

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

**Untersuchung der Expression und biologischen Funktion  
des Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Karzinomen**

Dissertation

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

Vorgelegt von  
Sophie Hambüchen, geb. Buyken  
2023

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachter: PD Dr. med. David Latz

## I. Zusammenfassung

Die gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Karzinome (GEP-NEC) sind eine aggressive Untergruppe neuroendokriner Neoplasien mit hoher Mortalität und schlechter Prognose. Es stehen nur wenige erfolgversprechende Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Der *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT3) ist in verschiedenen Tumorentitäten konstitutiv aktiviert und gilt als Angriffspunkt für neue onkologische Therapien.

Ziel dieser Arbeit ist, die klinische und prognostische Relevanz von STAT3 sowie die therapeutische Nutzbarkeit des STAT3 Inhibitors Niclosamid in GEP-NEC festzustellen.

Im ersten Schritt unserer Untersuchungen prüften wir die Bedeutung von STAT3 in neuroendokrinen Neoplasien. Es wurden Gewebeproben von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN) und korrespondierenden Normalgeweben mittels immunhistochemischer Färbung verglichen. Nach Anfärbung und Auswertung von *tissue microarrays* (TMAs) von 65 Patienten wurde die Assoziation von STAT3 Expression zu klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Überlebensanalysen wurden durchgeführt, um die prognostische Bedeutung von STAT3 zu benennen. In einem zweiten Schritt wurden durch *in vitro* Experimente an drei neuroendokrinen Karzinom-Zelllinien NEC-DUE1, -2 und -3 Veränderungen in der STAT3-Expression sowie in der Expression ausgewählter Zielgene durch Niclosamid untersucht. Dies wurde mittels Westernblot und Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht. Der Einfluss von Niclosamid auf die Zellviabilität und Proliferation wurde mittels MTS- und BrdU-Assay gemessen.

Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich das nukleäre, also aktivierte phosphorylierte STAT3 (pSTAT3) im Tumorgewebe signifikant ( $p = 0,0480$ ) vermehrt exprimiert. Der *Immunreactive Score* (IRS)-Mittelwert im Tumorgewebe lag bei 3,07, der im Normalgewebe bei 1,6. In unserem Kollektiv zeigte sich eine signifikant ( $p = 0,019$ ) höhere Expression von nukleärem STAT3 in G1- und G2-Tumoren (IRS-Mittelwert 3,71) im Vergleich zu G3-Tumoren (IRS-Mittelwert 1,38). Eine prognostische Relevanz von STAT3 wurde nicht identifiziert. Die Behandlung der NEC-DUE Zelllinien mit Niclosamid führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellviabilität und Proliferation. Niclosamid führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Reduktion der Expression von STAT3 und pSTAT3 in allen drei NEC-DUE Zelllinien. Zudem reduzierte Niclosamid die Expression des Proteins Survivin in allen drei Zelllinien, führte zu einer dosisabhängigen Reduktion von c-Myc und Cateninb1 in NEC-DUE1 und -2 und von Cyclin D1 in NEC-DUE2.

Aktiviertes STAT3 führt zu einer pathologisch gesteigerten Zellproliferation und Apoptosehemmung. Es ist besonders durch seine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen bedeutend für die Tumorentstehung. Wir konnten zeigen, dass STAT3 in GEP-NEC dabei hauptsächlich einen Einfluss auf Survivin, aber auch auf andere proliferative Gene wie Cateninb1, c-Myc und Cyclin D1 ausübt. Der STAT3-Inhibitor Niclosamid führt in unseren GEP-NEC-Zelllinien über die Reduktion von pSTAT3 zu einer verminderten Zellviabilität und Proliferation. Wir konnten mit STAT3 einen potenziellen Angriffspunkt in der Therapie von GEP-NEN und Niclosamid als eine potenzielle neue Therapiesubstanz bei Patienten mit GEP-NEC identifizieren.

## II. Summary

Gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas (GEP-NEC) are an aggressive subgroup of neuroendocrine neoplasia with a high mortality and a poor prognosis. Promising therapy options are rare. The Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT3) is constitutively activated in various tumor entities and is considered as target for new oncological therapies.

The aim of this study is to determine the clinical and prognostic relevance of STAT3 and to estimate the therapeutic usability of the STAT3-Inhibitor niclosamide in GEP-NEC.

The first step of our study was the identification of STAT3 for clinical and prognostic purposes. We compared tissue samples of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia (GEP-NEN) with corresponding healthy tissue samples using immunohistochemical staining. After staining and evaluation of tissue microarrays (TMAs) of 65 patients, the association of STAT3-expression to clinical-pathological parameters was investigated. For the identification of the prognostic role of STAT3 survival-analyses were performed. In a second step, we examined three neuroendocrine-carcinoma cell lines NEC-DUE1, -2 and -3 in *in vitro* experiments for changes in STAT3-expression and in the expression of selected target-genes following treatment with niclosamide. The effects were investigated using western blot and polymerase-chain-reaction (PCR). The influence of niclosamide on cell-viability and proliferation was measured using MTS- and BrdU-Assays.

Compared to healthy tissue, in tumor tissue the nuclear, activated and phosphorylated STAT3 (pSTAT3) was significantly higher expressed ( $p = 0,0480$ ). The average immune reactive score (IRS-) value in tumor was 3,07, whereas it was 1,6 in healthy tissue. In our collective, there was a significantly ( $p = 0,019$ ) higher expression of nuclear STAT3 in tumors graded G1 and G2 (mean IRS 3,71) compared to G3 graded tumors (mean IRS 1,38). A prognostic relevance of STAT3 has not been identified. Treatment of NEC-DUE cell lines with niclosamide led to a dose-dependent reduction in the expression of STAT3 and pSTAT3 in all three NEC-DUE cell lines. In addition, niclosamide reduced the expression of the protein Survivin in all three cell lines, led to a dose-dependent reduction of c-Myc and Cateninb1 in NEC-DUE1 and -2 and to a dose-dependent reduction of Cyclin D1 in NEC-DUE2.

Activated STAT3 leads to pathologically increased cell proliferation and inhibition of apoptosis. It is particularly important for tumorigenesis due to its involvement in inflammatory processes. We were able to show that STAT3 in GEP-NEC mainly affects Survivin, but also other proliferative genes like Cateninb1, c-Myc and Cyclin D1. The STAT3 inhibitor nicodamid leads to reduced cell viability and proliferation by reducing the presence of pSTAT3 in our GEP-NEC cell lines. Accordingly, we collected results indicating that STAT3 may represent a potential target and niclosamide as a new substance for novel therapeutic approaches for the treatment of patients with GEP-NEC.

### III. Abkürzungsverzeichnis

|                 |                                                              |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|
| °C              | <i>Grad celsius</i>                                          |
| µg              | <i>Mikrogramm</i>                                            |
| µl              | <i>Mikroliter</i>                                            |
| µM              | <i>Mikromolar</i>                                            |
| 5-HIES          | <i>5-Hydroxyindolessigsäure</i>                              |
| ACTH            | <i>Adrenocortikotropes Hormon</i>                            |
| AJCC            | <i>American Joint Committee on Cancer</i>                    |
| AML             | <i>akute myeloische Leukämie</i>                             |
| APRF            | <i>acute-phase response factor</i>                           |
| APUD            | <i>amine precursor uptake and decarboxylation</i>            |
| Array-CGH       | <i>Array-based Comparative Genomic Hybridization</i>         |
| ATP             | <i>Adenosintriphosphat</i>                                   |
| Bak             | <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>                    |
| Bax             | <i>Bcl-2-associated x)</i>                                   |
| Bcl             | <i>B-cell-lymphoma = B-Zell-Lymphom</i>                      |
| Bcl-xL          | <i>B-cell lymphoma-extra large</i>                           |
| BIRC            | <i>Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing</i> |
| bp              | <i>Basenpaare</i>                                            |
| BrdU            | <i>5-bromo-2'-deoxyuridin</i>                                |
| BSA             | <i>Bovines Serumalbumin</i>                                  |
| cAMP            | <i>zyklisches Adenosinmonophosphat</i>                       |
| Caspase         | <i>Cystein-Aspartat-spezifische Protease</i>                 |
| Cateninb1       | <i>BetaCatenin1 oder β1-Catenin</i>                          |
| CD              | <i>Cluster of Differentiation</i>                            |
| cdks            | <i>Cyclin-abhängige Proteinkinase</i>                        |
| cDNA            | <i>komplementäre DNA</i>                                     |
| cGMP            | <i>zyklisches Guanosinmonophosphat</i>                       |
| CHE             | <i>Schweiz</i>                                               |
| cm <sup>2</sup> | <i>Quadratzentimeter</i>                                     |
| c-Myc           | <i>cellular Myelocytomatosis oncogene</i>                    |
| CRH             | <i>Corticotropin-Releasing-Hormon</i>                        |
| CT              | <i>Computertomographie, threshold cycle</i>                  |
| CTP             | <i>Cytidintriphosphat</i>                                    |
| DAB             | <i>3,3'-diaminobenzidine</i>                                 |
| DAG             | <i>Diacylglycerin</i>                                        |
| DE              | <i>Deutschland</i>                                           |
| DMSO            | <i>Dimethyl sulphoxide</i>                                   |
| DNA             | <i>Desoxyribonukleinsäure</i>                                |
| dNTP            | <i>desoxyNukleosidtriphosphat</i>                            |
| DPBS            | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>                  |
| EDTA            | <i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>                          |
| EGF             | <i>Epidermal Growth Factor</i>                               |
| EGFR            | <i>epidermal growth factor receptor</i>                      |
| EMR-C           | <i>Endoskopische Mukosaresektion in Kappentechnik</i>        |
| ENETS           | <i>European Neuroendocrine Tumor Society</i>                 |
| ESD             | <i>endoskopische Submukosa-Dissektion</i>                    |
| EtOH            | <i>Ethanol</i>                                               |
| Fas             | <i>First apoptotic signal</i>                                |
| FOLFIRI         | <i>Folinsäure/5-Fluorouacil/Irinotecan</i>                   |
| FOLFOX          | <i>Folinsäure/5-Fluorouacil/Oxaliplatin</i>                  |
| g               | <i>Gramm</i>                                                 |
| GAPDH           | <i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>              |
| GBR             | <i>Großbritannien</i>                                        |

|                               |                                                                                          |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| GEP-NEN                       | gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien                                      |
| gp                            | Glykoprotein                                                                             |
| GTP                           | <i>Guanosintriphosphat</i>                                                               |
| h                             | Stunde                                                                                   |
| H <sub>2</sub> O              | Wasser                                                                                   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                                                                       |
| hnRNA                         | heterogene nukleäre RNA, heterogene nukleäre RNA                                         |
| HPF                           | High-Power Fields                                                                        |
| HR                            | <i>Hazard Ratios</i>                                                                     |
| HRP                           | <i>Horse Radish Peroxidase</i>                                                           |
| IAPs                          | <i>inhibitors of apoptosis protein</i>                                                   |
| IC <sub>50</sub>              | mittlere inhibitorische Konzentration                                                    |
| IFN                           | Interferon                                                                               |
| IFN-α                         | <i>Interferon-alpha</i>                                                                  |
| IGF                           | <i>Insulin-like Growth Factor</i>                                                        |
| IGFBP                         | <i>insulin-like-growth-factor-binding-protein</i>                                        |
| IgG                           | immune globulin G                                                                        |
| IHC                           | <i>Immunhistochemie</i>                                                                  |
| IL                            | Interleukin                                                                              |
| IP <sub>3</sub>               | Inositol-1,4,5-trisphosphat                                                              |
| IRS                           | <i>Immunreactiv Score</i>                                                                |
| ISR                           | Israel                                                                                   |
| JAK                           | Januskinase                                                                              |
| JPN                           | Japan                                                                                    |
| kDa                           | kiloDalton                                                                               |
| LDCV                          | <i>large dense-core vesicles</i>                                                         |
| M                             | Molare Masse                                                                             |
| mAb                           | monoclonal antibody                                                                      |
| MANEC                         | <i>gemischte adeno-neuroendokrine Karzinome, mixed adeno-neuroendocrine carcinoma</i>    |
| MAP                           | <i>mitogen-activated protein, mitogen-activated protein</i>                              |
| MEN                           | multiple endokrine Neoplasie                                                             |
| MHC                           | <i>major histocompatibility complex class</i>                                            |
| min                           | <i>Minute</i>                                                                            |
| MINEC                         | <i>Mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasms</i>                                 |
| ml                            | <i>Milliliter</i>                                                                        |
| mm                            | <i>Millimeter</i>                                                                        |
| mol                           | Mol, Mol                                                                                 |
| mRNA                          | <i>messenger RNA</i>                                                                     |
| MRT                           | Magnetresonanztomographie                                                                |
| mTOR                          | <i>mammalian Target of Rapamycin</i>                                                     |
| MTS                           | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium |
| MTT                           | <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyl tetrasodium bromide</i>                     |
| n                             | Stichprobengröße                                                                         |
| NADPH                         | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat                                                  |
| NEC                           | Neuroendokrine Karzinome                                                                 |
| NEN                           | Neuroendokrine Neoplasien                                                                |
| NET                           | Neuroendokrine Tumoren                                                                   |
| NF-κB                         | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>                  |
| NGF                           | <i>Nerve Growth Factor</i>                                                               |
| nm                            | <i>Nanometer</i>                                                                         |
| NSE                           | Neurospezifische Enolase                                                                 |
| NT-proBNP                     | NT-pro-brain natriuretic peptide                                                         |
| OCT-4                         | <i>octamer binding transcription factor 3/4</i>                                          |
| PAS                           | <i>periodic acid-Schiff</i>                                                              |
| PBS                           | Phosphatgepufferte Salzlösung                                                            |

