts liegenden Substrate stellen somit vielversprechende potentielle Angriffspunkte für antineoplastische Substanzen dar. Außerdem kann das Wissen über die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung diagnostische und prognostische Marker bereitstellen.

Auf dieser Grundlage sollen hier die Insulinom-Zelllinie INS1, Insulinome, Gastrinome und Karzinoide auf eine verstärkte Aktivierung oben genannter Signalwege untersucht werden. Dazu wird die Expression von MAPK (ERK1/2), Akt und dem Transkriptionsfaktor CREB, der u.a. auch von diesen beiden Signaltransduktionswegen aktiviert werden kann, immunhistochemisch nachgewiesen. Es werden hierzu phosphospezifische Antikörper gegen die

aktivierten Formen und Antikörper, die auch an die inaktiven Formen von MAPK, Akt und CREB binden, verwendet.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind daher:

1. Werden MAPK, Akt und CREB in INS1-Zellen nach glukoseabhängiger Stimulation aktiviert?
2. Werden MAPK, Akt und CREB in neuroendokrinen Tumoren (Insulinomen, Gastrinomen und Karzinoiden) vermehrt exprimiert?
3. Gibt es hinsichtlich der Aktivierung von MAPK, Akt und CREB zwischen den drei untersuchten Tumorarten Unterschiede?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden von den Firmen Bayer, Cambrex, Cell Signaling, Chroma, DADE Behring, Fluka, Invitrogen, J.T. Baker, Merck, PAA Laboratories, Roth, Sigma und Vector Laboratories bezogen.

Die Materialien kamen von den Firmen Brand, Eppendorf, Feather, Hecht, Heidolph, Kodak, Menzel, Schleicher & Schuell Serva und Vogel.

Geräte wurden von den Firmen Heraeus, Kobe, Medax, Mettler, Olympus und Reichert-Jung verwendet (genaue Auflistung im Anhang).

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebe von Neuroendokrinen Tumoren

Insgesamt wurden 25 Insulinome, 14 Gastrinome und 20 Karzinoide untersucht. Die Tumorproben stammen aus chirurgischen Tumor(teil-)resektionen zwischen 1983 und 2000 in der Abteilung für Allgemeinchirurgie der Philipps-Universität Marburg. Nach der Fixierung in Bouin Lösung oder Formalin wurde das Gewebe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Von jedem Paraffinblock wurden zehn Folgeschnitte angefertigt und nach der ABC- Methode immunhistochemisch gefärbt.

2.2.2 INS-1 Zellen und Zellkultur

Als Kontrolle wurde die Insulinoma-Zelllinie der Ratte INS-1E - als Modell für eine glukosesensitive β -Zelllinie - verwendet. Die Zellen dieser differenzierten Zelllinie INS-1 wurden mit GLP-1 stimuliert. GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) ist ein glukoseabhängiger Wachstums- und Differenzierungsfaktor für pankreatische β -Zellen, durch den unterschiedliche mitogene Signaltransduktionswege aktiviert werden [Buteau et al. 1999; Hui et al. 2001]. Daneben stimuliert GLP-1 die Transkription des Proinsulin-Gens und die Biosynthese von Insulin. Die Aktivierung von GLP-1 Rezeptoren bei hohen Glukosekonzentration resultiert in einer Potenzierung der Insulinsekretion und Gentranskription [Kieffer und Habener 1999].

Die INS-1 Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit Zusatz von 10% FBS (fetales bovines Serum), 10mM HEPES, 1mM Natriumpyruvat, 50 μ M Mercaptoethanol und 100mM Ciproflaxin bei einer Temperatur von 37°C gezüchtet. Vor der Stimulation wurden die Zellen 16 Stunden mit Stimulationsmedium (RPMI 1640 ohne Glukose, Natriumpyruvat, Antibiotikum und mit 1% FBS) mit Glukosekonzentrationen von 2,5mM bzw. 15mM inkubiert. Eine Stunde vor der Zugabe von GLP-1 erfolgte ein Medienwechsel. Die Stimulation wurde über 30 min mit 0,4 μ l GLP-1/ml Medium durchgeführt. Danach wurde das Medium abgekippt, die Zellen mit Lysisbuffer abgelöst, bei 1200rpm 6min zentrifugiert und in 10%v/v Formalin bei 4°C über Nacht fixiert. Dann erfolgte die Entwässerung und Paraffineinbettung.

2.2.3 Paraffineinbettung

Durchführung:

1. Abkippen des Formalins
2. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96% und 100% Ethanol je 1 Std.)
3. Methylbenzoat auf das Zellpellet geben (über Nacht), abkippen
4. Xylol für 10min, abkippen

5. Paraffin (60°C heiß) auf das Pellet schütten, 4x wechseln
6. Blöcke gießen: heißes Paraffin in ein Förmchen geben, das Zellpellet mit einer Pinzette in die Mitte des Förmchens bringen
7. Kühlen der Blöcke, Aufbewahrung bei –20°C

2.2.4 Anfertigen histologischer Schnitte am Mikrotom

Durchführung:

1. Einspannen und Justieren des Paraffinblocks
2. Aufsuchen der Schnittebene und Anfertigen von Folgeschnitten (4 µm dünn)
3. Schnitte in Küvetten mit Ethanol (30%) geben, dann in Wasserbad (40°C) zur Streckung der Schnitte
4. Schnitte auf Objektträger bringen
5. Trocknen der Objektträger auf der Heizplatte (40°C)
6. Trocknen der Objektträger im Brutschrank bei 40°C über Nacht
7. Aufbewahrung der Schnitte bei Raumtemperatur

2.2.5 Die ABC-Methode und ihre Fehlerquellen

Die Avidin-Biotin-Komplextchnik macht sich die hohe Affinität von Avidin (bzw. Streptavidin) zu Biotin zunutze. Es werden ein Primärantikörper, ein biotinylierter Sekundärantikörper und ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin Komplex benötigt.

Der Primärantikörper richtet sich gegen das zu untersuchende Peptid. An den primären Antikörper bindet der mit Biotin markierte Sekundärantikörper (Brückenantikörper). Das Glykoprotein Avidin ist über Biotinmoleküle mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Die freien Bindungsstellen des Avidin ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. In Anwesenheit eines Elektronendonors (hier DAB) bildet sich ein Enzym-Substratkomplex mit anschließender Oxidation dieses Elektronendonors. Das DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) wandelt sich durch die Oxidation in ein unlösliches braun gefärbtes Reaktionsprodukt um und wird daher auch als Chromogen bezeichnet.

Auf diese Weise wird die Antikörperbindungsstelle und somit das zu untersuchende Peptid sichtbar gemacht (Abb. 5).

Eine mögliche Fehlerquelle bei der ABC-Methode ist eine unspezifische Anfärbung des Präparates, die nicht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung beruht. Ursache ist meist eine Anlagerung von Proteinen (Primärantikörper) an stark geladene Gewebeelemente. Um solch eine unspezifische Färbung zu vermeiden, wird vor Zugabe des Primärantikörpers eine neutrale Proteinlösung aufgetragen. Die neutralen Proteine lagern sich an elektrisch geladene Stellen im Gewebe an und vermeiden so die Adsorption des Antikörpers.

Eine weitere Ursache für unerwünschte Anfärbungen besteht in der endogenen Peroxidaseaktivität, die sich vorrangig in den Erythrozyten befindet. Zur irreversiblen Blockade der endogenen Peroxidase werden die Präparate in ein Bad aus H_2O_2 und Methanol gegeben. Der Erfolg dieser Methode lässt sich leicht an den entfärbten Erythrozyten erkennen.

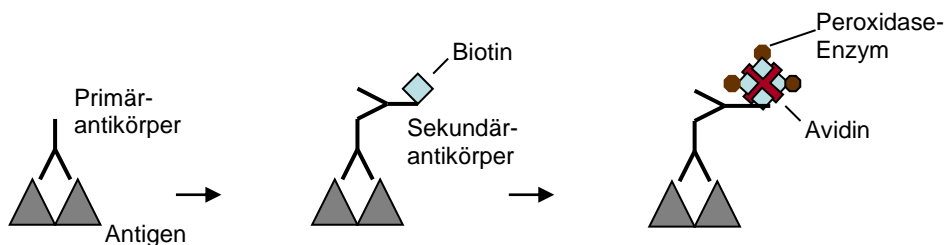


Abbildung 5: Die immunhistochemische ABC-Methode. Erläuterungen siehe Text.

2.2.6 Kontrollen

Als Negativkontrollen zum Ausschluss unspezifischer Anfärbungen wurden Schnitte mitgeführt, die statt des Primärantikörpers nur mit BSA inkubiert wurden. So konnte eine unspezifische Anfärbung durch die übrigen Reagenzien ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden Schnitte von gesundem humanen

Pankreasgewebe als Gewebekontrolle nach der gleichen Methode wie die Tumoren gefärbt.

2.2.7 Durchführung der ABC-Methode

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (4x5 min)
2. Hydrierung in absteigender Ethanolreihe (99% Ethanol 3x5 min, 96% Ethanol 3x5 min)
3. Methanolblockade mit 200ml Methanol und 6,6 ml 30% H₂O₂ (30 min)
4. Spülen in Aqua bidest. (4x2 min)
5. Kochen der Objektträger in Citratpuffer (25 min bei 600 Watt in der Mikrowelle) zur Antigendemaskierung, danach 20 min abkühlen lassen
6. Waschen in PBS-Puffer (2x10 min) und um den Gewebeschnitt herum trockentupfen
7. Inkubation der Schnitte mit verdünntem Normalserum (1:50 mit PBS) über 20 min bei Raumtemperatur, anschließend abkippen und um den Gewebeschnitt herum trockentupfen
8. Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C, Verdünnung des Antikörpers mit BSA (vortexen)
9. Waschen in PBS (2x10 min), anschließend trockentupfen
10. Inkubation mit dem verdünnten biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:200 mit PBS, vortexen)
11. Waschen in PBS (2x10 min), anschließend trockentupfen
12. Inkubation mit dem ABC-Reagenz für 30 min bei Raumtemperatur (30 min vorher ansetzen, vortexen)
13. Waschen mit PBS (2x10 min), anschließend trockentupfen
14. Waschen in TBS-Puffer (5 min)
15. Inkubation mit dem Peroxidase-Substrat DAB für 10 min im Dunklen
16. Waschen in Aqua bidest. (3x5 min)
17. Färbung in Hämalaunlösung (5 sec)
18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser (5 min)

19. Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe (2x70%, 1x80%, 2x96%, 4x99%)
jeweils 5 min und Xylol (4x5 min)
20. Eindeckeln mit DePeX

2.2.8 Auswertung und Fotodokumentation

Die Auswertung erfolgte am BH-2 Mikroskop von Olympus, die fotografische Dokumentation am Vanox AHB3 Mikroskop von Olympus mit EPY 64T Filmen von Kodak. Verwendet wurden ein 10er Okular mit einem 20er Objektiv.

Für jeden der verwendeten Antikörper wurde eine interne Gewebereferenz mit starker Expression festgelegt und als dreifach positiv (+++) gewertet. Hierbei musste eine Gewebestruktur gefunden werden, die in allen Schnitten vorhanden und gut identifizierbar ist. Nach Durchsicht der Präparate zeigte sich, dass in fast allen Schnitten Endothelzellen vorhanden und auch stark angefärbt waren. So wurden für jeden verwendeten Antikörper als interne Gewebereferenz Endothelzellen verwendet. Mit der Färbeintensität dieser Referenz wurden die Tumorzellen verglichen und dementsprechend von 0 bis +++ bewertet (siehe Tab.1).