|          |                                                                                 |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|
| PCR      | <i>Polymerase change reaction</i>                                               |
| PDGF     | <i>platelet-derived growth factor</i>                                           |
| PET      | <i>Positronenemissionstomographie</i>                                           |
| PIAS     | <i>protein inhibitor of activated STAT, protein inhibitor of activated STAT</i> |
| PKC      | Protein Kinase C                                                                |
| POD      | <i>peroxidase, Peroxidase</i>                                                   |
| PRRT     | Peptidrezeptor-Radiotherapie                                                    |
| pSTAT3   | phosphoryliertes STAT3                                                          |
| PTP      | Protein Tyrosin Phosphatasen, <i>Protein Tyrosin Phosphatase</i>                |
| pTyr     | phosphoryliertes Tyrosin                                                        |
| Ras      | <i>Rat sarcoma</i>                                                              |
| RFA      | Radiofrequenzablation                                                           |
| RIPA     | <i>Radio-Immunpräzipitationsassay</i>                                           |
| RNA      | Ribonukleinsäure                                                                |
| rpm      | <i>rounds per minute</i>                                                        |
| RT       | Raumtemperatur                                                                  |
| s        | <i>Sekunde</i>                                                                  |
| SDS      | <i>Sodium dodecyl sulfate</i>                                                   |
| SEER     | <i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>                               |
| SH       | <i>Src homology</i>                                                             |
| SIRT     | selektive interne Radiotherapie                                                 |
| SNP      | <i>single nucleotide polymorphisms</i>                                          |
| SOCS     | <i>supressor of zytokine signalling, supressor of zytokine signalling</i>       |
| Src      | Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>                                  |
| SSA      | Somatostatin-Analoga, <i>Somatostatin-Analoga</i>                               |
| SSR      | <i>Somatostatin-Rezeptor</i>                                                    |
| SSV      | <i>small synaptic vesikels</i>                                                  |
| STAT     | <i>Signal Transducer and Activator of Transkription</i>                         |
| STAT3    | Signal Transducer and Activator of Transkription 3                              |
| STZ/5-FU | <i>Streptozotocin/5-Fluorouacil</i>                                             |
| TACE     | Chemoembolisation                                                               |
| TAE      | transarterielle Embolisation                                                    |
| TBS      | <i>Tris-buffered saline</i>                                                     |
| TEM/CAP  | <i>Temozolomid/Capecitabin</i>                                                  |
| TEMED    | Tetramethylethylenediamine                                                      |
| TF       | <i>Transkriptionsfaktoren</i>                                                   |
| TGFβ     | <i>Transforming growth factor β</i>                                             |
| TMA      | <i>tissue microarray</i>                                                        |
| TNF      | Tumornekrosefaktor, Tumor Nekrose Faktor                                        |
| TRAIL    | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>                                    |
| tRNA     | transfer-RN                                                                     |
| TSC      | Thiazid-sensitiver Cotransporter                                                |
| Tyk      | Tyrosinkinase                                                                   |
| UICC     | <i>Union Internationale Contre le Cancer</i>                                    |
| US       | <i>United States</i>                                                            |
| UTP      | <i>Uridintriphosphat</i>                                                        |
| V        | <i>Volt</i>                                                                     |
| VEGF     | <i>vascular endothelial growth factor, Vascular endothelial Growth Factor</i>   |
| VHL      | Von-Hippel-Lindau                                                               |
| VIP      | Vasoaktives intestinales Peptid                                                 |
| WHO      | World Health Organization                                                       |
| XIAP     | <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>                                  |
| ZfKD     | Zentrum für Krebsregisterdaten                                                  |

## IV. Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                               |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung .....</b>                                                       | <b>1</b>  |
| 1.1      | Neuroendokrine Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NEN) .. | 1         |
| 1.1.1    | Definition und Terminologie .....                                             | 1         |
| 1.1.2    | Klassifikation .....                                                          | 2         |
| 1.1.3    | Epidemiologie .....                                                           | 3         |
| 1.1.4    | Pathogenese/Ätiologie .....                                                   | 5         |
| 1.1.5    | Klinik .....                                                                  | 6         |
| 1.1.6    | Diagnostik .....                                                              | 7         |
| 1.1.7    | Therapie .....                                                                | 11        |
| 1.1.8    | Nachsorge .....                                                               | 14        |
| 1.2      | Neuroendokrine Karzinome des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NEC)     | 14        |
| 1.3      | Genexpression und Signaltransduktion .....                                    | 16        |
| 1.3.1    | Genexpression: Definition und Überblick .....                                 | 16        |
| 1.3.2    | Transkription: Voraussetzungen, Kontrolle und Ablauf .....                    | 16        |
| 1.3.3    | Signaltransduktion: Definition, Zytokine, Rezeptoren .....                    | 17        |
| 1.4      | Apoptose und Zellproliferation allgemein .....                                | 19        |
| 1.5      | Signal Transducer and Activator of Transkription 3 (STAT3) .....              | 20        |
| 1.5.1    | Definition, Erstentdeckung .....                                              | 20        |
| 1.5.2    | Einordnung in die STAT Familie .....                                          | 20        |
| 1.5.3    | Isoformen .....                                                               | 21        |
| 1.5.4    | Aufbau und Struktur .....                                                     | 21        |
| 1.5.5    | Signalweg .....                                                               | 22        |
| 1.5.6    | Physiologische Funktion .....                                                 | 25        |
| 1.6      | Die Rolle von STAT3 in der Tumorentstehung .....                              | 27        |
| 1.6.1    | STAT3 als Onkogen .....                                                       | 27        |
| 1.6.2    | Durch STAT3 regulierte Gene .....                                             | 28        |
| 1.7      | Inhibition von STAT3 durch Niclosamid .....                                   | 30        |
| 1.7.1    | Anwendung von Niclosamid als Anthelminthikum .....                            | 30        |
| 1.7.2    | Studien zur Niclosamidwirkung .....                                           | 30        |
| 1.7.3    | Struktur und pharmakologische Eigenschaften von Niclosamid .....              | 30        |
| 1.8      | Ziele der Arbeit .....                                                        | 32        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden .....</b>                                            | <b>33</b> |
| 2.1      | Material .....                                                                | 33        |
| 2.1.1    | Geräte .....                                                                  | 33        |
| 2.1.2    | Verbrauchsmaterialien .....                                                   | 34        |
| 2.1.3    | Chemikalien .....                                                             | 34        |
| 2.1.4    | Medium für die Zellkultur .....                                               | 36        |
| 2.1.5    | BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) -Assay .....                                    | 36        |
| 2.1.6    | Antikörper/ Puffer für Westernblot .....                                      | 37        |



|          |                                                                                                                                 |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.7    | Primer/ Referenz-RNA/ Kits für PCR .....                                                                                        | 38        |
| 2.1.8    | Antikörper/ Kits/ Puffer für Immunhistochemie (IHC).....                                                                        | 39        |
| 2.1.9    | Zelllinien.....                                                                                                                 | 39        |
| 2.1.10   | Gewebeproben .....                                                                                                              | 40        |
| 2.1.11   | STAT3 Inhibitor.....                                                                                                            | 41        |
| 2.1.12   | Software.....                                                                                                                   | 41        |
| 2.2      | Methoden .....                                                                                                                  | 41        |
| 2.2.1    | Zellkultivierung.....                                                                                                           | 41        |
| 2.2.2    | Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen .....                                                                                   | 42        |
| 2.2.3    | Pharmakologische Behandlung der Zellen .....                                                                                    | 42        |
| 2.2.4    | Untersuchung der Zellviabilität .....                                                                                           | 42        |
| 2.2.5    | Untersuchung der Zellproliferation.....                                                                                         | 43        |
| 2.2.6    | Proteinchemische Untersuchung.....                                                                                              | 44        |
| 2.2.7    | Molekulargenetische Untersuchungen .....                                                                                        | 48        |
| 2.2.8    | Immunhistochemische Untersuchungen.....                                                                                         | 52        |
| 2.2.9    | Statistische Auswertung .....                                                                                                   | 54        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                                                                                                         | <b>56</b> |
| 3.1      | Expression und Bedeutung von STAT3 in Gewebeproben von<br>gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN).....  | 56        |
| 3.1.1    | Patientenkollektiv.....                                                                                                         | 56        |
| 3.1.2    | Vergleich der Expression von STAT3 zwischen Tumorgewebe und<br>Normalgewebe.....                                                | 57        |
| 3.1.3    | Korrelation der Expression von STAT3 mit klinisch-pathologischen Faktoren ...                                                   | 60        |
| 3.1.4    | Univariate Überlebensanalyse.....                                                                                               | 66        |
| 3.1.5    | Multivariate Überlebensanalyse.....                                                                                             | 70        |
| 3.2      | Expression und Inhibition von STAT3 in den Zelllinien NEC-DUE1-3 .....                                                          | 71        |
| 3.2.1    | Grundexpression von STAT3 und pSTAT3 auf Proteinebene.....                                                                      | 71        |
| 3.2.2    | Wirkung einer STAT3 Inhibition mit Niclosamid auf NEC Zellen .....                                                              | 72        |
| 3.2.3    | Wirkung einer STAT3 Inhibition mittels Niclosamid auf STAT3 und auf Survivin<br>auf Proteinebene .....                          | 72        |
| 3.2.4    | Grundexpression der im STAT3-Signalweg beteiligten Proteine auf RNA<br>Ebene .....                                              | 77        |
| 3.2.5    | Wirkung einer STAT3 Inhibition mit Niclosamid auf die Transkription von Cyclin<br>D1, c-Myc, Survivin, Bcl2 und Cateninb1 ..... | 80        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>                                                                                                          | <b>85</b> |
| 4.1      | Klassifizierung der neuroendokrinen Neoplasien.....                                                                             | 85        |
| 4.2      | Analyse der STAT3 Expression in GEP-NEN Gewebeproben .....                                                                      | 86        |
| 4.2.1    | Grundgedanken .....                                                                                                             | 86        |
| 4.2.2    | Kernaussagen der Immunhistochemischen Untersuchungen .....                                                                      | 87        |
| 4.2.3    | IHC und Untersuchung der Relevanz der STAT3 Expression in der Entstehung<br>von GEP-NEN.....                                    | 87        |

---

|                                      |                                                                                                          |            |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.4                                | IHC und Untersuchung der Relevanz der STAT3 Expression in der Progression von GEP-NEN .....              | 90         |
| 4.2.5                                | IHC und Untersuchung der prognostischen Relevanz der STAT3 Expression ..                                 | 90         |
| 4.3                                  | Analyse der biologischen Relevanz von STAT3 in <i>in vitro</i> Experimenten mit GEP-NEC Zelllinien ..... | 91         |
| 4.3.1                                | Grundgedanken .....                                                                                      | 91         |
| 4.3.2                                | Analyse der Grundexpression von STAT3 in den Zelllinien .....                                            | 91         |
| 4.3.3                                | Niclosamid als Inhibitor von STAT3 .....                                                                 | 92         |
| 4.3.4                                | Auswirkung der STAT3 Inhibition mit Niclosamid auf nachgeschaltete Zielgene<br>94                        |            |
| 4.4                                  | Schlussfolgerungen.....                                                                                  | 99         |
| <b>VII Literaturverzeichnis.....</b> |                                                                                                          | <b>100</b> |

## V. Abbildungsverzeichnis

|             |                                                                                                                                                                     |    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1:     | Übersicht über die Behandlungspfade metastasierter NEN .....                                                                                                        | 14 |
| Abb. 2:     | Schematische Darstellung der Struktur von STAT3 .....                                                                                                               | 22 |
| Abb. 3:     | Signalwege von STAT3 .....                                                                                                                                          | 23 |
| Abb. 4:     | Chemische Struktur von Niclosamid .....                                                                                                                             | 31 |
| Abb. 5:     | Aufbau Westernblot- Kasette und Kammer.....                                                                                                                         | 46 |
| Abb. 6:     | Effizienzkurven der Primer unter Benutzung von humaner Referenz-RNA .....                                                                                           | 52 |
| Abb. 7:     | Anzahl und Ursprung der verwendeten Proben.....                                                                                                                     | 58 |
| Abb. 8:     | Immunhistochemie - STAT3 $\alpha$ Expression in Normal- und Tumorgewebe .....                                                                                       | 58 |
| Abb. 9:     | Immunhistochemie - STAT3 $\alpha$ Expression in Normal- und Tumorgewebe .....                                                                                       | 60 |
| Abb. 10:    | Immunhistochemie - nukleäres STAT3 $\alpha$ weist eine signifikant höhere Expression in G1/2-NEN auf als in G3-NEN.....                                             | 60 |
| Abb. 11:    | Immunhistochemie - STAT3 $\alpha$ Expression in Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen.....                                                        | 62 |
| Abb. 12:    | Kaplan-Meier-Kurven - univariate Überlebensanalyse bezogen auf klinisch-pathologische Parameter .....                                                               | 67 |
| Abb. 13:    | STAT3 und pSTAT3 Expression in den Zelllinien NEC-DUE1-3 .....                                                                                                      | 72 |
| Abb. 14a-c: | Westernblotting - Zeitabhängige Reduktion der Protein-Expression von STAT3 durch Niclosamid in NEC-DUE1-3.....                                                      | 73 |
| Abb. 15a-c: | Westernblotting - Konzentrationsabhängige Reduktion der Expression von STAT3 und Survivin durch Niclosamid in NEC-DUE3 .....                                        | 74 |
| Abb. 16:    | MTS Assay - STAT3 gezielte Therapie reduziert die Zellviabilität in GEP-NEC Zelllinien .....                                                                        | 75 |
| Abb. 17:    | BrdU Assay - STAT3 gezielte Therapie reduziert die Zellproliferation in GEP-NEC Zelllinien .....                                                                    | 77 |
| Abb. 18:    | qPCR - Grundexpression der untersuchten Zielgene Cyclin D1, c-Myc, Survivin, Bcl2 und Cateninb1 in den Zelllinien NEC-DUE1-3 .....                                  | 79 |
| Abb. 19:    | qPCR – Auswirkung einer Behandlung mit Niclosamid auf die Expression der Zielgene Cyclin D1, c-Myc, Survivin, Bcl2 und Cateninb1 in den Zelllinien NEC-DUE1-3 ..... | 82 |

## VI. Tabellenverzeichnis

|             |                                                                                                                                       |    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1:  | Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien nach WHO 2010 .....                                                                     | 2  |
| Tabelle 2:  | Charakteristika der häufigsten funktionell aktiven neuroendokrinen<br>Neoplasien .....                                                | 6  |
| Tabelle 3:  | Labordiagnostik bei GEP-NEN .....                                                                                                     | 8  |
| Tabelle 4:  | Laborgeräte .....                                                                                                                     | 33 |
| Tabelle 5:  | Plastikwaren/Einmalartikel .....                                                                                                      | 34 |
| Tabelle 6:  | Chemikalien .....                                                                                                                     | 34 |
| Tabelle 7:  | Zellkulturmedien .....                                                                                                                | 36 |
| Tabelle 8:  | BrdU-Assay .....                                                                                                                      | 36 |
| Tabelle 9:  | Antikörper für Westernblot .....                                                                                                      | 37 |
| Tabelle 10: | Puffer und Lösungen für Westernblot .....                                                                                             | 37 |
| Tabelle 11: | Primer für die Real Time PCR .....                                                                                                    | 38 |
| Tabelle 12: | Referenz-RNA für die Real Time PCR .....                                                                                              | 39 |
| Tabelle 13: | Kits für die Real Time PCR .....                                                                                                      | 39 |
| Tabelle 14: | Antikörper für Immunhistochemie .....                                                                                                 | 39 |
| Tabelle 15: | Kits für Immunhistochemie .....                                                                                                       | 39 |
| Tabelle 16: | Puffer für Immunhistochemie .....                                                                                                     | 39 |
| Tabelle 17: | Zusammensetzung der Elektrophoresegele .....                                                                                          | 45 |
| Tabelle 18: | Primärantikörper und deren Versuchsbedingungen .....                                                                                  | 46 |
| Tabelle 19: | IRS Score .....                                                                                                                       | 54 |
| Tabelle 20: | Patientencharakteristika der verwendeten TMA Proben .....                                                                             | 56 |
| Tabelle 21: | IRS Werte der Primärtumorproben und Assoziation der STAT3 $\alpha$<br>Expression mit klinisch-pathologischen Variablen .....          | 60 |
| Tabelle 22: | IRS Werte aller Proben von Primärtumor, Lymphknotenmetastasen und<br>Fernmetastasen und Vergleich untereinander .....                 | 62 |
| Tabelle 23: | Kategorisierung der Proben in Expressionsgruppen .....                                                                                | 63 |
| Tabelle 24: | Korrelation zwischen STAT3 $\alpha$ Expression und klinisch-pathologischen<br>Merkmalen in Primärtumorproben .....                    | 63 |
| Tabelle 25: | Korrelation zwischen STAT3 $\alpha$ Expression und klinisch-pathologischen<br>Merkmalen in Fernmetastasenproben .....                 | 64 |
| Tabelle 26: | Korrelation zwischen STAT3 $\alpha$ Expression und klinisch-pathologischen<br>Merkmalen in Lymphknotenmetastasenproben .....          | 65 |
| Tabelle 27: | Log-rank-Test - univariate Überlebensanalyse bezogen auf klinisch-<br>pathologische Parameter und auf STAT3 $\alpha$ Expression ..... | 68 |
| Tabelle 28: | Cox-Regression - univariate Überlebensanalyse bezogen auf klinisch-<br>pathologische Merkmale und auf STAT3 $\alpha$ Expression ..... | 69 |
| Tabelle 29: | Multivariate Überlebensanalyse nach schrittweiser Variablenauswahl .....                                                              | 70 |
| Tabelle 30: | qPCR - Statistische Daten zur Grundexpression der untersuchten Zielgene<br>in den Zelllinien NEC-DUE1-3 .....                         | 79 |
| Tabelle 31: | qPCR - Statistische Daten zur Wirkung der Behandlung mit Niclosamid auf<br>STAT3 abhängige Zielgene .....                             | 83 |
| Tabelle 32: | Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien nach WHO 2017 .....                                                                     | 85 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroendokrine Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NEN)

### 1.1.1 Definition und Terminologie

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) sind eine heterogene Gruppe von Tumoren, die den Zellen des diffusen bzw. disseminierten endokrinen Systems entspringen. Der Nachweis der neurosekretorischen Vesikelproteine Synaptophysin und Chromogranin A ist für die Diagnosestellung einer NEN definierend. (Wiedenmann et al., 1998, Rindi et al., 1986, Buffa et al., 1987, Schott et al., 2011, Kloppel, 2019). Die Tumore können in verschiedensten Organsystemen lokalisiert sein. Zu den NEN gehören unter anderem das kleinzellige Bronchialkarzinom, das Merkelzellkarzinom in der Haut und das Phäochromozytom in den Nebennieren. Mit circa 70 % machen aber die gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN) die Mehrzahl aller neuroendokrinen Tumoren des Menschen aus. Sie können im gesamten Magendarmtrakt, also in Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Appendix, Coecum, Colon und Rektum sowie im Pankreas lokalisiert sein.

Neuroendokrine Zellen kommen verstreut im gesamten Verdauungstrakt vor und produzieren Stoffe, die die Verdauung steuern, wie zum Beispiel Glukagon, Somatostatin oder Insulin. Sie zählen zum disseminierten oder auch diffusen neuroendokrinen System und wurden früher auch als Aminvorläufer aufnehmende und decarboxylierende (*amine precursor uptake and decarboxylation* = APUD) Zellen bezeichnet (Pschyrembel, o. J., Pearse, 1969, Bishop et al., 1982, Klöppel et al., 2003).

Im Jahr 1907 prägte Oberndorfer, der zunächst im Dünndarm lokalisierte neuroendokrine Neoplasien entdeckte, den Begriff „Karzinoide“, um die weniger aggressiven Tumore von den Karzinomen abzugrenzen (Klöppel et al., 2003). Nach Entdeckung weiterer Lokalisationen wurde 1963 von Sandler und Williams die Einteilung nach der Embryogenese in „foregut“-Karzinoide (Lunge, Magen, Duodenum, oberes Jejunum und Pankreas), „midgut“-Karzinoide (unteres Jejunum, Ileum, Appendix und Coecum) und „hindgut“-Karzinoide (Colon und Rektum) vorgenommen. Diese Einteilung stellte sich aber ebenfalls als zu ungenau heraus (Williams and Sandler, 1963, Klöppel et al., 2003). Der Begriff des Karzinoids wurde im Jahr 2004 durch die Bezeichnung neuroendokrine Neoplasien ersetzt (Klöppel et al., 2004). Entsprechend der WHO-Klassifikation von 2010 wird abhängig vom Proliferationsverhalten zudem zwischen neuroendokrinen Tumoren (NET) und neuroendokrinen Karzinomen (NEC) unterschieden.

Ein Großteil der GEP-NEN ist hormonell inaktiv. Ein Teil produziert und sezerniert jedoch aktive Stoffe wie Hormone, Peptide oder Neurotransmitter, sodass sie sich entsprechend der durch diese Stoffe hervorgerufene Symptome bestimmten Krankheitsbildern zuordnen lassen (Wiedenmann et al., 1998).

### 1.1.2 Klassifikation

Im Laufe der Jahre wurde die Einteilung der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumore kontinuierlich weiterentwickelt. Die vorliegende Arbeit orientiert sich an der Klassifikation der World Health Organization (WHO) von 2010. Hier wird zwischen neuroendokrinen Tumoren (NET) und neuroendokrinen Karzinomen (NEC) unterschieden. Diese Einteilung erfolgt entsprechend des Proliferationsbasierten *Gradings* der Neoplasien, welches mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 oder der Mitoserate durch Lichtmikroskopie von 10 *High-Power Fields* (HPF) bestimmt wird (Neumann, o. J.-a, Neumann, o. J.-b). Ki-67 ist ein Protein, das in den aktiven Phasen des Zellzyklus gebildet wird (Neumann, o. J.-b). Die niedrig proliferativen Tumore mit einem Ki-67-Index von  $< 3\%$  bzw. einer Mitoserate von 0 - 1 pro 10 HPF werden als gut differenzierte G1-Tumore klassifiziert. Neoplasien mit einem Ki-67-Index von 3 - 20 % bzw. einer Mitoserate von 2 - 20 pro 10 HPF gelten als mäßig differenzierte G2-Tumore. Ab einem Ki-67-Index von  $> 20\%$  bzw. einer Mitoserate von  $> 20$  pro 10 HPF spricht man von schlecht differenzierten, hochproliferativen neuroendokrinen Karzinomen (G3) (Neumann, o. J.-a, Cives and Strosberg, 2018). Anhand morphologischer Kriterien werden die neuroendokrinen Karzinome weiter in einen großzelligen und einen kleinzelligen Subtypen unterteilt (Schott et al., 2011, Dizdar et al., 2018). Dabei scheinen großzellige NEC bevorzugt in Organen mit Drüsenepithel und kleinzellige NEC in Organen mit Plattenepithel vorzukommen (Dizdar et al., 2018). Eine Übersicht gibt Tabelle 1.

Von den reinen neuroendokrinen Neoplasien werden zudem Mischtumore mit unterschiedlichen histologischen Merkmalen abgegrenzt. So spricht man bei Karzinomen, die neben der neuroendokrinen Komponente auch einen für Adenokarzinome typischen epithelialen drüsenbildenden Phänotyp aufweisen von gemischten adeno-neuroendokrinen Karzinomen (MANEC), wenn die jeweiligen histologischen Komponenten einen Anteil von 30 % übertreffen. Ist der Anteil der neuroendokrinen Zellen geringer, verwendet man den Terminus Adenokarzinom mit neuroendokriner Differenzierung (Reu et al., 2012, de Mestier et al., 2017).

**Tabelle 1: Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien nach WHO 2010**

| Bezeichnung                            | Aufteilung                                |              | Ki-67-Index | Mitoserate        | klinisches Verhalten                            |
|----------------------------------------|-------------------------------------------|--------------|-------------|-------------------|-------------------------------------------------|
| <b>Neuro-endokriner Tumor (NET)</b>    | <b>NET G1</b> ,<br>gut differenziert      |              | $< 3\%$     | $\leq 2$ pro HPF  | langsames Tumorwachstum, benigne/niedrigmaligne |
|                                        | <b>NET G2</b> ,<br>gut differenziert      |              | 3 - 20 %    | 2 - 20 pro HPF    | moderates Tumorwachstum, niedrigmaligne         |
| <b>Neuro-endokrines Karzinom (NEC)</b> | <b>NEC G3</b> ,<br>schlecht differenziert | klein-zellig | $> 20\%$    | $> 20$ pro 10 HPF | schnelles Wachstum, meist hochmaligne           |
|                                        |                                           | groß-zellig  |             |                   |                                                 |

|                                                                               |                                                     |          |          |                       |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------|----------|-----------------------|
| <b>gemischt<br/>adeno-<br/>neuro-<br/>endokrines<br/>Karzinom<br/>(MANEC)</b> | <b>MANEC,</b><br>gut oder schlecht<br>differenziert | variabel | variabel | abhängig vom Phänotyp |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------|----------|-----------------------|

Die Tabelle ist modifiziert nach (Schott et al., 2011). Die Mitoserate ist definiert als Anzahl an Mitosen im Mikroskop pro 10 *High-Power Fields* (HPF). Das Hauptgesichtsfeld ist dabei der sichtbare Ausschnitt eines Präparates bei 400-facher Vergrößerung am Mikroskop (Neumann, o. J.-b).