Färbeintensität der Tumorzellen	Bewertung der Färbeintensität
Negativ, keine Anfärbung erkennbar	0
Schwache Färbung	+
Mäßige Färbung	++
Starke Färbung	+++

Tabelle 1: Bewertung der Färbeintensität

3 Ergebnisse

3.1 Normales Pankreasgewebe

Zunächst wurden die MAPK-, Akt- und CREB-Expression in normalem humanen Pankreasgewebe immunhistochemisch untersucht. Es fand sich eine mäßige MAPK-Expression des endokrinen Pankreas, der exokrine Teil war weniger stark angefärbt. P-MAPK, die aktivierte Form der MAPK, zeigte eine schwach positive Reaktion der Inselzellen, die exokrinen Zellen waren nicht gefärbt.

Akt zeigte eine mäßige und gleichmäßige Expression sowohl im endokrinen als auch exokrinen Teil. Bei der Untersuchung auf P-Akt war eine sehr schwache, aber ebenfalls relativ gleichmäßige Anfärbung der Inselzellen und des exokrinen Teils zu erkennen.

Bei den auf CREB untersuchten Schnitten waren die Kerne der endokrinen Zellen mäßig, bei vereinzelt Zellen stark positiv, die des restlichen Pankreas etwas schwächer angefärbt. Eine schwache P-CREB-Expression zeigte sich sowohl in endokrinen wie auch bei einzelnen exokrinen Zellen.

3.2 Expression von MAPK, Akt und CREB in INS-1 Zellen

Um herauszufinden ob MAPK, Akt und CREB in GEP-NET (Insulinomen) exprimiert werden und einer glukoseabhängigen Stimulation durch Wachstumsfaktoren unterliegen, wurden als ein Modell Insulin-produzierende INS-1 Zellen immunhistochemisch untersucht. Die Zellen wurden in Hungermedium mit 2,5mM bzw. 15mM Glukose inkubiert und dann mit GLP-1 stimuliert.

Makroskopisch wie auch mikroskopisch konnte bei MAPK, P-MAPK und Akt eine verstärkte Expression bei hohen Glukosespiegeln (15mM) im Vergleich zu niedrigen Glukosespiegeln (2,5mM) festgestellt werden. Auch CREB zeigte – wenn auch etwas weniger deutlich als bei oben genannten Faktoren – eine etwas stärkere Anfärbung bei hohen Glukosekonzentrationen. Sowohl P-Akt als auch P-

CREB zeigten nur eine schwache Anfärbung sowie keine deutliche Veränderung der Expression.

3.3 Referenzgewebe

Zur Beurteilung der Färbeintensität wurde für jedes der untersuchten Proteine ein internes Referenzgewebe mit starker Expression festgelegt.

MAPK und P-MAPK zeigten starke Expression in Endothelzellen und duktalem Zellen bzw. gangartigen Strukturen. Außerdem fanden sich in einigen Schnitten bei allen verwendeten Antikörpern (am deutlichsten bei P-MAPK und P-Akt) besonders im Bereich von Blutgefäßen einzelne sehr stark positive Zellen, vermutlich Leukozyten im Rahmen einer begleitenden Entzündungsreaktion (siehe Abb. 7 G). Als Referenzgewebe wurden Endothelzellen verwendet.

Die Festlegung einer Referenz für Akt gestaltete sich als schwierig, da kein Gewebe in allen Schnitten eindeutig positiv bzw. vorhanden war. Bei einigen Anschnitten vom Darm war eine Expression in Becherzellen und anderen Drüsenzellen vorhanden. Schließlich wurden ebenfalls Endothelzellen als Referenz genommen, da diese in den meisten der untersuchten Tumoren erkennbar und bewertbar waren. Sie waren überwiegend genauso stark angefärbt wie die Tumorzellen.

Bei der Untersuchung auf P-Akt wiesen Endothel und wenn vorhanden auch gangartige Strukturen eine intensive Färbung auf.

CREB und P-CREB zeigten eine stark positive Färbung der Kerne von Endothelzellen, gangartigen Strukturen und Fibroblasten. Aufgrund der besseren Identifizierung im Gewebe wurden Endothelzellen als Referenz gewählt (siehe Abb. 6).

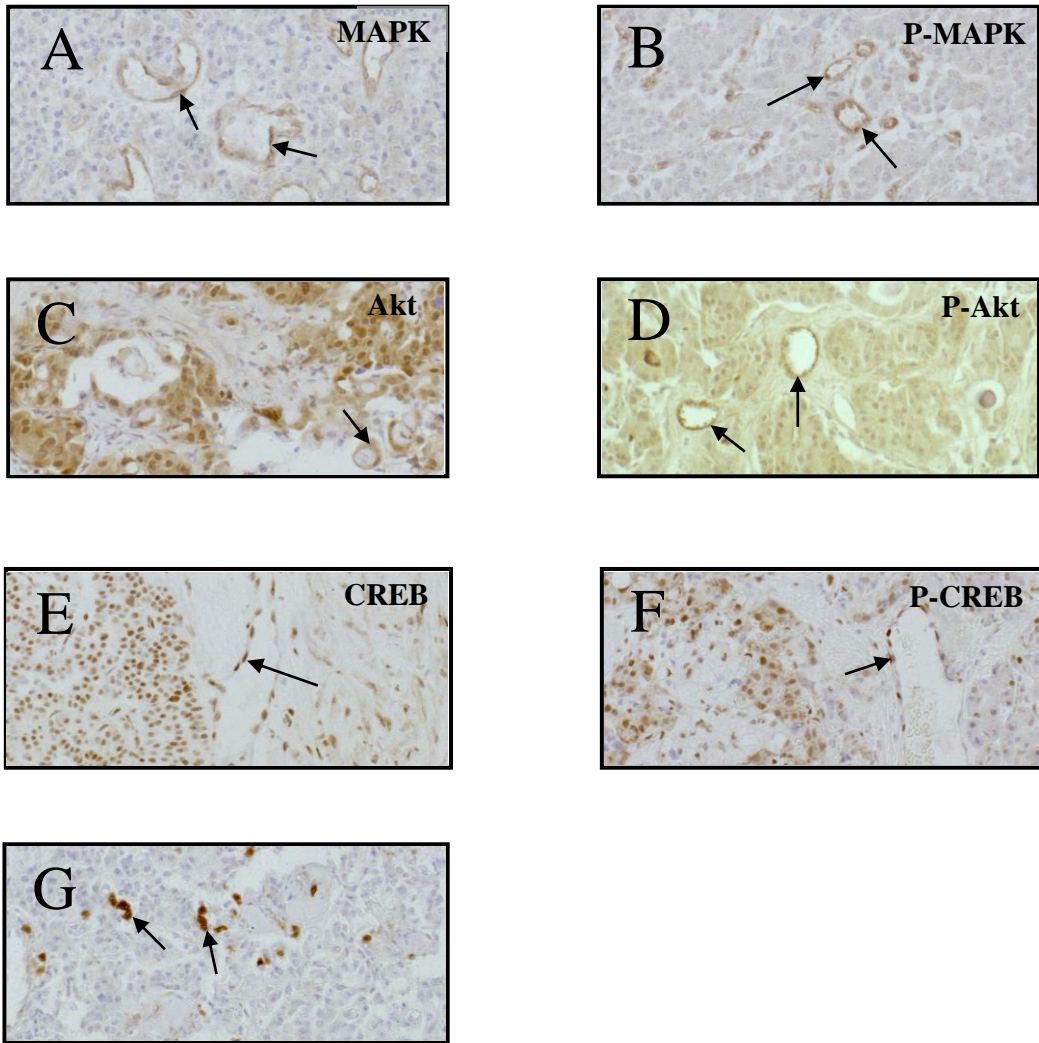


Abbildung 6: Endothelzellen als interne Gewebereferenzen (Pfeile A-F).
 Stark angefärbte Leukozyten (Pfeile G)

3.4 Expression von MAPK, Akt und CREB in GEP-NET

Die Expression von MAPK, Akt, CREB und ihren aktivierten Formen wurden in 25 Insulinomen, 20 Karzinoiden und 14 Gastrinomen mit der Immunhistochemie untersucht.

Sowohl bei den Insulinomen, Gastrinomen als auch Karzinoiden zeigten sich ähnliche Anfärbungsintensitäten. Die nicht aktivierten Formen aller drei Proteine wurden bis auf wenige Ausnahmen mäßig bis stark exprimiert. Dagegen wiesen

die aktivierten Formen große Unterschiede untereinander auf (siehe Tab. 2 und Abb.7-10).

		25 Insulinome		14 Gastrinome		20 Karzinoide		Gesamt (59 NET)	
MAPK	+	4	16%	0	-	2	10%	6	10%
	++	16	64%	4	29%	7	35%	27	46%
	+++	5	20%	10	71%	11	55%	26	44%
P-MAPK	+	20	80%	10	71%	15	75%	45	76%
	++	4	16%	3	21%	4	20%	11	19%
	+++	1	4%	1	7%	1	5%	3	5%
Akt	+	1	4%	0	-	0	-	1	2%
	++	3	12%	1	7%	2	10%	6	10%
	+++	21	84%	13	93%	18	90%	52	88%
P-Akt	+	5	20%	6	43%	1	5%	12	20%
	++	16	64%	7	50%	14	70%	37	63%
	+++	4	16%	1	7%	5	25%	10	17%
CREB	+	0	-	0	-	0	-	0	-
	++	2	8%	1	7%	2	10%	5	8%
	+++	23	92%	13	93%	18	90%	54	92%
P-CREB	+	3	12%	0	-	6	30%	9	15%
	++	4	16%	7	50%	5	25%	16	27%
	+++	18	72%	7	50%	9	45%	34	58%

Tabelle 2: Expression von MAPK, Akt und CREB in den untersuchten NET in absoluten Zahlen und Prozentzahlen

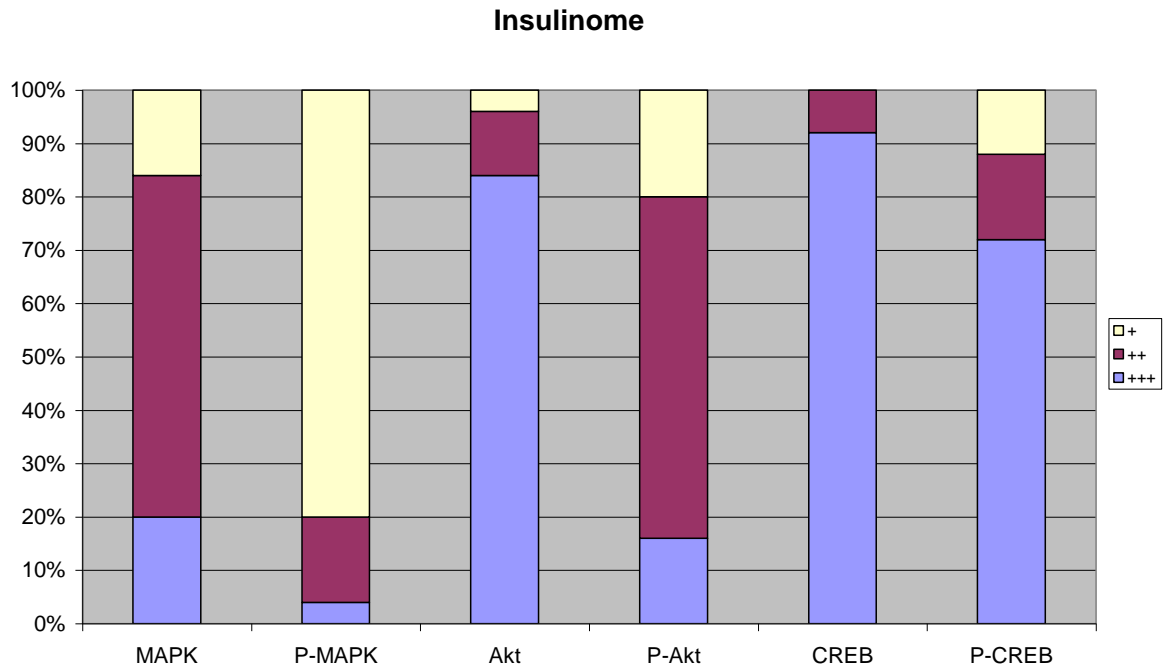


Abbildung 7a: Expression und Verteilung von MAPK, Akt und CREB in den untersuchten Insulinomen