In der WHO-Klassifikation von 2017 wurde als wichtigste Neuerung die Unterkategorie der gut differenzierten neuroendokrinen Tumore mit hoher Proliferation (NET-G3) eingeführt (Cives and Strosberg, 2018, Neumann, o. J.-a). Diese Tumore waren in der vorherigen WHO-Klassifikation noch in der Kategorie der NEC einzuteilen (Cives and Strosberg, 2018). Im Gegensatz zu NEC besitzen NET-G3 histologisch noch eine erhaltene Architektur. Zudem unterscheiden sich NET-G3 und NEC bezüglich bestimmter genetischer Alterationen (NET-G3: DAXX und ATRX; NEC: TP53 und RB1) (Yachida et al., 2012).

Die TNM-Stadieneinteilung erfolgt in Abhängigkeit vom Organ in dem der Primärtumor lokalisiert ist entsprechend des von der *European Neuroendocrine Tumor Society* (ENETS) vorgeschlagenen Systems zur Stadieneinteilung der neuroendokrinen Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems, welches in der achten Edition des American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer (AJCC/UICC) übernommen wurde (Neumann, o. J.-a). Das Krankheitsstadium sowie das *Grading* sind die wichtigsten unabhängigen prognostischen Parameter und sollten bei allen GEP-NEN immer bestimmt werden (Pavel et al., 2020).

### 1.1.3 Epidemiologie

#### 1.1.3.1 Inzidenz und Prävalenz

Insgesamt sind Neuroendokrine Neoplasien selten (Neumann, o. J.-b, Pape et al., 2004). Gemäß Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert Koch Instituts lag die Inzidenz von GEP-NEN in den Jahren von 2012 bis 2014 für Männer bei 5,3 und für Frauen bei 4,7 pro 100.000 (Kraywinkel, 2018).

Über die letzten Jahrzehnte konnte sowohl in Europa als auch in Amerika eine steigende Prävalenz und Inzidenz der NEN beobachtet werden (Rinke and Gress, 2010). In einer Studie auf Grundlage des *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) Registers, welches Daten aus den Jahren 1973 bis 2012 von 64.971 Patienten mit NEN aus Amerika beinhaltet, wurde ein 6,4-facher Anstieg der Inzidenz von 1,09 pro 100.000 Menschen im Jahre 1973 auf eine Inzidenz von 6,98 pro 100.000 im Jahre 2012 beschrieben. Hierbei zeigten vor allem die GEP-NEN in der Gruppe von 2000 - 2012 eine hohe Inzidenz von 3,56 pro 100.000. Die Prävalenz in der US-Population lag 2014 bei 171.312 (Dasari et al., 2017).

Unklar ist, ob der Grund für die steigende Inzidenz tatsächlich auf einer Zunahme der Entstehung neuroendokriner Neoplasien basiert, oder ob diese Beobachtung auf die kontinuierliche Verbesserung der Diagnostik mit vermehrter Anwendung von

Schnittbildgebung und immunhistologischen Untersuchungen zurückzuführen ist (Rinke and Gress, 2010, Schott et al., 2011).

Die prozentuale Verteilung neuroendokriner Neoplasien innerhalb der unterschiedlichen Organe des menschlichen Körpers unterliegt in Abhängigkeit vom Beobachtungszeitpunkt und -Ort sowie dem Geschlecht und dem ethnischen Hintergrund der Patienten zum Teil erheblichen Unterschieden (Rinke and Gress, 2010). So waren in einer Auswertung des deutschen NET Registers aus dem Jahr 2017 neuroendokrine Neoplasien in Deutschland am häufigsten in Jejunum und Ileum (25,2 %) lokalisiert, gefolgt von Pankreas (23,4 %) und Lunge (5,5 %). In den USA hingegen gilt die Lunge als häufigste Primärlokalisation neuroendokriner Neoplasien, in England und Wales der Dickdarm und in Norwegen der Dünndarm (Rinke and Gress, 2010). Yao beschreibt in seiner epidemiologischen Übersicht basierend auf den SEER Daten von 1973 bis 2004 aus den USA, dass die häufigste Primärtumorlokalisation bei Frauen Lunge, Magen, Appendix und Rektum waren, wohingegen NEN bei Männern zumeist in Thymus, Duodenum, Pankreas, Jejunum/Ileum und Rektum lokalisiert waren (Yao et al., 2008). Bei weißen und afroamerikanischen Patienten waren NEN in Jejunum und Ileum häufiger als bei asiatischen/pazifischen Inselbewohnern und indianischen/alaskischen Patienten (Yao et al., 2008).

Insgesamt scheinen Männer etwas häufiger als Frauen von neuroendokrinen Neoplasien betroffen zu sein (Kraywinkel, 2018). In den NET Registerdaten aus Deutschland von 2017 zeigte sich ein Anteil von 50,8 % männlicher und 49,2 % weiblicher Patienten (Maasberg et al., 2018). Auch weiteren Studien zeigt sich eine lediglich dezent höhere Inzidenz bei Männern (Rinke and Gress, 2010).

Das mittlere Erkrankungsalter von Patienten mit neuroendokrinen Neoplasien liegt für Männer bei 68 Jahren bzw. für Frauen bei 66 Jahren. Betrachtet man die einzelnen Tumorlokalisationen getrennt, so ergeben sich zum Teil erhebliche Unterschiede in Bezug auf das mittlere Erkrankungsalter. So liegt dieses bei Tumoren der Appendix bei 44 Jahren und bei NEN der Haut bei 78 Jahren (Kraywinkel, 2018).

In den deutschen NET Registerdaten von 2017 ist zu erkennen, dass die gut differenzierten NET (G1 und G2) häufiger sind als die schlecht differenzierten NEC (G3). Niedrig proliferative NET-G1 machten insgesamt einen Anteil von 32,1 % und mäßig proliferierende NET-G2 von 29,9 % aller NEN aus. Die NEC machten einen Anteil von 7,6 %, die gemischt adenoneuroendokrinen Karzinome von 1,2 % aus. Bei 29,1 % fehlte die Angabe zum *Grading* (Maasberg et al., 2018).

### **1.1.3.2 Prognose**

Die Prognose von Patienten mit gastroenteropankreatischen Neoplasien variiert erheblich in Abhängigkeit von der Differenzierung des Tumors, der Primärtumorlokalisation, dem Stadium der Erkrankung sowie dem Geschlecht und Alter bei Diagnosestellung (Rinke and Gress, 2010).

Im Rahmen einer Auswertung der SEER-Registerdaten aus Amerika betrug das mediane Überleben aller Patienten mit einem NET 9,3 Jahre. Insgesamt zeigte sich im Laufe der Jahre eine Verlängerung des Überlebens, am ehesten aufgrund verbesserter Therapiestrategien



(Dasari et al., 2017). Im Rahmen der genannten Analyse wurde insbesondere die Abhängigkeit der Prognose von der Tumordifferenzierung deutlich. G1-Tumore hatten mit 16,2 Jahren das längste mediane Überleben, gefolgt von G2-Tumoren mit 8,3 Jahren. G3-Tumore und undifferenzierte Karzinome hatten mit nur 10 Monaten ein deutlich schlechteres medianes Überleben. Gruppiert nach der Lokalisation des Primärtumors besaßen NET des Rektums (medianes Überleben von 24,6 Jahren) und der Appendix (medianes Überleben > 30 Jahre) eine deutlich bessere Prognose als Tumore im Pankreas (medianes Überleben 3,6 Jahre) (Dasari et al., 2017). Auch in epidemiologischen Daten aus Deutschland zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Prognose von der Tumordifferenzierung. NET-G1 und G2 besaßen eine statistisch signifikant günstigere Prognose als G3-Tumore und neuroendokrine Karzinome sowie die gemischt adenoneuroendokrinen Karzinome (Maasberg et al., 2018).

Zusammengefasst hängt die Prognose von Patienten mit GEP-NEN entscheidend von der Tumordifferenzierung ab. Insbesondere Patienten mit schlecht differenzierten GEP-NECs haben eine sehr ungünstige Prognose.

#### 1.1.4 Pathogenese/Ätiologie

Bislang ist wenig über die Ursache von neuroendokrinen Tumoren bekannt. Der Großteil der zugrundeliegenden Mutationen mit circa 85 % tritt sporadisch auf, 15 % haben einen hereditären Hintergrund (Neumann, o. J.-a). Bei den sporadischen Tumoren mit Neumutationen wurde ein breites Spektrum an genetischen Veränderungen beschrieben, so zum Beispiel im MEN 1 Gen (multiple endokrine Neoplasie) bei sporadischen Pankreastumoren. Andere sporadische Mutationen treten zum Beispiel in Genen auf, die für Komponenten des mTOR-Signalwegs (*mammalian Target of Rapamycin*) kodieren. Bei den hereditären GEP-NET liegt eine Keimbahnmutation der ursächlichen Gene vor. Klassische Beispiele für Syndrome bei denen GEP-NEN gehäuft auftreten sind die MEN Typ1, die tuberöse Sklerose, das Von-Hippel-Lindau-Syndrom und die Neurofibromatose (Öberg, 2013, Anlauf et al., 2010). Die genauen Mechanismen, die der Tumorentwicklung zugrunde liegen sind jedoch bislang nicht bekannt (Öberg, 2013, Goebel et al., 2000, Anlauf et al., 2010).

Das MEN-1 wird autosomal-dominant vererbt und wird auch Wermer-Syndrom genannt (Amboss GmbH, o. J.-a). Ihm liegen Mutationen im MEN-1 Gen zugrunde, welches für das Protein Menin kodiert (Cives and Strosberg, 2018). Dieses wiederum spielt eine Rolle in der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren oder Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Reparationsfaktoren (Öberg, 2013). Klinisch manifestiert es sich durch das Auftreten von Nebenschilddrüsenadenomen (zu 95 %), Hypophysenadenomen (zu 30 - 50 %) sowie neuroendokrinen Neoplasien im Pankreas (zu 50 - 80 %). Die Leiterkrankung dieses Syndroms ist der primäre Hyperparathyreoidismus. Die Pankreastumore treten häufig multifokal auf und können sowohl hormonaktiv (z.B. Gastrinome oder Insulinome) als auch hormonell inaktiv sein (Cives and Strosberg, 2018, Amboss GmbH, o. J.-a).

Beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Mutation im VHL Gen, die zu unkontrollierter Produktion von Zytokinen wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und PDGF (*platelet-derived growth factor*) führt. Mit dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom assoziierte Tumoren und Zysten treten hauptsächlich in der

Niere, der Bauchspeicheldrüse (pankreatische NEN), den Nebennieren, den Fortpflanzungsorganen und dem zentralen Nervensystem auf (Cives and Strosberg, 2018, Amboss GmbH, o. J.-b).

Die Neurofibromatose Typ 1, früher Morbus Recklinghausen, ist eine Erkrankung mit autosomal-dominantem Erbgang, bei dem das Protein Neurofibromin mutiert ist, was zu einer Deregulierung des *Rat sarcoma* (Ras)- und mTOR-Signalwegs führt (Cives and Strosberg, 2018). Typisch sind Hautveränderungen wie Café-au-lait-Flecken und das Vorkommen von multiplen Neurofibromen (Amboss GmbH, o. J.-b). Die Patienten haben ein erhöhtes Risiko, Tumore wie Phäochromozytome, Paragangliome und duodenale Somatostatinome sowie pankreatische neuroendokrinen Tumore zu entwickeln (Rogers et al., 2015).

Die autosomal-dominante tuberöse Sklerose wird verursacht durch Mutationen in den Tumorsuppressorgenen TSC (Thiazid-sensitiver Cotransporter)1 und TSC2, die für die Proteine Hamartin und Tuberin kodieren. Der Komplex dieser Proteine beeinflusst intrazelluläre Signalwege, die das Zellwachstum und die Zellproliferation steuern (Dworakowska and Grossman, 2009). Es kommt zu Hamartomen in multiplen Organen, aber auch zu pankreatischen NEN in 1 - 5 % der Fälle (Cives and Strosberg, 2018).

### 1.1.5 Klinik

Neuroendokrine Neoplasien sind eine Gruppe von Tumoren mit einer großen Heterogenität in Bezug auf ihre klinische Symptomatik und Prognose (Rinke and Gress, 2010). Die Symptomatik hängt unter anderem von der hormonellen Aktivität, der Lokalisation und der Tumorausdehnung ab (Schott et al., 2011). Man unterscheidet funktionell aktive von funktionell inaktiven Tumoren. Der Großteil der Tumore ist hormonell inaktiv (Neumann, o. J.-b). Die funktionell aktiven Tumore sezernieren Hormone, was zu typischen Hypersekretionssyndromen führen kann (Rinke and Gress, 2010). Klassische Beispiele sind das im Pankreas lokalisierte Insulinom sowie die zumeist im Pankreas oder im Duodenum lokalisierten Gastrinome. Zudem können typischerweise im Dünndarm lokalisierte NEN durch die übermäßige Produktion vor allem von Serotonin ein sogenanntes Karzinoid-Syndrom hervorrufen (Rinke and Gress, 2010). Insbesondere nach hepatischer Metastasierung eines serotoninproduzierenden Dünndarm- NET können höhere Konzentrationen von Serotonin in den Blutkreislauf gelangen und zu Symptomen wie Diarrhoe, anfallsartigen Hautrötungen (*Flush*), krampfartigen Bauchmerzen, Bronchokonstriktion und einer Endokardfibrose (Hedinger-Syndrom) führen (Rinke and Gress, 2010, Neumann, o. J.-a). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über verschiedene hormonell aktive GEP-NEN (in Anlehnung an (Neumann, o. J.-b, Rinke and Gress, 2010)).

**Tabelle 2: Charakteristika der häufigsten funktionell aktiven neuroendokrinen Neoplasien**

| <b>Tumor/<br/>Syndrom</b>           | <b>Hormon</b> | <b>Leitsymptome</b>    | <b>Tumorlokali<br/>sation</b> |
|-------------------------------------|---------------|------------------------|-------------------------------|
| Insulinom/<br>Hyperinsulinism<br>us | (Pro-)Insulin | Hypoglykämie-Symptome: | Pankreas                      |

|                                                                     |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                          |                                          |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|                                                                     |                                                                                                          | <u>bei Neuroglykopenie</u> Kopfschmerz,<br>Diplopie, Sehstörung, Verwirrtheit,<br>Schwindel, Koma<br><u>bei autonomer Gegenregulierung</u><br>Palpitationen, Schweißausbrüche,<br>Tremor |                                          |
| Gastrinom/<br>Zollinger-<br>Ellison-Syndrom                         | Gastrin                                                                                                  | Ulkusleiden, Diarrhoe,<br>Refluxsymptomatik                                                                                                                                              | Pankreas,<br>Duodenum                    |
| Karzinoid-<br>Syndrom                                               | Serotonin<br>Tachykinine,<br>Bradykinine,<br>Histamin                                                    | <i>Flushs</i> , Diarrhoe, rezidivierende,<br>krampfartige Bauchschmerzen,<br>Bronchokonstriktion,<br>bei Karzinoid-Herzerkrankung<br>Rechtsherzbelastung                                 | Ileum,<br>Jejunum,<br>Colon<br>ascendens |
| VIPom/ Verner-<br>Morrison-<br>Syndrom,<br>pankreatische<br>Cholera | Vasoaktives<br>intestinales<br>Peptid (VIP)                                                              | massive Diarrhoe, Hypokaliämie                                                                                                                                                           | Pankreas                                 |
| Glucagonom-<br>Syndrom                                              | Glucagon                                                                                                 | Erythema necrolyticans migrans,<br>Gewichtsverlust, Diabetes                                                                                                                             | Pankreas                                 |
| GHRHom/<br>Akromegalie                                              | GHRH<br>( <i>Growth<br/>Hormon-<br/>releasing-<br/>Hormon</i> )                                          | Akromegalie-Symptome                                                                                                                                                                     | Pankreas                                 |
| CRHom/<br>ACTHom/Cushi-<br>ng-Syndrom                               | <i>Corticotropin<br/>-Releasing-<br/>Hormon</i><br>(CRH),<br>Adrenocortik<br>otropes<br>Hormon<br>(ACTH) | Cushing-Syndrom                                                                                                                                                                          | Pankreas                                 |

Gezeigt sind die häufigsten funktionell aktiven Tumore, die von ihnen hauptsächlich sezernierten Hormone, sowie die durch diese hervorgerufenen Leitsymptome und die häufigste Lokalisation des Primärtumors. Angelehnt an (Neumann, o. J.-b, Rinke and Gress, 2010).

### 1.1.6 Diagnostik

Die Diagnostik von neuroendokrinen Neoplasien setzt sich aus den Bestandteilen biochemische Labordiagnostik, bildgebende (endoskopische und Schnittbild-) Diagnostik und pathologische Basisdiagnostik zusammen (Neumann, o. J.-a).

### 1.1.6.1 Labordiagnostik

Es gibt sowohl allgemeine als auch spezielle Tumormarker und biochemische Tests in der laborchemischen Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren. Die Bestimmung der speziellen Marker und die Durchführung spezieller Tests führt man entsprechend der durch die Tumoren verursachte Klinik, der Tumorkalisation und der gestellten Verdachtsdiagnose durch, um diese für die Diagnostik und Verlaufsbeobachtung zu nutzen (Neumann, o. J.-b, Rinke et al., 2018).

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über sinnvolle Labordiagnostik bei GEP-NEN (Neumann, o. J.-b, Schott et al., 2011).

**Tabelle 3: Labordiagnostik bei GEP-NEN**

|                              | <b>Syndrom/ Tumor</b>                                                 | <b>Labordiagnostik</b>                                                                                     |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Allgemeine Diagnostik</b> | bei allen NEN, zumindest einmalig, zur Verlaufskontrolle              | Chromogranin A im Serum                                                                                    |
|                              | bei allen NEN G3, zumindest einmalig                                  | Neurospezifische Enolase im Serum                                                                          |
|                              | Pankreatische NET oder bei unbekanntem Primarius                      | Pankreatisches Polypeptid im Serum                                                                         |
|                              | Pankreatische NET                                                     | $\alpha$ - und $\beta$ - Einheit von hCG im Serum                                                          |
| <b>Spezielle Diagnostik</b>  | bei Karzinoid-Syndrom, bei allen NEN des Dünndarms zumindest einmalig | 5-HIES im 24-Stunden-Sammelurin                                                                            |
|                              | bei Karzinoid-Syndrom zum Detektieren einer Karzinoid-Herzerkrankung  | NT-proBNP im Serum                                                                                         |
|                              | Insulinom                                                             | Glucose im Serum, Insulin/ C-Peptid im Serum, 72-Stunden-Fastentest                                        |
|                              | Gastrinom (Zollinger-Ellison-Syndrom)                                 | Gastrin im Serum, Sekretintest, gastrale 24-Stunden-pH-Metrie                                              |
|                              | VIPom (Verner-Morrison-Syndrom)                                       | VIP im Serum                                                                                               |
|                              | Glukagonom                                                            | Glukose im Serum, Glukagon im Serum                                                                        |
|                              | Ektopes ACTHom                                                        | Kortisol im 24-Stunden-Sammelurin, ACTH im Serum, Dexamethason-Hemmttest, Kortisol im Mitternachtsspeichel |

|  |                |                                              |
|--|----------------|----------------------------------------------|
|  | Ektopes GHRHom | STH und IGF-1 im Serum, STH-Suppressionstest |
|  | Somatostatinom | Somatostatin im Serum                        |

Gezeigt sind allgemeine und spezielle Tumormarker und biochemische Tests, angelehnt an (Neumann, o. J.-b, Schott et al., 2011, Oberg et al., 2017, Rinke et al., 2018). STH = somatotropes Hormon, IGF-1 = *insulin-like-growth-factor-1*, 5-HIES = 5-Hydroxyindolessigsäure, hCG = humanes Choriongonadotropin, NT-proBNP = *NT-pro-brain natriuretic peptide*

Chromogranin A ist der wichtigste allgemeine Tumormarker für GEP-NEN. Die Sk2-Leitlinie von 2018 empfiehlt dessen Bestimmung mindestens einmalig bei allen NEN (Rinke et al., 2018). Es handelt sich dabei um ein Protein, bestehend aus 439 Aminosäuren, welches in den dichten Granula im Zellkern der meisten neuroendokrinen Zellen vorhanden ist. Zusammen mit den dort vorhandenen Aminen und Peptiden wird es sezerniert und kann bei funktionell aktiven wie inaktiven neuroendokrinen Neoplasien im Serum erhöht sein. Es wird eine Sensitivität und Spezifität von 60 - 80 % angegeben (Oberg et al., 2017). Die Plasmakonzentration korreliert mit der Tumormasse bzw. dem Tumolvolumen (Nobels et al., 1997), weswegen Chromogranin A besonders als Verlaufsparemeter zur Steuerung der Therapie und Nachsorge bestimmt werden sollte (Rinke et al., 2018). Da das Chromogranin A jedoch aufgrund verschiedenster Ursachen erhöht sein kann ist eine Anwendung als Screeningparameter nicht sinnvoll (Rinke et al., 2018). So wird der Serumspiegel des Chromogranin A unter anderem durch die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren, eine beeinträchtigte Nierenfunktion, einen Morbus Parkinson, eine unbehandelte Hypertonie und eine Schwangerschaft beeinflusst; hier kommt es zu falsch hohen Chromogranin A Werten (Oberg et al., 2017). Auch kann es in bis zu 30 % bei nicht-neuroendokrinen Tumoren erhöht sein, wie zum Beispiel bei Prostatakarzinomen (Rinke et al., 2018). Bei neuroendokrinen Karzinomen ist das Chromogranin A im Serum in zwei Drittel der Fälle erhöht (Garcia-Carbonero et al., 2016).

Die Neurospezifische Enolase (NSE) kommt als Enzym im Zytoplasma von Zellen neuronalen und neuroektodermalen Ursprungs vor (Rinke et al., 2018). Bei gut differenzierten NET weist die NSE eine geringere Spezifität und Sensitivität als Chromogranin A auf. Eine erhöhte neurospezifische Enolase kommt jedoch besonders bei schlecht differenzierten und hoch proliferativen neuroendokrinen Neoplasien vor und besitzt eine prognostische Aussagekraft, weshalb die Bestimmung der NSE bei hochproliferativen Tumoren mit dem *Grading* G2 und G3 empfohlen wird (Rinke et al., 2018, Neumann, o. J.-a).

Ein weiterer Marker ist die 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES). Sie ist das Abbauprodukt von Serotonin, dessen Sekretion hauptsächlich für das Karzinoid-Syndrom ursächlich ist. Es gilt als wichtiger Parameter für Diagnose und Verlaufskontrolle eines fortgeschrittenen hormonaktiven NET des Dünndarms, kann aber auch bei hormoninaktiven Tumoren erhöht sein. Es sollte zumindest bei allen Dünndarm-NEN einmalig bestimmt werden. Sind andere Substanzen für das Karzinoid-Syndrom verantwortlich, kann die 5-HIES normwertig sein trotz Vorhandensein eines Karzinoid-Syndroms (Rinke et al., 2018). Aufgrund hoher individueller Schwankungen bei der Bestimmung im Serum sollte die 5-HIES Konzentration im angesäuerten 24-Stunden-Sammelurin gemessen werden (Rinke and Gress, 2010). Zudem sollte die Einnahme von interagierenden Lebensmitteln und Medikamenten wie Kaffee, Tee,

Schokolade, Heparin oder L-Dopa drei Tage vor der Urinprobe vermieden werden (Neumann, o. J.-b). Zur Aufdeckung einer möglichen Karzinoid-Herzerkrankung sollte das *NT-pro-brain natriuretic peptide* (NT-proBNP) im Serum untersucht werden (Knigge et al., 2017).

Bei Verdacht auf ein Insulinom ist die Whipple-Trias entscheidend für das Stellen der Verdachtsdiagnose: Gemeint ist hierbei die Kombination folgender Merkmale, die das Vorliegen eines Insulinoms wahrscheinlich machen. 1. Hypoglykämiesyndrome, 2. Nachweis von Blutzuckerspiegeln  $\leq 50$  mg/dl, 3. die Rückbildung der Symptome nach Gabe von Glukose (Rinke and Gress, 2010). Zur Bestätigung ist die Durchführung eines stationären 72-Stunden-Hungertestes der Goldstandard (Rinke et al., 2018). Hierbei werden regelmäßig Blutzucker, Insulin und C-Peptid im venösen Blut bestimmt. Kriterien für das Vorliegen eines Insulinoms sind dabei zum Beispiel die Kombination von erniedrigten Blutzuckerspiegeln  $\leq 40$  mg/dl bei gleichzeitig erhöhten Insulinspiegeln und erhöhten C-Peptidspiegeln (Rinke and Gress, 2010). Gleichzeitig sollte die wichtigste Differenzialdiagnose, die faktitielle Hypoglykämie, ausgeschlossen werden (Rinke et al., 2018).

Der Nachweis von Nüchtern-Gastrinwerten von  $> 1000$  pg/ml zusammen mit in einer Gastroskopie gemessenen intragastralem pH Wert von  $< 2,5$  ist praktisch beweisend für das Vorliegen eines Gastrinoms (Schott et al., 2011). Hierbei sollten eine Woche vor Bestimmung Protonenpumpeninhibitoren abgesetzt werden. Die Durchführung eines ergänzenden Sekretin-Tests ist bei geringgradigerer Hypergastrinämie empfohlen. Zudem sollte an das Vorliegen eines MEN-2-Syndroms gedacht werden und als Basisscreening das Serumparathormon und Calcium bestimmt werden (Rinke and Gress, 2010).

Auch bei den seltener vorkommenden funktionell aktiven NEN werden die sezernierten Hormone im Blut bestimmt. Bei einem Glukagonom-Syndrom zum Beispiel der Plasma-Nüchternwert von Glukagon, bei einem ACTHom das Plasma-ACTH, ergänzt durch den Cortisolwert im 24-Stunden-Sammelurin und durch die Durchführung eines Dexamethason-Hemmtests (Rinke and Gress, 2010).