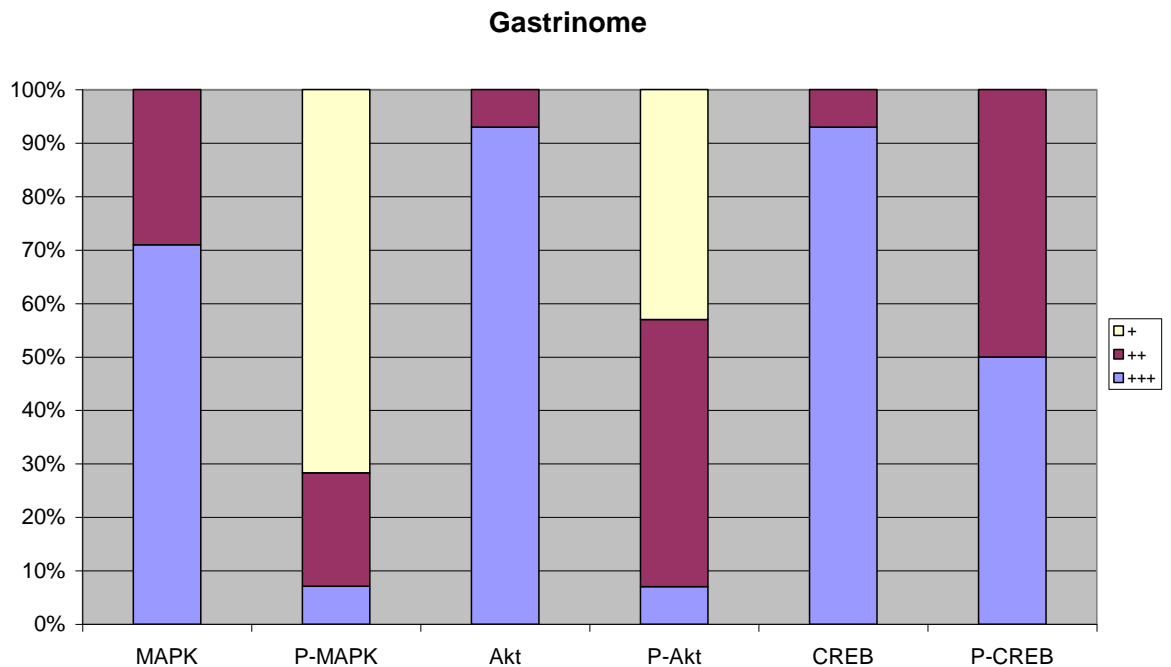


Abbildung 7b: Expression und Verteilung von MAPK, Akt und CREB in den untersuchten Gastrinomen

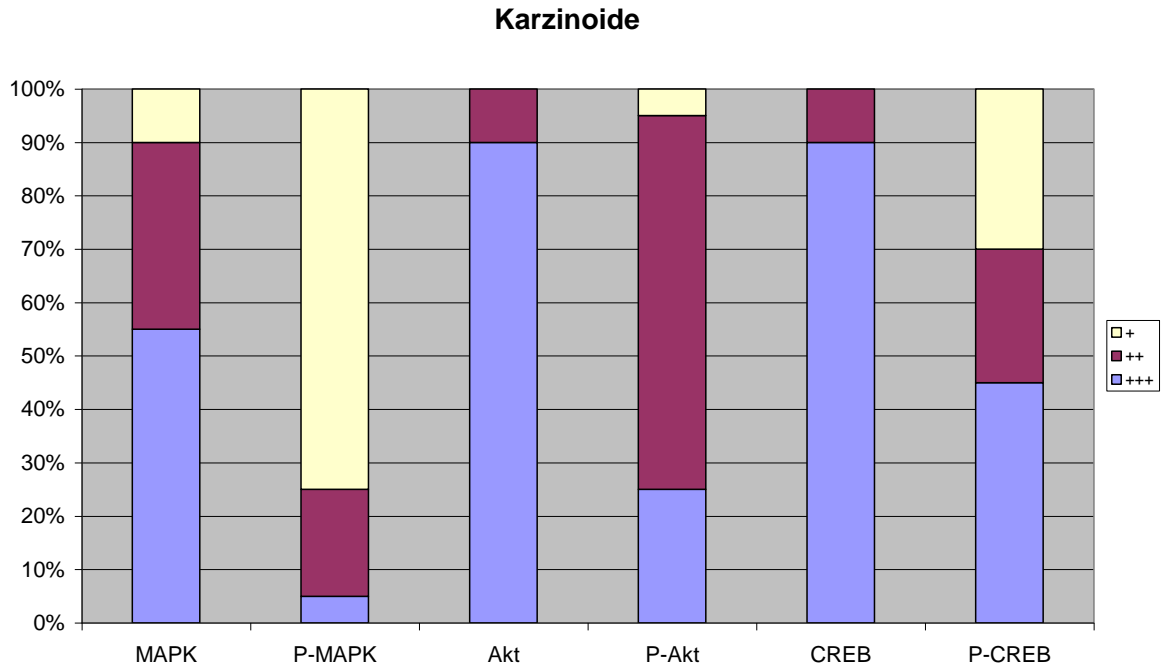


Abbildung 7c: Expression und Verteilung von MAPK, Akt und CREB in den untersuchten Karzinoiden

MAPK

Nur wenige Schnitte wurden als schwach positiv gewertet, darunter waren Tumoren, die sich auch mit den anderen verwendeten Antikörpern nur schlecht anfärben ließen. Der überwiegende Teil der GEP-NET zeigte eine mäßige (27 von 59) bis starke (26 von 59) Anfärbung, dabei fand sich bei den untersuchten Insulinomen im Gegensatz zu Gastrinomen und Karzinoiden häufiger eine nur mäßige Färbung. Nur 5 der 25 untersuchten Insulinome waren stark angefärbt, im Gegensatz dazu 10 von 14 Gastrinomen und 11 von 20 Karzinoiden. 16 Insulinome, 4 Gastrinome und 7 Karzinoide wiesen eine mäßige Expression auf. Der Anteil an schwach positiv gewerteten Tumoren war bei den Insulinomen (16) höher als bei Gastrinomen (4) und Karzinoiden (7). Die intensivste Färbung fand sich bei den untersuchten Gastrinomen.

Im Vergleich zu Akt und CREB wurden die MAPK-Schnitte trotz guter Anfärbung oft als nur mäßig positiv gewertet. Der Grund dafür war die oft sehr starke Anfärbung des Endothels, das als internes Referenzgewebe diente. Im Vergleich zu den untersuchten normalen Pankreasschnitten bzw. Inselzellen ließ

sich in den Tumorgeweben eine deutlich stärkere Expression von MAPK nachweisen.

P-MAPK

Bei etwa drei Viertel der Tumoren fand sich nur eine schwach positive Reaktion, bei 20 Insulinomen, 10 Gastrinomen und 15 Karzinoiden. Eine mäßige Anfärbung zeigte sich bei je 4 Insulinomen und Karzinoiden sowie bei 3 Gastrinomen. Nur je ein Insulinom, Gastrinom und Karzinoid konnten als stark positiv bewertet werden. Dabei zeigten auch nicht alle Tumorzellen, sondern nur einzelne Zellen bzw. Zellverbände eine starke Expression.

Beim Vergleich von MAPK und P-MAPK fiel auf, dass bei der aktivierten Form von MAPK zwischen den Insulinomen, Gastrinomen und Karzinoiden keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Anfärbungsintensität vorliegen. Im Gegensatz dazu fand sich bei der Expression von MAPK wie oben beschrieben die am wenigsten intensive Anfärbung bei Insulinomen und die stärkste Anfärbung bei Gastrinomen.

Akt

Akt wurde mit wenigen Ausnahmen in allen Tumoren stark exprimiert. 21 von 25 Insulinomen, 13 von 14 Gastrinomen und 18 von 20 Karzinoiden konnten als dreifach positiv gewertet werden. Eine schwache Anfärbung fand sich bei 1 Insulinom, eine mäßige Färbung bei 3 Insulinomen, 1 Gastrinom und 2 Karzinoiden. Somit zeigten sich auch bei Akt außer einer geringfügig schwächeren Expression in Insulinomen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den untersuchten GEP-NET.

Verglichen mit den normalen Pankreasschnitten fand sich auch hier eine verstärkte Anfärbung der Tumorgewebe.

P-Akt

Die meisten untersuchten Tumoren zeigten eine mäßige Anfärbung. Im Gegensatz zu Insulinomen und Karzinomen fand sich bei Gastrinomen zu einem deutlich größeren Prozentsatz eine nur schwache Expression. Bei den Insulinomen waren 5 von 25, den Gastrinomen 6 von 14 und den Karzinoiden 1 von 20 schwach angefärbt. Als mäßig positiv wurden 16 Insulinome, 7 Gastrinome und 14

Karzinome gewertet, eine starke Expression fand sich bei 4 Insulinomen, 1 Gastrinom und 5 Karzinomen. Bei gemeinsamer Betrachtung von zeigten etwa 80% der Insulinome, 60% der Gastrinome und 95% der Karzinome eine mäßige bis starke Expression von P-Akt.

Im Gegensatz zur Expression von Akt, wo sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Tumorarten ergaben, zeigte sich bei P-Akt eine deutlich geringere Anfärbung der Gastrinome als bei den Insulinomen und Karzinomen.

Im Vergleich zur aktivierten Form von MAPK mit insgesamt eher schwacher Expression fand sich bei P-Akt sowohl bei Insulinomen und Karzinomen wie auch bei Gastrinomen eine intensivere Färbung.

CREB

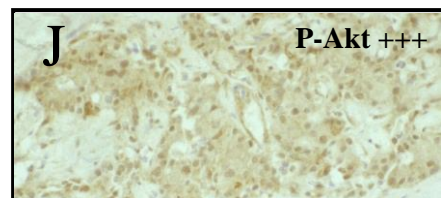
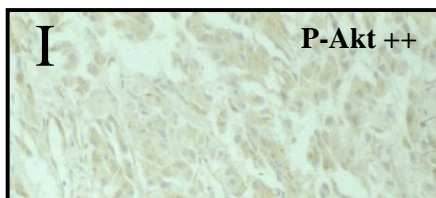
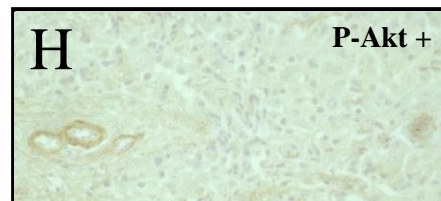
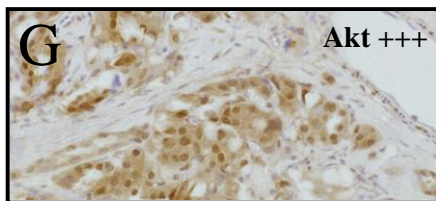
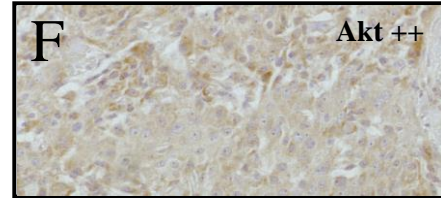
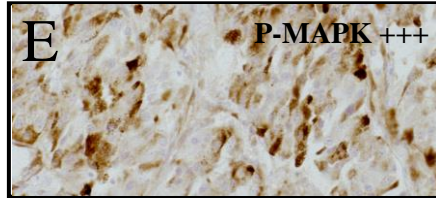
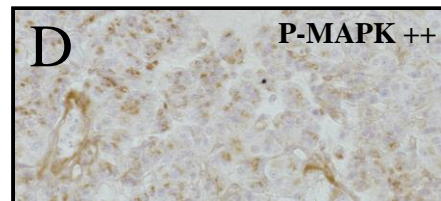
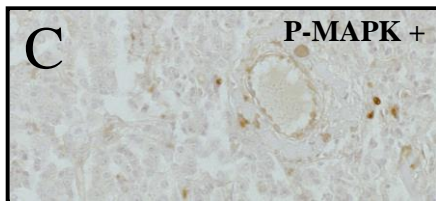
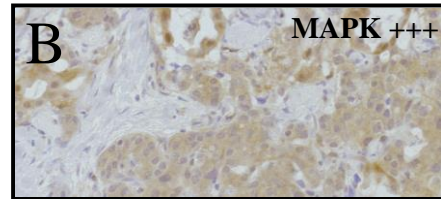
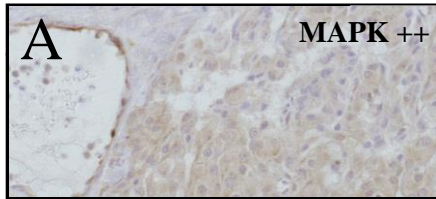
In fast allen Schnitten war eine intensive Kernfärbung der Tumorzellen vorhanden. Eine mäßig positive Färbung fand sich nur bei 5 von insgesamt 59 untersuchten Tumoren – bei 2 Insulinomen, 1 Gastrinom und 2 Karzinomen. Eine schwach positive Färbung war bei keinem der Schnitte festzustellen. Zwischen den 3 Tumorarten zeigte sich kein Unterschied, eine starke Färbung fand sich bei etwa 90% aller Schnitte (23 Insulinome, 13 Gastrinome und 18 Karzinome). Im Vergleich zu MAPK und Akt wurde CREB in allen NET deutlich stärker exprimiert, auch war hier nicht vor allem das Zytosol sondern der Kern intensiv angefärbt.

Auch der Unterschied zum normalen Pankreasgewebe war hier am größten. Alle untersuchten Tumoren wiesen eine deutlich stärkere Färbung auf als die normalen Pankreasschnitte.

P-CREB

Auch bei der phosphorylierten Form von CREB zeigte sich ganz überwiegend eine starke, weniger häufig eine mäßige Expression. Etwa ein Drittel der Karzinome (6 von 20) war nur schwach angefärbt, bei Insulinomen 3 von 25. Keines der Gastrinome wies eine schwach positive Färbung auf. Eine mäßige Färbung fand sich bei 4 Insulinomen, 7 Gastrinomen und 5 Karzinomen, eine starke Expression zeigte sich bei 18 Insulinomen, 7 Gastrinomen und 9 Karzinomen. Im Gegensatz zur Expression von CREB, wo sich keine Unterschiede zwischen den drei Tumorarten ergaben, zeigte sich bei P-CREB eine

etwas geringere Anfärbung der Karzinoide. Weiterhin waren im Vergleich zu CREB in den Schnitten auch deutlich weniger Zellen bzw. Kerne angefärbt. Insgesamt fand sich bei P-CREB jedoch eine deutlich stärkere Expression als bei den anderen beiden aktivierten Formen P-MAPK und P-Akt.



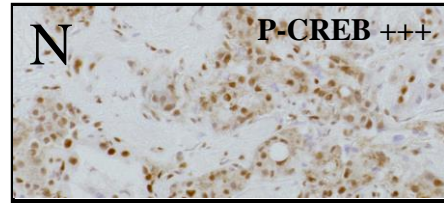
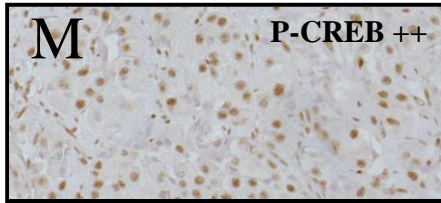
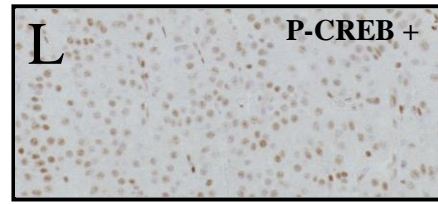
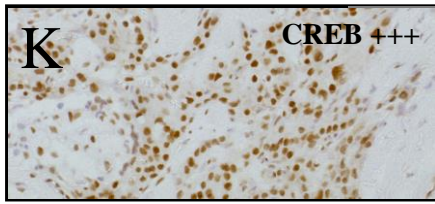
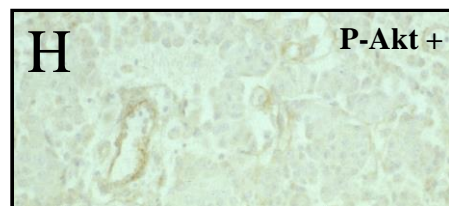
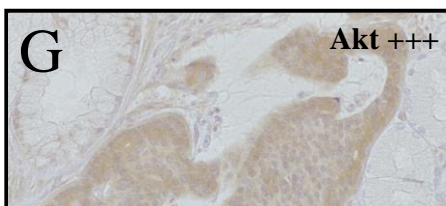
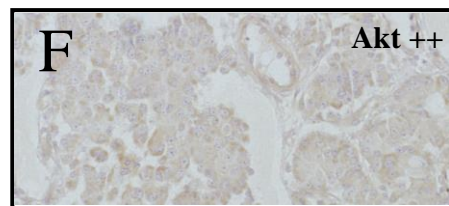
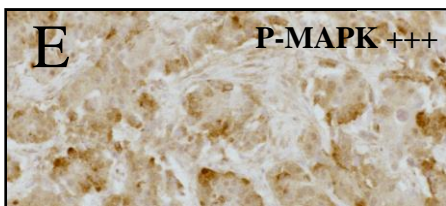
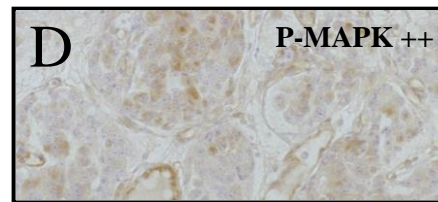
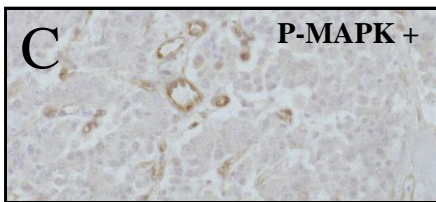
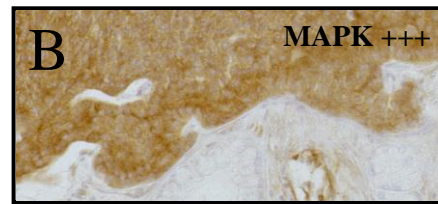
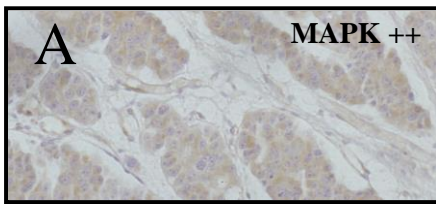


Abbildung 8: Die unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von MAPK, Akt und CREB und deren aktivierten Formen in Insulinomen (A-N).



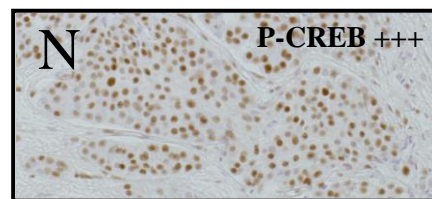
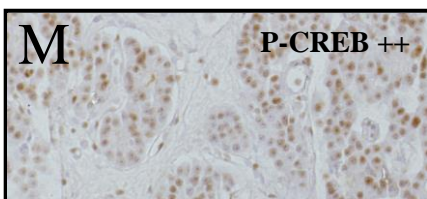
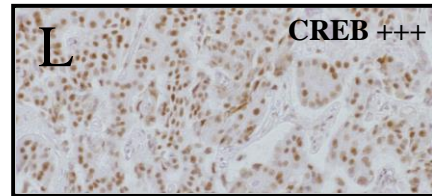
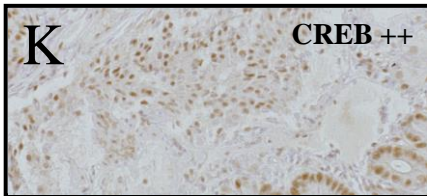
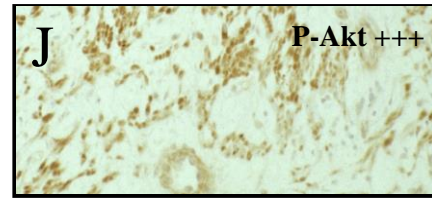
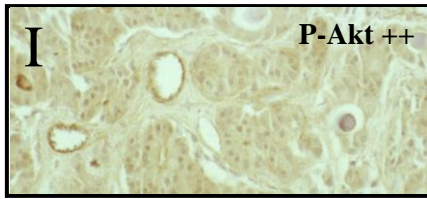
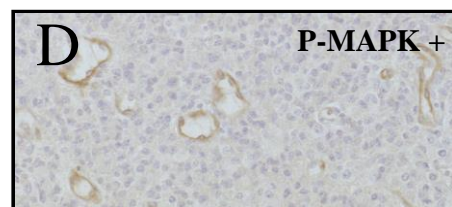
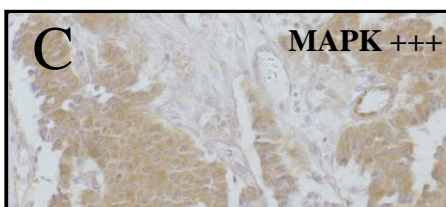
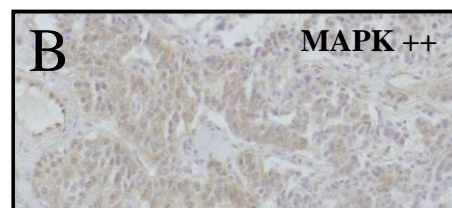
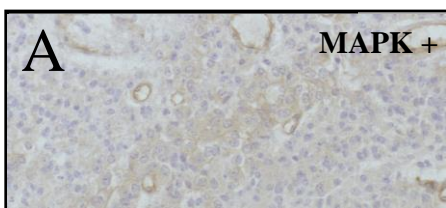


Abbildung 9: Die unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von MAPK, Akt und CREB und deren aktivierten Formen in Gastrinomen (A-N).