#### **1.1.6.1 Bildgebende und endoskopische Diagnostik**

Abhängig von Typ und Lokalisation der NEN haben die verschiedenen Verfahren unterschiedliche Wertigkeiten (Schott et al., 2011). Zur Tumorlokalisation werden sowohl Sonographie, Endoskopie in Form von Oesophago-Gastro-Duodenoskopie und Ileo-Koloskopie, als auch Kontrastmittel-Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) angewandt (Neumann, o. J.-a). Bei Tumoren in Pankreas, Magen, Rektum und Duodenum wird zudem die Durchführung der Endosonographie empfohlen. Bei einem Karzinoid-Syndrom sollte man eine Echokardiographie durchführen, um eine Karzinoid-Herzerkrankung auszuschließen (Neumann, o. J.-b). Eine weitere Möglichkeit im Rahmen der Diagnostik von GEP-NEN stellt die nuklearmedizinische Bildgebung mittels eines 68-Gallium-DOTA-TATE-PET/CT dar. Hierbei wird ein Somatostatin-Analogon (SSA), welches über das DOTA Molekül an den Positronen-Emitter Gallium-68 gebunden ist, verwendet. Da mehr als 90 % der GEP-NEN den Somatostatin-Rezeptor (SSR) exprimieren, kann man mit dieser Methode die Mehrzahl aller

GEP-NEN nachweisen. Eine alternative Methode ist die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (Neumann, o. J.-a, Rinke et al., 2018).

Zur Probengewinnung für die pathologische Untersuchung werden im Wesentlichen endoskopische Verfahren angewandt. Ist dies nicht möglich, können endosonographische oder perkutane Methoden zur Probengewinnung genutzt werden (Garcia-Carbonero et al., 2016, Rinke et al., 2018).

#### 1.1.6.2 Pathologische Diagnostik

Bei der pathologischen Untersuchung können und sollten Angaben zu folgenden Kriterien gemacht werden: die histologische Klassifizierung in NET oder NEC, der Differenzierungsgrad, der Proliferationsgrad mittels Ki-67-Index und das damit verbundene *Grading*, sowie die TNM-Klassifikation, die sich an der UICC-Klassifikation und der ENETS-Leitlinie orientiert (Rinke et al., 2018). Der Differenzierungsgrad meint dabei, inwiefern die Tumorzellen den neuroendokrinen nicht-Tumorzellen ähneln. Gut differenzierte Tumorzellen weisen eine organoide Architektur auf, zum Beispiel in Form von trabekulären Mustern. Zudem gleichen sich die Zellen untereinander. Man erkennt mehr neurosekretorische Granula. Schlecht differenzierte Zellen präsentieren sich dahingegen mit einer diffusen Zellordnung, die Kerne sind unregelmäßig, die Granularität ist weniger ausgeprägt (Klimstra et al., 2010). Standard ist dabei die Hämatoxylin Färbung, ergänzend hilft die *periodic acid*-Schiff-Färbung (PAS-Färbung) bei der Identifizierung von sekretorischen Vesikeln (Neumann, o. J.-a).

Die neuroendokrine Entität kann durch immunhistochemische Methoden nachgewiesen werden. Dafür untersucht man das Vorkommen von Proteinen, die typisch für neuroendokrine Zellen sind. Der Nachweis von solchen neuroendokrinen Vesikelpoteinen, hauptsächlich Chromogranin A und Synaptophysin, ist dabei definierend für die Diagnosestellung einer NEN (Rinke et al., 2018). Neuroendokrine Zellen sezernieren ihre Produkte über zwei Arten von sekretorischen Vesikeln. Die sogenannten *large dense-core vesicles* (LDCV) und die *small synaptic vesicles* (SSV). Chromogranin A ist ein Matrix Protein der LDCV. Diese wies man vor Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von Chromogranin A noch elektromikroskopisch nach. Synaptophysin ist ein Bestandteil der Membranen von SSV. Diese ähneln den in Nervenzellsynapsen vorkommenden „kleinen synaptischen Vesikeln“ und sind klare Vesikel, die Transmitter geringen Molekulargewichts enthalten. Synaptophysin ist für GEP-NEN ein sogar spezifischerer Marker als Chromogranin A und kann auch in undifferenzierten neuroendokrinen Zellen nachgewiesen werden (Buffa et al., 1987, Rindi et al., 1986, Wiedenmann et al., 1998).

#### 1.1.7 Therapie

Die Behandlung und Betreuung von Patienten mit neuroendokrinen Neoplasien sollte in spezialisierten Zentren und interdisziplinär durchgeführt werden. Es gibt ein großes Spektrum von therapeutischen Maßnahmen, bei denen Chirurgen, Onkologen, Endokrinologen, Gastroenterologen, Nuklearmediziner und interventionelle Radiologen mitwirken (Neumann, o. J.-b).

### 1.1.7.1 Therapieziele

In Abhängigkeit von der Lokalisation des Primarius, dem histologischen *Grading* sowie der lokalen und systemischen Tumorausbreitung kann eine Vielzahl verschiedener therapeutischer Maßnahmen zum Einsatz kommen. Diese reichen von der endoskopischen oder chirurgischen Resektion des Primarius über Metastasenresektionen und Debulking-Operationen hin bis zur Radiofrequenzablation von Metastasen, interventionellen Embolisierungstechniken, nuklearmedizinischen Therapien oder der Anwendung verschiedener Chemotherapeutika (Breitling et al., 2019, Neumann, o. J.-a).

### 1.1.7.2 Kurative Therapie

Bei nicht oder nur umschrieben metastasierten neuroendokrinen Neoplasien, strebt man im Sinne einer kurativen Therapie die vollständige Resektion des Tumors an. Abhängig von der Tumorgröße kann dies endoskopisch oder operativ geschehen. Indikation für das endoskopische Vorgehen sind vor allem ein geringes Stadium und eine Tumorgröße von < 1 cm, teilweise bis zu 2 cm. So ist eine endoskopische Resektion z. B. bei NET des Magens mit einer Größe von 1-2 cm, nicht funktionellen duodenalen G1-NET mit einer Größe von < 1 cm und rektalen G1-NET mit einer Größe von < 1 cm möglich. Die endoskopischen Resektionen können durch eine Mukosaresektion mit Kappentechnik (EMR-C) oder die endoskopische Submukosa-Dissektion (ESD) erfolgen (Breitling et al., 2019).

Bei der chirurgischen Resektion gelten onkologische Resektionsprinzipien. Die Lokalisation des Primärtumors, seine Größe und Biologie sind entscheidend für Art und Umfang der Operation. Bei pankreatischen NEN zum Beispiel erstreckt sich das Ausmaß der operativen Therapie von der Enukleation des Tumors über die Pankreasschwanzresektion bis hin zur Pankreatektomie und multiviszeralen Resektion. Auch bei Vorliegen von multiplen Metastasen, vor allem im Bereich der Leber, kann eine chirurgische Resektion sinnvoll sein. Hier reichen die Eingriffe von atypischen offenen oder laparoskopischen Leberresektionen bis zu erweiterten Hemihepatektomien (Schott et al., 2011).

### 1.1.7.3 Symptomatische Therapie

Die symptomatische Therapie kommt insbesondere bei Hypersekretionssyndromen zum Tragen. Bei einem Karzinoid-Syndrom werden hauptsächlich Somatostatin-Analoga (SSA) angewandt, die an die Somatostatin-Rezeptoren der Tumorzellen binden und damit die Sekretion von biogenen Peptiden und Aminen verhindern. Substanzen sind die Depotpräparate Octreotid und Lanreotid, die alle 4 Wochen injiziert werden. Bei unzureichendem Ansprechen wird zudem bei starken Diarrhoen der Somatostatin-Synthesehemmer Teloristat angewendet (Neumann, o. J.-a, Breitling et al., 2019). Die Hypoglykämien bei einem Insulinom werden mittels Glucosegabe behandelt, dabei kann zusätzlich Diazoxid oder das hyperglykämisch wirkende Everolimus eingesetzt werden. Bei Gastrinomen kann die übermäßige Magensäuresekretion mittels Protonenpumpeninhibitoren therapiert werden (Breitling et al., 2019).



#### 1.1.7.4 Antiproliferative Therapie

Ist eine kurative Resektion nicht möglich können verschiedene antiproliferative Verfahren eingesetzt werden. Im Rahmen der medikamentösen Therapie kommen die Somatostatin-Analoga, zytotoxische Chemotherapien und molekular gerichtete Substanzen zum Einsatz. Weitere Therapieoptionen stellen die Radiofrequenzablation von Metastasen, interventionelle Embolisierungstechniken und die nuklearmedizinisch durchgeführte Peptidrezeptor-Radiotherapie dar.

Neben der in Abschnitt 1.1.7.3 genannten antisymptomatischen Wirkung haben SSA auch eine antiproliferative Wirkung. Besitzen GEP-NEN Somatostatin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, gelten Octreotid und Lanreotid als Erstlinientherapeutika bei gering proliferativen funktionell aktiven wie auch inaktiven NET, also bei allen G1- und G2-NEN (Neumann, o. J.-a, Breitling et al., 2019). Bei Unverträglichkeiten oder bei negativem SSR-Status kann alternativ oder additiv Interferon  $\alpha$  verwendet werden (Neumann, o. J.-a).

Da der Anteil von proliferativen Zellen bei G1- und G2- Tumoren geringer ist, sprechen diese in der Regel nicht auf aktuell verwendete Chemotherapien an (Neumann, o. J.-b). Eine Ausnahme bilden die pankreatischen G1- und G2-Tumore. Bei ihnen kann die Kombination aus Streptozotocin und 5-Fluorouracil als Zweitlinientherapie angewendet werden. Bei gut differenzierten aber hoch proliferativen NET-G3 hat sich die Anwendung einer Kombination aus Temozolomid und Capecitabin etabliert (Neumann, o. J.-a, Breitling et al., 2019). Fortgeschrittene, nicht resektable neuroendokrine Karzinome (NEC) werden typischerweise mit einer Kombination aus zytotoxischen platinhaltigen Substanzen (Cis- oder Carboplatin) und Etoposid therapiert. Alternativ kommen auch Kombinationschemotherapien wie FOLFOX (Folinsäure/5-Fluorouracil/Oxaliplatin), FOLFIRI (Folinsäure/5-Fluorouracil/Irinotecan) oder Temozolomid/Capecitabin zum Einsatz.

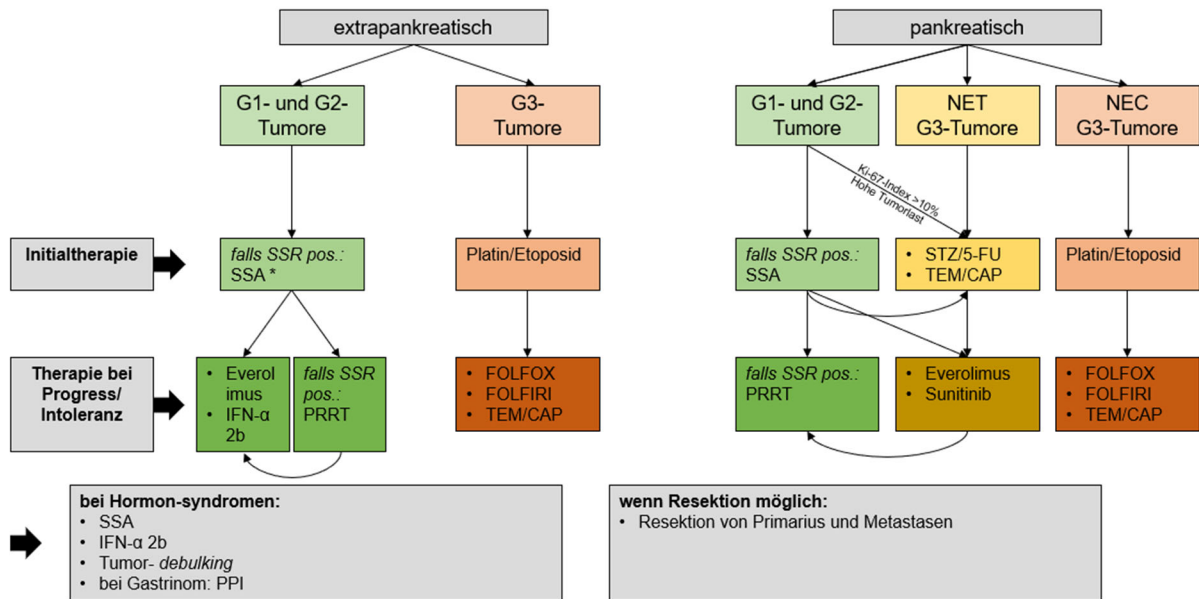
Molekular gerichtete Medikamente sind der mTOR-Inhibitor Everolimus und der Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib. Everolimus wird in der Zweit- oder Drittlinientherapie bei gut differenzierten Tumoren angewendet. Sunitinib dient als Alternative zu Everolimus bei pankreatischen gut differenzierten Tumoren. Bei den schlecht differenzierten NEC werden diese Therapeutika nicht angewendet (Neumann, o. J.-a, Breitling et al., 2019).

Bei Progress unter der medikamentösen Therapie mit SSA kann bei G1- und G2-gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren die Peptidrezeptor-Radiotherapie (PRRT) angewendet werden. Voraussetzung ist hier ebenfalls das Vorhandensein von Somatostatin-Rezeptoren. Im Rahmen dieser Therapie werden mit dem Beta- und Gammastrahler Lutetium-177 verbundene Somatostatin Analoga verwendet. Durch die Bindung des Somatostatinanalogons an die Rezeptoren im Tumorgewebe kommt es zu einer spezifischen Anreicherung des radioaktiven Lutetium-177 im Tumor. Auf diese Weise können sehr hohe Strahlendosen hoch- spezifisch und unter größtmöglicher Schonung des gesunden Gewebes direkt am Tumor appliziert werden (Neumann, o. J.-a).

Interventionell radiologische lokal-ablative oder lokoregionäre Verfahren werden bei nicht resezierbaren Lebermetastasen eingesetzt. Hierunter fallen die Radiofrequenzablation (RFA),

die transarterielle Embolisation (TAE), die Chemoembolisation (TACE) und die selektive interne Radiotherapie (SIRT) (Breitling et al., 2019).

Abb. 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Behandlungswege metastasierter neuroendokriner Neoplasien, modifiziert nach (Breitling et al., 2019).



**Abb. 1: Übersicht über die Behandlungspfade metastasierter NEN**

Es werden die Behandlungsempfehlungen abhängig von Tumorlokalisation und Voraussetzungen wie dem Somatostatin-Rezeptor (SSR)-Status angezeigt. \* initiale *watch-and-wait*-Strategie bei engmaschiger Kontrolle bei asymptomatischen, niedrigproliferativen NEN-G1 mit geringer Tumorlast möglich. SSA = Somatostatin-Analoga, IFN-α 2b = Interferon-alpha 2b, PRRT = Peptidrezeptor-Radiotherapie, FOLFOX = Folinsäure/5-Fluorouacil/Oxaliplatin, FOLFIRI = Folinsäure/5-Fluorouacil/Irinotecan, TEM/CAP = Temozolomid/Capecitabin, STZ/5-FU = Streptozotocin/5-Fluorouacil, Abbildung modifiziert nach (Breitling et al., 2019).

### 1.1.8 Nachsorge

Die Nachsorge von Patienten mit GEP-NEN sollte wenn möglich in einem spezialisierten Zentrum erfolgen. Nach vollständiger Resektion als auch bei fortgeschritten metastasierten NEN sollten regelmäßig Verlaufskontrollen durchgeführt werden, bei letzteren in kürzeren Intervallen. Für laborchemische Untersuchungen eignet sich vorrangig das Chromogranin A als auch initial tumorspezifisch erhöhte Hormone. Als bildgebende Verfahren eignen sich CT oder MRT, in größeren Intervallen die SSRT-Bildgebung mittels Positronenemissionstomographie (PET)-CT (Neumann, o. J.-a).

## 1.2 Neuroendokrine Karzinome des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NEC)

Die neuroendokrinen Karzinome des gastroenteropankreatischen Systems stellen eine gesonderte Gruppe unter den NEN dar. Im Rahmen der WHO-Klassifikation von 2010 wurden NECs anhand des Ki-67-Proliferationsindex von > 20 % definiert. In der WHO-Klassifikation von 2017 wurde dann als wichtigste Neuerung die Unterkategorie der gut differenzierten neuroendokrinen Tumore mit hoher Proliferation (NET-G3) eingeführt (Cives and Strosberg,

2018, Neumann, o. J.-a). GEP-NEC zeichnen sich demnach durch eine schlechte Differenzierung (ungeordnete Architektur und charakteristische Zellmorphologie) und hohe Proliferationsraten (Ki-67-Proliferationsindex > 20 %) aus. Anhand morphologischer Kriterien können die GEP-NEC in einen großzelligen und einen kleinzelligen Typen unterteilt werden (Sorbye et al., 2014).

Bei der immunhistologischen Diagnostik gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome ist der Nachweis von Synaptophysin wegweisend, da Chromogranin A in den schlecht differenzierten Karzinomen häufig nicht exprimiert wird (Sorbye et al., 2013) (Cives and Strosberg, 2018). So konnte Synaptophysin in einer Studie von Welin et al. bei 100 % der untersuchten GEP-NECs nachgewiesen werden (Welin et al., 2011).

Von allen GEP-NEN machen die NEC mit 10 % bis 20 % einen kleinen Anteil aus (Sorbye et al., 2014). Typische Lokalisationsstellen für GEP-NECs sind Oesophagus, Magen, Pankreas und Colon (Sorbye et al., 2013).

Wie bei den GEP-NEN insgesamt nimmt auch in der Untergruppe der GEP-NEC die Inzidenz in den vergangenen Jahren zu (Sorbye et al., 2014, Kang et al., 2007, Cho et al., 2012). Eine Analyse des niederländischen Krebsregisters zeigt, dass bei den GEP-NEC insbesondere der Subtyp der großzelligen Karzinome einen Anstieg der Inzidenz verzeichnet: Im Zeitraum von 1990 - 2000 lag die Inzidenz bei 0,15 pro 100.000 Personen, und stieg im Zeitraum von 2000 - 2010 auf 0,36 pro 100.000 Personen an. Die Inzidenz der kleinzelligen NEC zeigte sich hingegen im genannten Zeitraum konstant (0,15 pro 100.000 1990 - 2000 versus 0,18 pro 100.000 2000 - 2010) (Korse et al., 2013).

Aufgrund ihres aggressiven biologischen Verhaltens und schnellen Wachstums werden NEC häufig erst in lokal fortgeschritten oder metastasierten Stadien diagnostiziert (Strosberg et al., 2010, Kang et al., 2007). In einer Analyse der Daten des amerikanischen National Cancer Institute zeigte sich in einem großen Kollektiv, dass bei Patienten mit GEP-NEC zum Diagnosezeitpunkt bei 57 % bereits Fernmetastasen bestehen. Das mediane Überleben der Patienten mit metastasierten GEP-NECs betrug in dieser Analyse nur 5 Monate. Bei lokal begrenzten NECs betrug das mediane Überleben dagegen 38 Monate (Sorbye et al., 2014). Neben einem fortgeschrittenen Tumorstadium scheinen zudem der kleinzellige Subtyp und NECs mit einem Ki-67-Index von > 55 % mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein (Sorbye et al., 2014).

Bis heute existieren nur wenige retrospektive Untersuchungen sowie sehr kleine nicht kontrollierte klinische Studien, die das therapeutische Vorgehen bei Patienten mit GEP-NECs untersuchen. Als Standardtherapie bei lokal begrenzten GEP-NEC gilt aktuell die vollständige chirurgische Resektion des Tumors mit anschließender adjuvanter Chemotherapie (Sorbye et al., 2014, Rinke et al., 2018). Leider werden jedoch circa 57 % bis zu 89 % der GEP-NECs erst in lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadien diagnostiziert (Kang et al., 2007, Sorbye et al., 2014, Strosberg et al., 2010). Bei diesen Patienten hat sich eine palliative Chemotherapie mit platinbasierten Substanzen (Carboplatin oder Cisplatin) in Kombination mit Etoposid als Therapie der ersten Wahl etabliert (Breitling et al., 2019, Rinke et al., 2018). Da NECs im Gegensatz zu gut differenzierten NET nur extrem selten Somatostatin-Rezeptoren (Strosberg et al., 2010) exprimieren hat sich die Anwendung von Serotonin-Analoga oder die

Durchführung einer Peptidrezeptor-Radiotherapie bei GEP-NECs als wenig effektiv erwiesen (Neumann, o. J.-a).

Zusammengefasst handelt es sich bei GEP-NEC um seltene Neoplasien, die in ihrer Inzidenz steigen (Cigrovski Berkovic et al., 2014). Sie werden aufgrund ihres aggressiven biologischen Verhaltens häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und sind mit einer hohen Mortalität und einer schlechten Prognose verbunden (Cigrovski Berkovic et al., 2014). Leider existieren bislang nur wenige Studien, die die Therapie gastroenteropankreatischer Karzinome untersuchen und die in der Vergangenheit häufig veränderte Klassifikation macht den Vergleich von Studien schwierig. Ansprechraten von nur circa 30 % auf die aktuell verwendete Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid sowie mediane Überlebenszeiten von 38 und 5 Monaten für Patienten mit lokalisierter beziehungsweise bereits metastasierter Erkrankung verdeutlichen jedoch den dringenden Bedarf an neuen Behandlungsansätzen in der Therapie von Patienten mit GEP-NECs (Sorbye et al., 2014).

### **1.3 Genexpression und Signaltransduktion**

#### **1.3.1 Genexpression: Definition und Überblick**

Eine der grundlegenden molekularbiologischen Prozesse ist neben der DNA-Replikation die Genexpression, sprich die Umsetzung von genetischen Informationen in RNA und Proteine. Die Genexpression wird dabei in die drei Teilschritte Transkription, Prozessierung und Translation unterteilt. Die Transkription ist die Umschreibung von DNA in das Primärskript, die heterogene nukleäre RNA (hnRNA). Bei der Prozessierung wird diese „unreife“ hnRNA in die „reife“ *messenger* RNA (mRNA) modifiziert. Dies erfolgt in den drei Prozessierungsschritten *Capping*, *Splicing* und Polyadenylierung. Bei der Translation wird die Basensequenz der mRNA entsprechend dem genetischen Code in die Aminosäuresequenz übersetzt. Durch die Aneinanderreihung der Aminosäuren mittels der als Adapter fungierenden transfer-RNAs (tRNA) entsteht damit das Protein. Transkription und Prozessierung finden im Zellkern, Translation im Zytoplasma statt (Netzker, 2012c).

#### **1.3.2 Transkription: Voraussetzungen, Kontrolle und Ablauf**

Bei der Transkription als Teil der Proteinbiosynthese entsteht an einem DNA-Matrizenstrang, auch kodierender Strang genannt, ein dazu komplementärer RNA-Einzelstrang. Dieser Einzelstrang ist eine Abschrift der Strukturgene. Die bei der eukaryotischen Biosynthese entstehende Vorstufe heterogene nukleäre RNA (hnRNA) besteht aus sich abwechselnden Exons und Introns. Die Exons kodieren für die später entstehenden Proteine, die Introns werden im Rahmen der Prozessierung entfernt. Die RNA Polymerasen lesen den Matrizenstrang vom 3' zum 5' Ende ab und verwenden als Substrate die Nukleosidtriphosphate ATP (Adenosintriphosphat), GTP (Guanosintriphosphat), CTP (Cytidintriphosphat) und UTP (Uridintriphosphat). Es gibt vier verschiedene Arten von RNA Polymerasen. Die für die Genexpression wichtige heißt RNA Polymerase II. Zwei weitere im Zellkern befindliche Polymerasen und eine im Mitochondrium vorkommende Polymerase sind für die Abschriften anderer RNA Typen wichtig (Netzker, 2012c).

Neben den Strukturgenen befinden sich auf der DNA Kontrollelemente, die in Wechselwirkung mit sogenannten Transkriptionsfaktoren (TF) die Gentranskription steuern. Die so genannten Promotoren sind Abschnitte, die den Anfangspunkt der Translation markieren und sich unmittelbar stromaufwärts von diesem befinden. Sie teilen sich in proximale und basale Promotoren auf. Die distalen Kontrollelemente sind weiter von diesem Punkt entfernt, kommen aber z. B. durch Schleifenbildung der DNA mit dem Startpunkt in Kontakt (Netzker, 2012c).

Die basalen Promotoren befinden sich 37 Basenpaare (bp) vor bis 40 bp nach dem Startpunkt der Transkription. Sie sind gekennzeichnet durch spezielle Muster an Basensequenzen und werden zum Beispiel TATA Box genannt. An sie binden die allgemeinen Transkriptionsfaktoren, was Voraussetzung für die Positionierung und Bindung der RNA Polymerasen ist. Die für die RNA Polymerase II notwendigen Transkriptionsfaktoren werden TF II A-F genannt. Die proximalen Promotoren befinden sich stromaufwärts bis zu 200 bp entfernt und heißen z. B. GC-Box oder CAAT-Box. An sie binden konstitutiv exprimierte spezifische Transkriptionsfaktoren wie z. B. CTF oder CBF und aktivieren damit die Transkription. Die distalen Kontrollelemente sind meist weit bis zu 25 kbp entfernt und können sich stromaufwärts oder abwärts befinden. Sie werden je nach ihrer Funktion *enhancer*, *silencer*, *insulator* oder *locus control region* genannt. Die an sie bindenden Transkriptionsfaktoren sind nicht dauerhaft aktiv, sondern werden auf bestimmte Signale erst induziert oder aktiviert. Dies geschieht über verschiedenen Signalkaskaden zum Beispiel im Zuge einer Immunantwort. Außerdem sind sie nicht ubiquitär sondern eher gewebespezifisch vorliegend. Die Faktoren haben meist spezielle Strukturelemente wie Helices, *zipper* oder Zinkfinger, die die Bindung an die DNA möglich machen. Über Signalerkennungsdomänen erhalten sie außerdem Informationen im Zuge der Signaltransduktion und über Transaktivatordomänen können sie die Transkription starten (Netzker, 2012c).