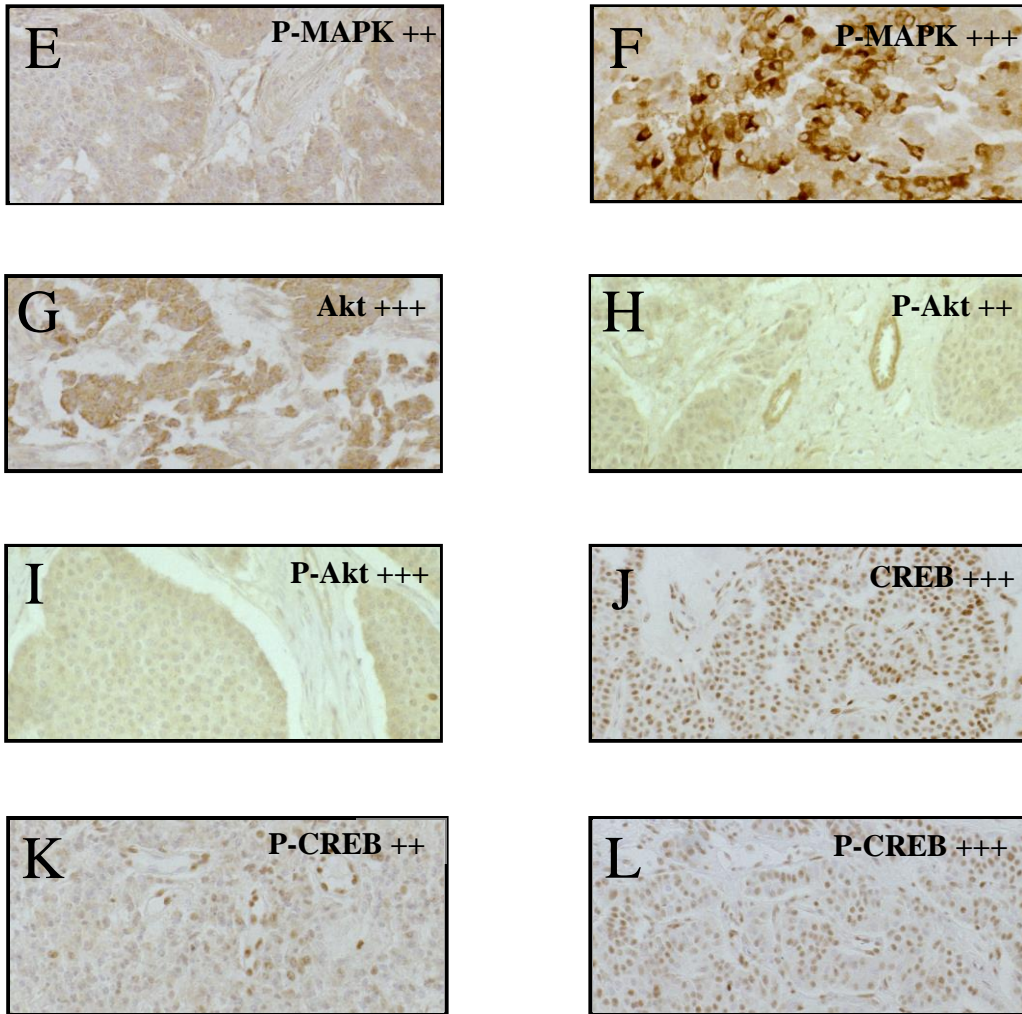


Abbildung 10: Die unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von MAPK, Akt und CREB und deren aktivierten Formen in Karzinoiden (A-L).

4 Diskussion

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NET) stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren dar, deren molekulare Pathogenese größtenteils unbekannt ist. Da die meisten GEP-NET nicht oder nur schlecht auf eine Chemotherapie ansprechen, hat die Suche nach potentiellen molekularen Angriffspunkten für antineoplastische Substanzen an Bedeutung gewonnen [Schnirer et al. 2003; Öberg 2003; Öberg und Eriksson 2005]. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit die Signaltransduktionsfaktoren MAPK, Akt und der Transkriptionsfaktor CREB auf eine verstärkte Expression in GEP-NET immunhistochemisch untersucht. Die Relevanz dieser Faktoren und ihrer zugehörigen Signaltransduktionswege in Karzinomen wurde von zahlreichen Autoren bereits beschrieben.

4.1 Normales Pankreasgewebe

Zunächst wurde als Kontrolle die Expression oben genannter Faktoren und ihrer aktivierten (phosphorylierten) Formen in normalem, gesunden Pankreasgewebe untersucht.

Bei der Untersuchung auf MAPK und P-MAPK fand sich eine deutlich stärkere Anfärbung des endokrinen Teils in Vergleich zum restlichen Pankreas. Dieses Ergebnis ist einleuchtend, da der MAPK-Signalweg unter anderem die Expression und damit auch Transkription von Genen vermittelt, die für Insulin kodieren. Die Phosphorylierung von MAPK erfolgt glukoseabhängig und führt ihrerseits wiederum zur Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren [Khoo und Cobb 1997].

Im Gegensatz dazu zeigten Akt und P-Akt eine relativ gleichmäßige Anfärbung des gesamten Pankreas. Obwohl viele Autoren die Bedeutung von Akt in β -Zellen beschrieben haben, insbesondere für Proliferation und Überleben [Trümper et al. 2000; Wang et al. 2004], konnte hier kein Unterschied der Expression zwischen endokrinem und exokrinem Teil nachgewiesen werden. Zu erwähnen ist jedoch auch, dass so grundlegende Funktionen wie Zellwachstum und Überleben auch in allen anderen Zellarten von großer Wichtigkeit sind.

Der cAMP/PKA/CREB-Signalweg spielt ebenfalls eine zentrale Rolle in der Genexpression und Funktion der β -Zellen [Hussain et al. 2006]. Dies spiegelte sich auch in der Anfärbung auf CREB wider. Die Zellkerne der Inselzellen waren mäßig, wenige vereinzelte Kerne stark angefärbt. Es war eine deutlich schwächere Expression in den Kernen des exokrinen Teils zu erkennen. Bei der Untersuchung auf P-CREB fand sich nur eine sehr schwache, kaum beurteilbare Anfärbung.

4.2 INS-1 Zellen

Weiterhin wurden Zellen der differenzierten β -Zelllinie INS-1 gezüchtet, bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2,5 mM und 15 mM) inkubiert und mit GLP-1 stimuliert. Nach entsprechender Verarbeitung erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung.

Es zeigte sich, dass sowohl MAPK, P-MAPK als auch Akt in INS-1 Zellen einer glukoseabhängigen Stimulation unterliegen. Die bei hoher Glukosekonzentration inkubierten Zellen zeigten im Vergleich zu denen bei niedriger Glukose inkubierten eine deutlich stärkere Anfärbung. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der Arbeit von Trümper et al. [2005]. Hier wurde eine GLP-1 stimulierte, glukoseabhängige Aktivierung des MAPK- und Akt-Signalweg in INS-1 Zellen mit Immunkomplex-Assays nachgewiesen.

Bei P-Akt fand sich nur eine sehr schwache Anfärbung, ein eindeutiger Unterschied zwischen niedriger und hoher Glukosekonzentration war nicht erkennbar. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Fehler bei dem verwendeten Antikörper selbst liegt, da sich viele der anderen untersuchten Präparate ebenfalls nur schlecht anfärben ließen.

Auch CREB unterlag einer glukoseabhängigen Stimulation, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Trümper et al. [2001]. Insgesamt war die Färbung auf CREB in INS-1 Zellen jedoch schwach und an der Grenze der Beurteilbarkeit, ganz anders als bei den untersuchten Tumorpräparaten (s.u.).

Warum P-CREB keine bzw. nur eine sehr schwache, nicht beurteilbare Anfärbung aufwies ist unklar. Interessanterweise war dies auch bei dem untersuchten normalen Pankreasgewebe der Fall (s.o.). Aber ganz im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten die meisten Tumorpräparate eine ganz eindeutige, mäßig bis

stark positive Expression sowohl von CREB als auch der phosphorylierten Form, P-CREB (s.u.).

4.3 Expression von MAPK, Akt und CREB in GEP-NET

Nach den Vorversuchen an gesundem Pankreasgewebe und INS-1 Zellen wurden Insulinome, Gastrinome und Karzinoide immunhistochemisch auf eine Expression von MAPK, Akt und CREB untersucht.

4.3.1 MAPK

Eine erhöhte MAPK-Aktivität konnte in Tumorzelllinien von Pankreas, Kolon, Lunge, Ovar und Niere nachgewiesen werden [Hoshino et al. 1999], ebenso wie in Meningeomen [Mawrin et al. 2005], Prostatakarzinomen [Burger et al. 2006] und Melanomen [Brose et al. 2002; Mirmohammadsadegh et al. 2007]. Darüber hinaus verursachten erhöhte MAPK-Level in verschiedenen Melanomzelllinien eine verminderte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika [Mirmohammadsadegh et al. 2007]. Die meist konstitutiv erhöhten MAPK-Level waren häufig mit Ras- oder Raf-Mutationen vergesellschaftet [Hoshino et al. 1999; Brose et al. 2002; Davies et al. 2002].

Aber nicht in allen untersuchten Tumoren fand sich eine vermehrte Aktivierung von MAPK. So zeigten zum Beispiel Zelllinien von Ösophagus, Magen, Leber und hämatopoetischem Ursprung keine oder nur gering erhöhte MAPK-Aktivität [Hoshino et al. 1999]. Weiterhin wurde in Merkelzell-Karzinomzellen eine komplette Deaktivierung des MAPK-Signalweges festgestellt, was - im Gegensatz zu den meisten anderen Karzinomen - hier essentiell für das Überleben des Tumors war [Houben et al. 2007].

Auch in neuroendokrinen Tumoren scheint der MAPK-Signaltransduktionsweg von Bedeutung zu sein. Tannapfel et al. [2005] konnten konstitutiv aktivierte, also phosphorylierte MAPK in fast allen untersuchten GEP-NET nachweisen. Dabei fand sich nur eine schwache Expression von P-MAPK in normalen Inselzellen.

Genau umgekehrt verhielt es sich mit der nicht aktivierten Form, es zeigte sich eine starke Färbung der normalen Inselzellen, aber nur eine schwache Expression in dNETs. Passend dazu wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine mäßige bis starke MAPK-Expression in GEP-NET gefunden. Allerdings ließen sich die Ergebnisse nicht eins zu eins vergleichen. Neben der unterschiedlichen Fragestellung der Arbeit von Tannapfel et al., bei der es hauptsächlich um Mutationen des MAPK-Aktivators B-Raf ging, wurden in beiden Arbeiten unterschiedliche Antikörper verwendet. Im Gegensatz zu der Arbeit von Tannapfel et al. wurde hier ein p44/42 MAPK Antikörper benutzt, der sowohl nicht phosphorylierte als auch phosphorylierte MAPK erkennt. Dementsprechend fand sich eine insgesamt stärkere Expression der nicht aktivierten und eine schwächere Anfärbung der aktivierten Form. Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass die MAPK in GEP-NET im Vergleich zu normalen Inselzellen verstärkt exprimiert wurde. In einem kleineren Teil der GEP-NET konnte auch eine vermehrte Aktivierung der MAPK nachgewiesen werden. Die genauen molekularen Zusammenhänge erhöhter MAPK-Level in NET sind jedoch bisher unklar. B-Raf Mutationen scheinen bei der Entstehung von GEP-NET keine Rolle zu spielen [Tannapfel et al. 2005]. Weiterhin konnte in NET eine Aktivierung von MAPK (über B-Raf) durch die GTPase Rap1 gezeigt werden [Karthoff et al. 2007], außerdem wurden alternative Signalwege beschrieben. Eine Inhibierung von Rac1 und Cdc42 (zwei GTPasen) führte zu einer MAPK-Aktivierung, an der Raf, MEK sowie auch PI3K und Akt beteiligt waren [Zugasti et al. 2001].

4.3.2 Akt

Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges ist eine der häufigsten molekularen Veränderungen in Karzinomen [Altomare und Testa 2005; Bellacosa et al. 2005]. In vielen Tumoren konnten Verluste des Tumorsuppressors PTEN, Erhöhung der PI3K-Level und eine Überexpression von Akt nachgewiesen werden [Datta et al. 1999; Khwaja 1999; Vivanco und Sawyers 2002]. Zudem führte eine anhaltende Signaltransduktion über den PI3K/Akt-Weg zu Resistenzen auf zytotoxische Substanzen, Bestrahlung und EGF-Rezeptor-Inhibitoren [Dancey 2004; Altomare

und Testa 2005]. Vor allem in Ovar-, Mamma-, Pankreaskarzinomen, Kolonkarzinomen [Vivanco und Sawyers 2002] und kleinzelligen Bronchialkarzinomen [Krystal et al. 2002] konnten Veränderungen der PI3K/Akt-Signalkaskade identifiziert werden. Mutationen des PTEN-Gen waren sehr häufig in Glioblastomen, Melanomen, Prostatakarzinomen und Endometriumkarzinomen, nicht ganz so oft in Mammatumoren, Bronchialkarzinomen und Lymphomen zu finden [Cantley und Neel 1999]. Außerdem vermuten einige Autoren einen Zusammenhang zwischen einer Akt-Überexpression und Aggressivität bzw. Invasivität von Tumoren [Bellacosa et al. 1995; Coffey et al. 1998; Mitsiades et al. 2004; Altomare und Testa 2005; Mawrin et al. 2005].

Inwieweit der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg an der Bildung neuroendokriner Tumoren beteiligt ist, ist noch weitgehend unklar. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass Akt sowohl in INS-1 β -Zellen als auch in BON Karzinoidzellen eine bedeutende Rolle in der Regulation von Proliferation, Wachstum und Überleben innehat [Trümper et al. 2000; von Wichert et al. 2000; Wang et al. 2004] und damit wahrscheinlich auch maßgeblich an der Entstehung von GEP-NET beteiligt ist.

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen die Vermutung nahe, dass der PI3K/Akt-Signalweg zur Entstehung neuroendokriner Tumoren beiträgt. Der größte Teil der untersuchten NET zeigte hohe Akt-Level und somit eine deutlich stärkere Akt-Expression als die als Referenz untersuchten normalen Inselzellen. Im Gegensatz zu MAPK fand sich hier auch eine deutlich vermehrte Aktivierung von Akt, bei über der Hälfte der dNETs wurde P-Akt mäßig bis stark exprimiert. Es bleibt jedoch ungeklärt, welche molekularbiologischen Veränderungen der Akt-Überexpression zugrunde liegen. Daneben sollten sich Untersuchungen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer verstärkten Akt-Expression und der Aggressivität bzw. Invasivität von GEP-NET anschließen. Wie bei anderen Tumoren auch könnte dies einen wichtigen Prognosefaktor darstellen.

4.3.3 CREB

Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors CREB konnte in unterschiedlichen Tumoren nachgewiesen werden. Bei Mammakarzinomen [Sofi et al. 2003] und Wachstumshormon-produzierenden Adenomen [Rosenberg et al. 2002] wurden erhöhte CREB-Level als Folge von Veränderungen des cAMP/PKA-Signalweges beschrieben. Mukoepidermoid- und Warthin-Tumoren produzierten aufgrund einer Translokation ein Fusionsprotein, das eine CREB-abhängige Transkription induzierte [Wu et al. 2005]. Auch im Knochenmark von Patienten mit akuter Leukämie wurde CREB vermehrt exprimiert [Crans-Vargas et al. 2002; Shankar et al. 2005]. Hierbei war eine erhöhte CREB-Expression mit einer Persistenz der Krankheit, einem erhöhten Rückfallrisiko und einem verminderten ereignisfreien Überleben assoziiert [Shankar et al. 2005]. Weiterhin können auch virale Onkoproteine wie das humane T-Zell Leukämie-Virus (HTLV-1) und das Hepatitis B-Virus (HBV) CREB aktivieren.

In einigen Tumoren wurden jedoch auch signifikant niedrigere CREB-Level gefunden als in den korrespondierenden normalen Geweben und Adenomen, z.B. in Nebennierenrindenzinomen [Peri et al. 2001; Rosenberg et al. 2003] und Schilddrüsenkarzinomen [Luciani et al. 2003].

Der cAMP-Signalweg ist in β -Zellen von großer Bedeutung für die Zellfunktion, Regeneration, Proliferation und die Verhinderung von Apoptose. Inwieweit CREB jedoch an der Entstehung von GEP-NET beteiligt ist, ist bisher unbekannt. Ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung an der Bildung von GEP-NET wurde in einer Arbeit von Hussain et al. [2006] beschrieben. In Mäusen mit einer CREB-aktivierenden Mutation von CBP (Co-Aktivator von CREB) nahm die Inselzellmasse zu und sowohl in vivo als auch in vitro zeigte sich eine verstärkte β -Zellproliferation. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression eines dominant negativen CREB Analogons in Inselzellen zu einer erhöhten Apoptosesuszeptibilität.

Passend dazu untermauern die Ergebnisse dieser Arbeit den Verdacht, dass CREB eine Rolle bei der Entstehung von GEP-NET spielen könnte. Fast alle untersuchten Tumorgewebe zeigten eine starke Expression von CREB, eine nur schwache Anfärbung fand sich nicht. Daneben konnte auch eine vermehrte

Aktivierung von CREB nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung auf P-CREB waren zwar insgesamt etwas weniger Zellen angefärbt, trotzdem zeigte sich eine überwiegend starke Anfärbung. Im Vergleich zu den anderen getesteten Faktoren fand sich bei CREB die deutlichste bzw. stärkste Expression und Aktivierung. Unklar ist jedoch, auf welche Weise CREB hier aktiviert wird und welche flussabwärts gelegenen Zielgene beteiligt sind. Da CREB über verschiedene Signalwege phosphoryliert werden kann [Lonze und Ginty 2002] und die Transkription von mehr als 4000 Zielgenen induziert [Zhang et al. 2005], müssen sich weitere intensive Untersuchungen anschließen. Eine therapeutische Blockade von CREB selbst scheint nicht sinnvoll, da dieser Transkriptionsfaktor eine zentrale Stellung in vielen physiologischen Prozessen einnimmt. Die komplette Unterbrechung der CREB-Funktion in Mäusen war nicht mit dem Leben vereinbar, bei inkompletter Unterbrechung ergaben sich unterschiedliche pathologische Zustände [Rudolph et al. 1998]. Weiterhin wird vermutet, dass CREB nur im Zusammenspiel mit anderen Aktivatoren die Bildung von Tumoren induzieren kann [Conkright und Montminy 2005].

Signaltransduktionskaskaden sind oft in Form von Netzwerken miteinander verbunden und können so zu einer Modulierung verschiedener Signale führen [Bhalla und Iyengar 2001]. Auch Interaktionen von MAPK-Kaskade, Akt-Signalweg und CREB in INS-1 β -Zellen wurden beschrieben: eine Inhibierung von PKA/CREB durch Komponenten des MAPK-Signalweges; eine Aktivierung der MAPK-Kaskade durch PI3K und PKA sowie eine Aktivierung des Akt-Signalweges durch MAPK und PKA [Trümper et al. 2002].

Ungeklärt bleibt die Frage, ob und wie der MAPK-, PI3K/Akt-Signalweg und CREB bei der Entstehung von GEP-NET zusammenspielen. Festzuhalten ist jedoch, dass jeder der untersuchten Signalwege vielversprechende mögliche Angriffspunkte für antineoplastische Substanzen bieten könnte.

4.3.4 Unterschiede zwischen Insulinomen, Gastrinomen und Karzinoiden hinsichtlich der Expression von MAPK, Akt und CREB

Bei getrennter Betrachtung von Insulinomen, Gastrinomen und Karzinoiden fanden sich nur geringe Unterschiede bezüglich der Expression und Aktivierung der untersuchten Faktoren. Die Insulinome zeigten im Vergleich zu den anderen beiden Tumorarten bei einem kleineren Anteil der Präparate eine starke Anfärbung auf MAPK. Bei Gastrinomen war vermehrt eine nur schwache Expression von P-Akt nachzuweisen, bei Karzinoiden war dies bei P-CREB der Fall. Insgesamt zeigten sich jedoch bei allen drei untersuchten Tumorarten sehr ähnliche Expressionsmuster. Aufgrund der geringen Fallzahl lassen die oben erwähnten Beobachtungen auch keine Rückschlüsse auf etwaige Unterschiede zwischen den verschiedenen GEP-NET zu. Weiterhin muss angemerkt werden, dass es wegen der geringen Anzahl von Tumorpräparaten ebenfalls nicht möglich war, zwischen Lokalisation der Tumoren, Aggressivität/Invasivität und funktionellem Status zu differenzieren. Daneben machte es das Alter der Paraffinblöcke (die Gewebeproben stammen aus den Jahren 1983 bis 2000) sehr schwierig, zusätzliche Informationen wie klinische Symptome der Patienten, Ursprungslokalisierung des Tumors und TNM-Stadium in die Bewertung einzubringen.

Zusammenfassend konnte die vermehrte Expression von MAPK, Akt und CREB in verschiedenen gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren immunhistologisch nachgewiesen werden. Alle untersuchten Faktoren und ihre stromabwärts liegenden Substrate stellen somit vielversprechende potentielle Angriffspunkte für neue antineoplastische Substanzen dar. In welchem Maße der MAPK-, PI3K/Akt-Signalweg und CREB bei der Tumorentstehung beteiligt sind bzw. zusammenspielen bleibt zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die molekulare Pathogenese von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GEP-NET) ist größtenteils unbekannt. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren kommen in GEP-NET Mutationen in klassischen Onkogenen wie Ras, myc, Fos, Src und Jun oder Tumorsuppressorgenen wie p53 und dem Retinoblastomsuszeptibilitätsgen nicht vor. In vielen Tumoren wurde eine vermehrte Aktivierung von zellulären Signaltransduktionswegen festgestellt, die vor allem das Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen regulieren und die Apoptose inhibieren. Sowohl die MAPK-Signalkaskade, der PI3K/Akt-Transduktionsweg als auch der Transkriptionsfaktor CREB vermitteln eben diese Funktionen. Die Behandlungsoptionen von GEP-NET, insbesondere bei bereits erfolgter Metastasierung, sind limitiert. Daher stellen die Komponenten oben genannter Signaltransduktionswege und ihre stromabwärts liegenden Substrate vielversprechende potentielle Angriffspunkte für antineoplastische Substanzen dar.

Ziel dieser Arbeit war es, GEP-NET (Insulinome n=25, Gastrinome n=14, Karzinoide n=20) auf eine vermehrte Expression und Aktivierung der Signaltransduktionsfaktoren MAPK (als Bestandteil des MAPK-Signalweges), Akt (als Komponente der PI3K/Akt-Transduktionskaskade) und des Transkriptionsfaktors CREB immunhistologisch zu untersuchen.

Die Mehrzahl der Tumoren zeigte im Vergleich zu dem als Referenz untersuchten normalen Pankreasgewebe eine deutliche Überexpression sowohl von MAPK, Akt als auch CREB. Daneben konnte eine verstärkte Aktivierung dieser Faktoren, insbesondere von CREB und Akt, nachgewiesen werden. Bei getrennter Betrachtung von Insulinomen, Gastrinomen und Karzinoiden fanden sich keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der Expression und Aktivierung der untersuchten Faktoren.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass MAPK, Akt und CREB sowie die beteiligten Signaltransduktionswege zur Entstehung neuroendokriner Tumoren beitragen. Die genauen molekularen Zusammenhänge sind jedoch unklar. Auch in

welchem Maße der MAPK-, PI3K/Akt-Signalweg und CREB bei der Tumorentstehung beteiligt sind bzw. zusammenspielen bleibt zu untersuchen.

Summary

The molecular pathogenesis of gastro-entero-pancreatic tumors (GEP-NET) is for the most part unknown. Unlike in other tumors typical mutations in classic oncogenes like Ras, myc, Fos, Src and Jun or tumor suppressor genes like p53 and retinoblastoma susceptibility gene are not frequent in GEP-NET. In many tumors there has been detected the activation of cellular signal transduction pathways which mainly regulate growth, proliferation and differentiation of cells as well as inhibiting apoptosis. These functions are mediated by the MAPK pathway, the PI3/Akt pathway and the transcription factor CREB.

Treatment options of GEP-NET are limited, especially when the tumor has already metastasized. Therefore the components of these signaling pathways and their downstream substrates present promising potential targets for antineoplastic drugs.

The goal of this work was to immunohistochemically examine GEP-NET (insulinomas n=25, gastrinomas n=14, carcinoids n=20) concerning an increased expression and activation of MAPK (as part of the MAPK pathway), Akt (as part of the PI3/Akt pathway) and the transcription factor CREB.

In comparison to the normal pancreas tissue most of the tumors showed a clear overexpression of MAPK, Akt and CREB. Besides there was detected an increased activation of these components, particularly of Akt and CREB. Assessing insulinomas, gastrinomas and carcinoids separately there were no significant differences in the expression and activation of MAPK, Akt and CREB. The results of this work suggest that MAPK, Akt and CREB as well as the involved signaling pathways contribute to the development of neuroendocrine tumors. The exact molecular implications remain unclear. Also to which extend the MAPK and Akt pathways and CREB are involved and interact in the development of tumors remains to be investigated.

6 Literaturverzeichnis

Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN (2012). Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 139-146

AlQathama A, Prieto JM (2015). Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. *Nat Prod Rep.* 2015 Aug;32(8):1170-82

Altomare D, Testa JR (2005). Perturbations of AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24(50):7455-7464

Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V (1995). Molecular alterations of Akt2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 64:280-285

Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 94:29-86

Bhalla US, Iyengar R (2001). Functional modules in biological signalling networks. *Novartis Found Symp* 239:4-13

Bonni A, Brunet A, West EA, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362

Brose MS, Volpe P, Feldmann M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer. *Cancer res* 62:6997-7000

Burgering BMT, Coffey PJ (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376:599-602

Burger M, Denzinger S, Hammerschmid C, Tannapfel A, Maderstorfer A, Wieland WF, Hartmann A, Stoehr R (2006). Mitogen-activated protein kinase signaling is activated in prostate tumors but not mediated by B-Raf mutations. *Eur Urol* 50(5):1102-1109

Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer* 120(22): 3446-3456

Buteau J, Ronduit R, Susini S, Prentki M (1999). Glukagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in β (INS-1)-cells. *Diabetologia* 42:856-864

Calender A (2000). Molecular genetics of neuroendocrine tumors. *Digestion* 62(suppl 1):3-18

Cantley LC, Neel BG (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase / AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci* 96:4240-4245

Capella C, Heitz PU, Höfler H, Solcia E, Klöppel G (1995). Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Archiv* 425:547-560

Cho EC, Mitton B, Sakamoto KM (2011). CREB and leukemogenesis. *Crit Rev Onog.* 16(1-2):37-46

Cobb MH (1999). MAP kinase pathways. *Progr Biophys Mol Biol* 71:479-500

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR, (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 335:1-13

Conkright MD, Montminy M (2005). CREB: the unindicated cancer co-conspirator. *Trends Cell Biol* 15(9):457-459

Crans-Vargas HN, Landaw EM, Bhatia S, Sandusky G, Moore TB, Sakamoto KM (2002). Expression of cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein in acute leukaemia. *Blood* 99(7):2617-2619

Dancey JE (2004). Molecular targeting: PI3 kinase pathway. *Ann Oncol* 15(suppl.4): iv233-iv239

Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC (2017). Trends in the incidence, prevalence and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States. *JAMA Oncol* 3(10): 1335-1342

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905-2927

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson GA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-953

Delle Fave G, Corleto VD (2001). Oncogenes, growth factors, receptor expression and proliferation markers in digestive neuroendocrine tumours. A critical reappraisal. *Ann Oncol* 12 suppl 2:13-17

Du K, Montminy M (1998). Creb is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273:32377-32379

Falconi M, Eriksson B, Kaltsas G, Bartsch DK, Capdevila J, Caplin M, Kos-Kudla B, Kwekkeboom D, Rindi G, Klöppel G, Reed N, Kianmanesh R, Jensen T, Vienna Consensus Conference participants (2016). ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-functional Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology* 103:153-171

Fenton RG, Longo DL, Schäfer R, Schwarte-Waldhoff I (2005). Krebszellbiologie und Angiogenese. In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin, Band 1*. ABW Wissenschafts-Verlag, 16. Aufl.:481-492

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997). PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88:435-437

Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77:713-725

Gröttinger C (2004). Tumour biology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology* 2004; 80(suppl 1):8-11

Gu T, Zhang Z, Wang J, Guo J, Shen WH, Yin Y (2011). CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. *Cancer Res* 71(8):2821–2825

Guo SS, Wu X, Shimode AT, Wong J, Moatamed F, Sawicki MP (2003). Frequent overexpression of cyclin D1 in sporadic pancreatic endocrine tumours. *J Endocrinol* 179:73-79

Hagemann C, Rapp UR (1999). Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 253:34-46

Haug AR, Bartenstein P (2012). Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems. Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie. *Der Internist* 1:1-6

Hörsch D, Bert T, Schrader J, Hommann M, Kaemmerer D, Petrovitch A, Zaknun J, Baum RP (2012). Pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 58(4):401-426

Hörsch D, Grabowski P, Schneider CP, Petrovitch A, Hommann M, Kaemmerer D, Baum RP (2011). Current treatment options for neuroendocrine tumors. *Drugs of Today* 47(10):773-786

Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-I S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18:813-822

Houben R, Ortmann S, Schrama D, Herold MJ, Berberich I, Reichardt HM, Becker JC (2007). Activation of the MAP kinase pathway induces apoptosis in the Merkel cell carcinoma cell line UIISO. *J Invest Dermatol* 127(9):2116-2122

Hui H, Wright C, Perfetti R (2001). Glukagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homebox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50:785-796

Hunter T (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236

Hussain MA, Porras DL, Rowe MH, West JR, Song WJ, Schreiber WE, Wondisford FE (2006). Increased pancreatic β -cell proliferation mediated by CREB binding protein gene activation. *Mol Cell Biol* 26(20):7747-7759

Ito T, Lee L, Jensen JT (2018). Carcinoid-syndrome: recent advances, current status and controversies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 25(1):22-35

Jean D, Bar-Eli M (2000). Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family. *Mol Cell Biochem* 212(1-2):19-28

Jensen RT (2004). Gastrinomas. *Advances in Diagnosis and management. Neuroendocrinology* 2004; 80(suppl 1):23-27

Jensen RT, Baumgart DC, Wiedenmann B (2005). Neuroendokrine Tumoren des gastro-entero-pankreatischen Systems. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin, Band 2. ABW Wissenschafts-Verlag, 16. Aufl.:*2391-2402

Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Monzminy M (2003). cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 17:1575-1580

Johannessen M, Delghandi MP, Moens U (2004). What turns CREB on? *Cell Signal* 16(11):1211–1227

Karhoff D, Sauer S, Schrader J, Arnold R, Fendrich V, Bartsch DK, Hörsch D (2007). Rap1/B-Raf signaling is activated in neuroendocrine tumors of the digestive tract and Raf kinase inhibition constitutes a putative therapeutic target. *Neuroendocrinology* 85:45-53

Khoo S, Cobb M (1997). Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci* 94:5599-5604

Khwaja A (1999). Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 401:33-34

Kieffer TJ, Habener JF (1999). The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 20:876-913

- Klöppl G (2003a). Tumoren des endokrinen Pankreas. *Pathologie* 24:265-271
- Klöppl G (2003b). Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts. *Pathologie* 24:287-296
- Klöppl G, Perren A, Heitz PU (2003). Vom Karzinoid zum neuroendokrinen Tumor. *Deutsches Ärzteblatt* (Jg. 100) 28-29:1513-1518
- Kolch W (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351:289-305
- Krystal GW, Sulanke G, Litz J (2002). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling blocks growth, promotes apoptosis, and enhances sensitivity of small cell lung cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 1(11):913-922
- Lonze BE, Ginty DD (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:6055-623
- Luciani P, Buci L, Conforti B, Tonacchera M, Agretti P, Elisei R, Vivaldi A, Cioppi F, Biliotti G, Manca G, Vitti P, Serio M, Peri A (2003). Expression of cAMP response element-binding protein and sodium iodide symporter in benign non-functioning and malignant thyroid tumours. *Eur J Endocrinol* 148(5):579-586
- Luo J, Manning BD, Cantley LC (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4:257-262
- Maggio I, Mollica V, Brighi N et al. (2020). The functioning side of the pancreas: a review on insulinomas. *J Endocrinol Invest* 43:139-48
- Mann K, Saller B (2000). Tumoren des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas. In: Wilmanns, Huhn, Wilms (Hrsg.): *Internistische Onkologie*. Georg Thieme Verlag, 2. Aufl.:666-681

Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG (1994). Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265(5174):966-970

Marshall CJ (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185

Mawrin C, Sasse T, Kirches E, Kropf S, Schneider T, Grimm C, Pambor C, Vorwerk CK, Firsching R, Lendeckel U, Dietzmann K (2005). Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res* 11(11):4074-4081

Mignon M (2000). Natural history of neuroendocrine tumours. *Digestion* 62(suppl 1):51-58

Mirmohammadsadegh A, Mota R, Gustrau A, Hassan M, Nambiar S, Marini A, Bojar H, Tannapfel A, Hengge UR (2007). ERK1/2 is highly phosphorylated in melanoma metastases and protects melanoma cells from cisplatin-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol.* 127(9):2207-2215

Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M (2004). The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* 4(3):235-256

Modlin IM, Lye KD, Kidd M (2003). A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 97(4): 934-959

Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Shapiro MD (2005). Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* 128:1717-1751

Morin PJ, Trent JM, Collins FS, Vogelstein B, Kölbl K (2005). Tumorgenetik. In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin, Band 1.* ABW Wissenschafts-Verlag, 16. Aufl.:475-480

Murphy DA, Makonnen S, Lassoued W, Feldmann MD, Carter C, Lee WM (2006). Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY 43-9006). *Am J Pathol* 169(5):1875-1885

Muthusamy N, Leiden JM (1998). A protein kinase C-, Ras-, and RSK2-dependent signal transduction pathway activates the cAMP-responsive element-binding protein transcription factor following T cell receptor engagement. *J Biol Chem* 35:22841-22847

Nikfarjam M, Warshaw AL, Axelrod L et al. (2008). Improved contemporary surgical management of insulinomas: a 25-year experience at the Massachusetts General Hospital. *Ann Surg* 247:165-72.

Öberg K (2003). Diagnosis and treatment of carcinoid tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 3(6):863-877

Öberg K (2004). Management of neuroendocrine tumours. *Ann Oncol* 15(suppl 4):iv293-iv298

Öberg K, Eriksson B (2005). Endocrine tumors of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19(5):753-781

Oberndorfer S (1907). Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol* 1:426-432

Oetjen E, Thoms KM, Laufer Y, Pape D, Blume R, Li P, Knepel W (2005). The immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus inhibit membrane depolarization-induced CREB transcriptional activity at the coactivator level. *Br J Pharmacol* 144(7):982-993

Peri A, Luciani P, Conforti B, Baglioni-Peri S, Cioppi F, Crescioli C, Ferruzzi P, Gelmini S, Arnaldi G, Nesi G, Serio M, Mantero F, Mannelli M (2001). Variable expression of the transcription factors cAMP response element-binding protein

and inducible cAMP early repressor in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. *J Endocrinol Metab* 86(11):5443-5449

Perry RP, Vinik AI (1996). Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Med* 47:57-68

Petrides PE (1998). Tumorgewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 6. Aufl.:1089-1113

Plöckinger U, Wiedenmann B (2002). Neuroendocrine tumours of the gastroentero-pancreatic system: the role of early diagnosis, genetic testing and preventive surgery. *Dig Dis Sci* 20:49-60

Phan AT, Dave B (2016). The pivotal role of mammalian target of rapamycin treatment of patients with neuroendocrine tumors. *Cancer Med*. 2016 Oct; 5(10): 2953–2964

Popa O, Taban SM, Pantea S, Plopeanu AD, Barna RA, Cornianu M, Pascu AA, Dema ALC (2021). The new WHO classification of gastrointestinal neuroendocrine tumors and immunohistochemical expression of somatostatin receptor 2 and 5. *Exp Ther Med* 22(4):1179

Proye CAG, Lokey JS (2004). Current concepts in functioning endocrine tumours of the pancreas. *World J Surg* 28:1231-1238

Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JEB (2000). Akt/Proteinkinase B up-regulates bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 275:10761-10766

Rindi G (2010). The ENETS guidelines: the new TNM classification system. *Tumori* 96:806-809

Rindi G, Bordi C (2003). Highlights of the biology of endocrine tumours of the gut and pancreas. *Endocrine-related cancer* 10:427-436

Robertson RG, Geiger WJ, Davis NB (2006). Carcinoid tumors. *Am Fam Physician* 1;74(3): 429-434

Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286:1738-1741

Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Bertagna X, Bertherat J (2002). Role of PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann NY Acad Sci* 968:65-74

Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Medjane S, Louvel A, Bertagna X, Bertherat J (2003). Transcription factor 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-responsive element-binding protein (CREB) is decreased during human adrenal cortex tumorigenesis and fetal development. *J Clinical Endocrinol Metab* 88(8):3958-3965

Rossi RE, Elvevi A, Citterio D, Coppa J, Invernizzi P, Mazzaferro V, Massironi S (2021). Gastrinoma and Zollinger Ellison syndrome: A roadmap for the management between new and old Therapies. *World J Gastroenterol* 27(35): 5890-5907

Roux PR, Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2):320-344

Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hämmerling GJ, Arnold B, Schütz G (1998). Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 95:4481-4486

Schnirer II, Yao JC, Ajani JA (2003). Carcinoid - a comprehensive review. *Acta Oncol* 42(7):672-692

Schmoll HJ, Dralle H, Arnold R, Schmoll E (1999a). Endokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.): *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer Verlag, 3. Aufl., Band 2:1161-1179

Schmoll HJ, Schmoll E, Dralle H, Arnold R (1999b). Karzinoide. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K: *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer Verlag, 3. Aufl., Band 2:1188-1219

Serve H, Hartmann F, Pfreundschuh M (2004). Allgemeine internistische Onkologie. In: Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W (Hrsg.): *Innere Medizin*. Urban und Fischer, 5. Aufl.:575-583

Shankar DB, Cheng JC, Kinjo K, Federman N, Moore TB, Gill A, Rao NP, Landaw EM, Sakamoto KM (2005). The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 7(4):351-362

Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-861

Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME (1991). CREB: a Ca^{2+} -regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252:1427-1429

Sofi M, Young MJ, Papamakarios T, Simpson ER, Clyne CD (2003). Role of CRE-binding protein (CREB) in aromatase expression in breast adipose. *Breast Cancer Res Treat* 79(3):300-407

Steven A, Friedrich M, Jank P, Heimer N, Budczies J, Denkert C, Seliger B (2020). What turns CREB on? And off? And why does it matter? *Cell Mol Life Sci* 77(20): 4049-4067

Tannapfel A, Vomschloss S, Karhoff D, Markwarth A, Hengge UR, Wittekind C, Arnold R, Hörsch D (2005). BRAF gene mutations are rare events in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol* 123:256-260

Trümper A, Trümper K, Trusheim H, Arnold R, Göke B, Hörsch D (2001). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for β (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol Endocrinol* 15(9):1559-1570

Trümper A, Trümper K, Hörsch D (2002). Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in β (INS-1)-cells. *J Endocrinol* 174:233-246

Trümper J, Ross D, Jahr H, Brendel MD, Göke R, Hörsch D (2005). The Rap-B-Raf signalling pathway is activated by glucose and glucagon-like peptide-1 in human islet cells. *Diabetologia* 48(8):1534-1540

Trümper K, Trümper A, Trusheim H, Arnold R, Göke B, Hörsch D (2000). Integrative mitogenic role of protein kinase B/Akt in beta-cells. *Ann N Y Sci* 921:242-250

Vivanco I, Sawyers CL (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501

Wagner ACC, Spitzweg C, Göke B (2004). Pankreastumoren. In: Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W (Hrsg.): *Innere Medizin*. Urban und Fischer, 5. Aufl.:1384-1398

Wang LL, Hao S, Zhang S, Guo LJ, Hu CY, Zhang G, Gao B, Zhao JJ, Jiang Y, TianWG, Wang J, Luo DL (2016). PTEN/PI3K/AKT protein expression is related to clinicopathologic features and prognosis in breast cancer with axillary lymph

node metastases. *Hum Pathol.* 2016 Nov 15. pii: S0046-8177(16)30303-3. doi: 10.1016/j.humpath.2016.07.040. [Epub ahead of print]

Wang Q, Li L, Xu E, Wong V, Rhodes C, Brubaker PL (2004). Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. *Diabetologia* 47(3):478-487

Wichert von G, Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedenmann B, Boehm BO, Adler G, Seufferlein T (2000). Insulin-like growth factor-1 is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in Human neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res* 60:4573-4581

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh G, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64(19):7099-7109

Williams ED, Sandler M (1963). The classification of carcinoid tumors. *Lancet* 1:238-239

Wu L, Liu J, Gao P, Nakamura M, Cao Y, Shen H, Griffin JD (2005). Transforming activity of MECT1-MAML2 fusion oncoprotein is mediated by constitutive CREB activation. *EMBO J* 24(14):2679-2687

Xing HM, Kornfeld K, Muslin AJ (1997). The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. *Curr Biol* 7:294-300

Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996). Coupling of the Ras-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959-963

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. PNAS 102(12):4459-4464

Zimmermann S, Moelling K (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science 286:1741-1744

Zugasti O, Rul W, Roux P, Peyssonnaud C, Eychenne A, Franke TF, Fort P, Hibner U (2001). Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. Mol Cell Biol 21(19):6706-6717

7 Anhang

7.1 Verwendetes Material

7.1.1 Chemikalien

Aqua dest.	Fresenius
3,3´Diaminobenzidin- tetrahydrochlorid Dihydrat (DAB)	Fluka
Di-Natriumhydrogenphosphatlg. 1/15 M	Merck
Ethanol	Roth
Formalin 10% v/v	J.T. Baker
Hämalaun	Chroma
Kaliumdihydrogenphosphatlg. 1/15 M	Merck
Methanol	Merck
Methylbenzoat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natronlauge 1N	Merck
Salzsäure 1N	Merck
Serum-Albumin vom Rind (BSA)	DADE Behring
TRIS	Roth
Wasserstoffperoxid 30%	Merck
Xylol	Merck
Zitronensäure-Monohydrat	Merck

7.1.2 Kits, Antikörper

ABC- Kit	Vector Laboratories
AKT Antibody	Cell Signaling
CREB Antibody	Cell Signaling
p44/42 MAP Kinase Antibody	Cell Signaling
Phospho-AKT (Ser473) Antibody (IHC specific)	Cell Signaling
Phospho-CREB (Ser133) Antibody	Cell Signaling
Phosho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody	Cell Signaling

7.1.3 Verbrauchsmaterial und wiederverwendbares Material

Deckgläser	Menzel
DePeX	Serva
Färbegestell	Hecht
Film EPY 64T	Kodak
Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Küvetten	Hecht
Magnetrührer	Heidolph
Meßbecher	Brand
Mikrotom blades S35	Feather
Objektträger	Menzel
Paraffin (Gewebeeinbettmittel)	Vogel
Rundfilter	Schleicher & Schuell
Standküvetten	Brand

7.1.4 Geräte

Brutschrank 37°C	Heraeus
Brutschrank 40°C	Heraeus
Brutschrank 60°C	Heraeus
Einbettstation	Reichert-Jung
Feinwaage	Mettler
Feuchte Kammern	Kobe
Heizplatte	Medax
Labofuge 400e	Heraeus
Mikroskop Vamox AHBT3	Olympus
Mikroskop BH-2	Olympus
Mikrotom RM 2155	Leica
Mikrowelle	Bosch
pH-Meter 761	Knick
Waage	Sartorius
Wasserbad	Medax
Vortex	Heidolph

7.1.5 Zellkultur

Aprotinin	Sigma
Benzamidine	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Ciprobay 200	Bayer
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Fetales bovines Serum (FBS)	DADE Behring
Glycerol	Sigma
Hepes Buffer Solution 1M	PAA Laboratories
Leupeptin	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
Mercaptoethanol 50mM	Invitrogen
Natriumfluorid	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, in Ethanol gelöst)	Sigma
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Cambrex
Sodium chloride	Sigma
Sodium orthovanadate	Sigma
Sodium pyrophosphate	Sigma
Sodium pyruvate solution 100mM	PAA Laboratories
Triton X-100	Sigma

7.2 Herstellung der benötigten Chemikalien

Herstellung von Lysisbuffer:

- 50 mM Hepes Buffer
- 140 mM Natriumchlorid
- 1 mM Magnesiumchlorid
- 1 mM Calciumchlorid
- 10 mM Natriumpyrophosphat
- 100 mM Natriumfluorid
- 2 mM EDTA
- 10 % Glycerol
- 1% Triton X-100

2 mM Natriumorthovanadat
2 mM PMSF
100µM Aprotinin
100µM Leupeptin
10 mM Benzamidin

Herstellung des Citratpuffers (pH 6):

Lösen von 2,1g Zitronensäure-Monohydrat in 1000 ml Aqua bidest., dann pH-Einstellung auf 6 mit 1N Natronlauge

Herstellung des PBS-Puffers (pH 7,4):

- a) Zu 214 ml 1/15 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung 536 ml 1/15 M di-Natriumhydrogenphosphatlösung geben
- b) Darin 45g Natriumchlorid lösen
- c) 4250 ml Aqua bidest. zugeben
- d) Einstellen auf pH 7,4 mit 1 N Natronlauge

Herstellung von BSA (Bovines Serum-Albumin):

100 mg BSA in 20 ml PBS-Puffer auflösen

Herstellung von TBS-Puffer (pH 7,6):

- a) Abmessen von 2887,5 ml Aqua bidest.
- b) 112,5 ml HCl zugeben
- c) 18,165 g TRIS und 26,20 g NaCl zugeben und auflösen
- d) Einstellen auf pH 7,6 mit HCl

Herstellung von DAB:

- a) 200 mg 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid abwiegen (unter Abzug)
- b) 200 ml TBS-Puffer zugeben, schütteln, 2x filtrieren
- c) 100 µl H₂O₂ in eine Küvette pipettieren
- d) DAB-Mischung dazugeben

7.3 Tabellarischer Lebenslauf

Die Seiten 76-77 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Zu meinen akademischen Lehrern gehörten folgende Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Bertalanffy, Bien, Brück, Christiansen, Daut, Efe, Eilers, Engelhardt-Cabillic, Feuser, Feyschmidt-Paul, Garrel v., Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Görg, Gotthardt, Gotzen, Grimm, Griss, Gudermann, Hamer, Happle, Hellinger, Hertl, Hesse, Hörsch, Hörster, Hofbauer, Hofmann, Jungclas, Kalder, Kern, Klenk, Klose, Köhler, König, Köster, Koolmann, Kowalski, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhlmann, Lang, Langer, Lemke, Lippert, Löffler, Lohoff, Max, Maisch, Mann, Meinhardt, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumann, Neumüller, Nies, Oertel, Petermann, Pfeiffer, Rager, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röhrenbeck, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schueffel, Schultz, Seitz, Stahl, Steiniger, Stief, Stiletto, Suske, Vogelmeier, Vohland, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zielke

Für meine Ausbildung möchte ich mich bei ihnen herzlich bedanken.

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke besonders Prof. Dr. D. Hörsch (Klinische Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie, Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt für Gastroenterologie, Endokrinologie und Diabetes, Philipps-Universität Marburg) für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. P. Barth danke ich für die Hilfe beim Fotografieren der Präparate.

Für die Hilfestellung bei Laborarbeiten gilt mein besonderer Dank D. Bonnorden und E. Archontidu-Aprin.

Vielen Dank an alle, die im Forschungsbereich 3 mit mir zu tun hatten und mich unterstützt haben: D. Karhoff, D. Ross, J. Schrader, H. Schmidt und alle anderen.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Expression der Signaltransduktionsfaktoren MAPK, Akt/PKB und des Transkriptionsfaktors CREB in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren“ in der Klinik für Gastroenterologie, Stoffwechselkrankheiten und Endokrinologie unter Leitung von Prof. Dr. Hörsch mit Hilfestellung durch Fr. Bonorden und Archontidu-Aprin bei den Laborarbeiten und Unterstützung von Prof. Dr. P. Barth beim Fotografieren der Präparate ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde nicht veröffentlicht.

Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum, Unterschrift Referentin/Referent