Die Transkription läuft in den 3 Schritten Initiation, Elongation und Termination ab. Bei der Initiation bilden die RNA Polymerase mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren einen Präinitiationskomplex, der an den basalen Promoter bindet. Durch den TF II H wird die Doppelhelix entwunden und der Initiationskomplex geöffnet. Bei der Elongation wird durch den TF II H die RNA Polymerase phosphoryliert, wodurch der Komplex zerfällt. Es startet nun die Bildung des RNA-Einzelstrangs komplementär zu dem DNA-Matrizenstrang. Die Nukleotridtriphosphate reagieren dabei miteinander und bilden unter Freisetzung von Phosphat Phosphorsäureesterbindungen. Die Termination beschreibt das Ende der Transkription (Netzker, 2012c).

### 1.3.3 Signaltransduktion: Definition, Zytokine, Rezeptoren

Die Genexpression ist durch verschiedene Mechanismen genau reguliert, sodass nicht alle Gene gleichzeitig überschrieben werden und die Biosynthese ökonomisch verläuft. Die Zellen haben also die Eigenschaften, sich an die jeweilige Stoffwechselsituation anzupassen, sich durch Expression spezieller Proteine zu spezialisieren oder eine Immunreaktion als Antwort auf einen von außen kommenden Reiz zu senden. Die Signaltransduktion beschreibt dabei die Informationsübermittlung auf molekularer Ebene von extrazellulär nach intrazellulär. Von anderen Geweben ausgesendete Botenstoffe übermitteln Informationen über Rezeptoren in der Zellmembran oder intrazelluläre Rezeptoren an weitere Proteine im Zytoplasma. Über

diese gelangt die Information wiederum in den Zellkern als Ort der Genspeicherung und -expression. Durch die so gesteuerte Proteinbiosynthese werden Zellprozesse wie Apoptose oder Zellproliferation beeinflusst (Deutzmann, 2012a, Amboss GmbH, o. J.-c, Horn, 2012a).

Es gibt eine große Anzahl von löslichen Botenstoffen, die für die Zellkommunikation in vielen Systemen, wie zum Beispiel im Immunsystem und hämatopoetischen System zuständig sind, welche meist auch multifunktional wirken (Kishimoto et al., 1994). Die bei Immunregulation und Zelldifferenzierung in Hinblick auf Tumorgenese eine wichtige Rolle spielenden Zytokine sind Polypeptide, die als Gewebshormone in den jeweiligen Geweben direkt parakrin oder autokrin wirken. Sie werden in beiden Gruppen Zytokine des Immunsystems und Wachstumsfaktoren eingeteilt. Die Zytokine des Immunsystems lassen sich in folgende Familien aufteilen: Interferone (IFN- $\alpha$  bis IFN- $\gamma$ ), Interleukine (IL-1 bis IL-10), Chemokine und Tumornekrosefaktoren (TNF  $\alpha$ ). Wachstumsfaktoren sind vor allem in der Embryonalentwicklung wichtig und steuern Zellmechanismen wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung und den programmierten Zelltod (Apoptose). Sie sind aber auch im adulten Organismus bei der Steuerung von Apoptose und Zellproliferation in Geweben, die sich erneuern -wie zum Beispiel der Darmmukosa wichtig. Klassische Beispiele für Wachstumsfaktoren sind: der *Epidermal Growth Factor* (= epidermaler Wachstumsfaktor) (EGF), der *Insulin-like Growth Factor* (= Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren) (IGF), der *Vascular endothelial Growth Factor* (= vaskulärer Wachstumsfaktor) (VEGF) oder *Nerve Growth Factor* (= nervaler Wachstumsfaktor) (NGF) (Deutzmann, 2012b).

Die Zytokine entfalten ihre spezielle Wirkung über Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren (Schindler and Darnell, 1995). Es gibt viele verschiedene Arten von Rezeptoren, die sich entweder in der Zellmembran oder intrazellulär befinden. Bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden nach Bindung durch den Mediator die sich im Zytoplasma befindlichen G-Proteine aktiviert, wodurch die Untereinheiten dissoziieren und Enzyme stimulieren wie die Adenylatzyklase, welche den *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bildet oder wie die Phospholipase C, welche die *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) bildet. Ligandenaktivierte auch ionotrope Rezeptoren sind gleichzeitig Ionenkanäle. Sie öffnen oder schließen sich nach Signalbindung und ermöglichen oder verhindern transmembrane Ionenflüsse. Den enzymgekoppelten Rezeptoren ist gemein, dass sie durch die Signalbindung Enzyme aktivieren und Prozesse in der Zelle katalysieren können. Die Guanlytazyklasen katalysieren die Entstehung des *second messengers* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Die Rezeptoren mit Kinaseaktivität katalysieren Phosphorylierungen, so z. B. die Rezeptor Serin- und Threoninkinasen. Bei den Tyrosinkinasen gibt es Rezeptoren, die selbst die Enzyme darstellen oder aber solche mit assoziierten Tyrosinkinasen. Diese assoziierten Tyrosinkinasen werden als Januskinasen (JAK) zusammengefasst, wobei die Familienmitglieder Tyrosinkinase 2 (Tyk2), JAK1, JAK2 und JAK3 sind. Sie spielen besonders in der Signaltransduktion über die Zytokine eine tragende Rolle. Sie sind konstitutiv mit der zytosolischen Seite der Rezeptoren verbunden und können über ihre Tyrosinkinase Domänen den Rezeptor und weitere Strukturen phosphorylieren. Solche Strukturen sind die Mitglieder der *Signal Transducer and Activator of Transkription* (STAT) - Familie. Diese Proteine werden durch die Phosphorylierung induziert und angeregt, in den Zellkern zu wandern und dort in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren

an spezielle Kontrollelemente in der DNA zu binden und damit die Transkription zu starten. Somit wird die Expression von Proteinen herbeigeführt, die eine Immunantwort möglich machen oder zur Zellproliferation und Apoptose führen (Schindler and Darnell, 1995, Deutzmann, 2012a).

#### 1.4 Apoptose und Zellproliferation allgemein

Die Apoptose wird auch programmierter Zelltod genannt und ist definiert als ein „von der Zelle kontrollierter aktiver Prozess, der zum Absterben der Zelle führt“ (Netzker, 2012b). Er tritt unter physiologischen Bedingungen zum Beispiel bei der Embryonalgenese und bei Zellschädigungen zum Beispiel bei DNA-Schäden auf. Die Nekrose ist ebenfalls ein Mechanismus des Zelltods, tritt aber nur bei Zellstress als Reaktion auf irreversible schädigende Reize auf. Bei der Apoptose schrumpft die Zelle und zerfällt in Apoptosekörperchen, weshalb sich dieser Prozess auf die Zelle beschränkt. Ein wichtiger Unterschied zur Nekrose ist, dass bei der Nekrose die Zelle anschwillt und die Plasmamembran undicht wird und platzt, was eine Entzündungsreaktion der Umgebungszellen hervorruft (Netzker, 2012b, Amboss GmbH, o. J.-d). Apoptose wird entweder über einen extrinsischen oder intrinsischen Weg eingeleitet, die in der Aktivierung von Initiator- und Effektor-Caspasen münden und Zerfallsprozesse der Zelle in Gang setzen. Caspasen, abgekürzt für „Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen“, sind Enzyme, die die Spaltung von Proteinen ermöglichen. Die Initiatorcaspasen sind die Caspasen 2, 8, 9 und 10. Sie aktivieren die Effektorcaspasen, die Caspasen 3, 6 und 7, welche Zytoskelett und Zellkern zerfallen lassen bzw. fragmentieren (Netzker, 2012b). Bei dem extrinsischen Weg werden die an der Zellmembran liegenden Fas-Rezeptoren, auch „Todesrezeptoren“ genannt, von Stimuli wie Fas-Liganden („*First apoptotic signal*“), TNF  $\alpha$  („Tumor Nekrose Faktor“) oder TRAIL („*TNF-related apoptosis-inducing ligand*“) aktiviert. Sie aktivieren wiederum die Initiatorcaspasen. Der intrinsische Weg wird eingeleitet, wenn sich das Gleichgewicht der proapoptotischen und der antiapoptotischen Vertreter der Bcl (*B-cell-lymphoma* = B-Zell-Lymphom) -Familie auf die Seite der proapoptotischen Proteine verschiebt: Die Proteine Bax (*Bcl-2-associated X*) und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) in der mitochondrialen Membran werden aktiviert und bilden Kanäle, durch die Cytochrom C ins Zytosol freigelassen wird und Caspasen aktiviert (Amboss GmbH, o. J.-d, Netzker, 2012b, Horn, 2012b). Die *inhibitors of apoptosis proteins* (IAPs) sind eine Familie von Proteinen, die die Apoptose verhindern, indem sie Caspasen hemmen und deren Abbau vermitteln (Netzker, 2012b).

Für die Proliferation sind Zellwachstum und Zellteilung von Bedeutung. Der Zellzyklus ist definiert als „geregelter Ablauf von Ereignissen in eukaryontischen Zellen zwischen den einzelnen Zellteilungen mit dem Ziel, die genetische Information der Zelle identisch zu verdoppeln und auf zwei Tochterzellen zu verteilen“ (Netzker, 2012a). Er besteht aus der Interphase und der Mitose. Die Interphase ist aufgeteilt in G1-, S- und G2-Phase. In der G1-Phase erfolgt die RNA- und Proteinsynthese sowie das Zellwachstum, in der S-Phase wird die DNA repliziert und die Chromosomen verdoppelt, in der G2-Phase werden Fehlpaarungen repariert. Die Mitose ist die eigentliche Zellteilung und wird aufgeteilt in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase. Die G0-Phase ist der Ruhezustand von differenzierten Zellen (Netzker, 2012a).

## 1.5 Signal Transducer and Activator of Transkription 3 (STAT3)

### 1.5.1 Definition, Erstentdeckung

Der *Signal Transducer and Activator of Transkription 3* (STAT3) ist ein Protein, welches als Transkriptionsfaktor agiert und die duale Funktion hat, erstens im Sinne der Signaltransduktion Signale von der Zellmembran in den Zellkern zu übermitteln, wo es an die DNA bindet („Signalumwandler“) und zweitens die Gentranskription zu aktivieren („Transkriptionsaktivator“). Dadurch entstehen Proteine, die in Mechanismen wie Zelldifferenzierung und Zellwachstum eingreifen (Wake and Watson, 2015, Siveen et al., 2014).

Entdeckt wurde STAT3 durch James Darnell im Rahmen von Untersuchungen zu IFN vermittelten Signalwegen, in denen die bis dato beschriebenen STAT Familienmitglieder eine Rolle spielen. Er beschrieb STAT3 als ein Protein, welches nicht wie STAT1 $\alpha$  (Umbenannt von STAT91) auf IFN reagiert, wohl aber auf IL-6 und EGF (Zhong et al., 1994).

Gleichzeitig und voneinander unabhängig entdeckte eine zweite Gruppe STAT3 (Aggarwal et al., 2006). Einer seiner Funktionen entsprechend wurde STAT3 initial von Wegenka et al. als *acute-phase response factor* (APRF) bezeichnet und als Protein identifiziert, das in der Leber durch IL-6 aktiviert wird und mit dem *enhancer element* der Promoterregion von Akute Phase Genen interagiert (Wegenka et al., 1993, Subramaniam et al., 2013, Lutticken et al., 1994). In dieser Funktion mit direkter Wirkung auf die Inflammation durch die von ihm induzierte Gentranskription kann die Wirkung von STAT3 als klassischer Transkriptionsfaktor am deutlichsten erkannt werden (Levy and Lee, 2002), während die Wirkung in anderen Signalkaskaden komplexer ist.

### 1.5.2 Einordnung in die STAT Familie

Die STAT Familie umfasst 7 Proteine namens STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6, die eine ähnliche Struktur aufweisen. Die STAT Proteine sind 750 bis 850 Aminosäuren lang und auf drei Chromosomen codiert. Im menschlichen Genom befinden sich STAT1 und STAT4 auf dem Chromosom 2, STAT3 sowie STAT5a und b auf Chromosom 17 und STAT2 und STAT6 auf Chromosom 12 (Subramaniam et al., 2013). Sie haben alle die Funktion, als Antwort auf Zytokine die Genexpression zu beeinflussen. Alle STAT Proteine besitzen einen Tyrosinrest, welcher während der zytoplasmatischen Aktivierung phosphoryliert wird (Schindler and Darnell, 1995, Takeda and Akira, 2000). Sie wirken auf Proliferation (Zellwachstum), Differenzierung und Apoptose (Mui, 1999). STAT Proteine sind an der Regulation einer großen Anzahl verschiedener Gene beteiligt. Hierbei werden sie durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren, wie Zytokine, aktivierte Rezeptoren, den Zelltyp, in dem sie lokalisiert sind und weitere Zellkomponenten beeinflusst (Ihle, 1995). Als ein wichtiger Signalweg wurde erstmals 1994 von Darnell et al. der JAK/STAT-Signalweg als Antwort auf IFN beschrieben (Darnell et al., 1994).

Die Mitglieder der STAT Familie werden durch spezifische Zytokine aktiviert (Takeda et al., 1997). Funktionell kann man dabei die STAT Proteine in zwei Gruppen einteilen: STAT2, STAT4 und STAT6 werden von einer eher kleinen Anzahl von Zytokinen aktiviert und spielen



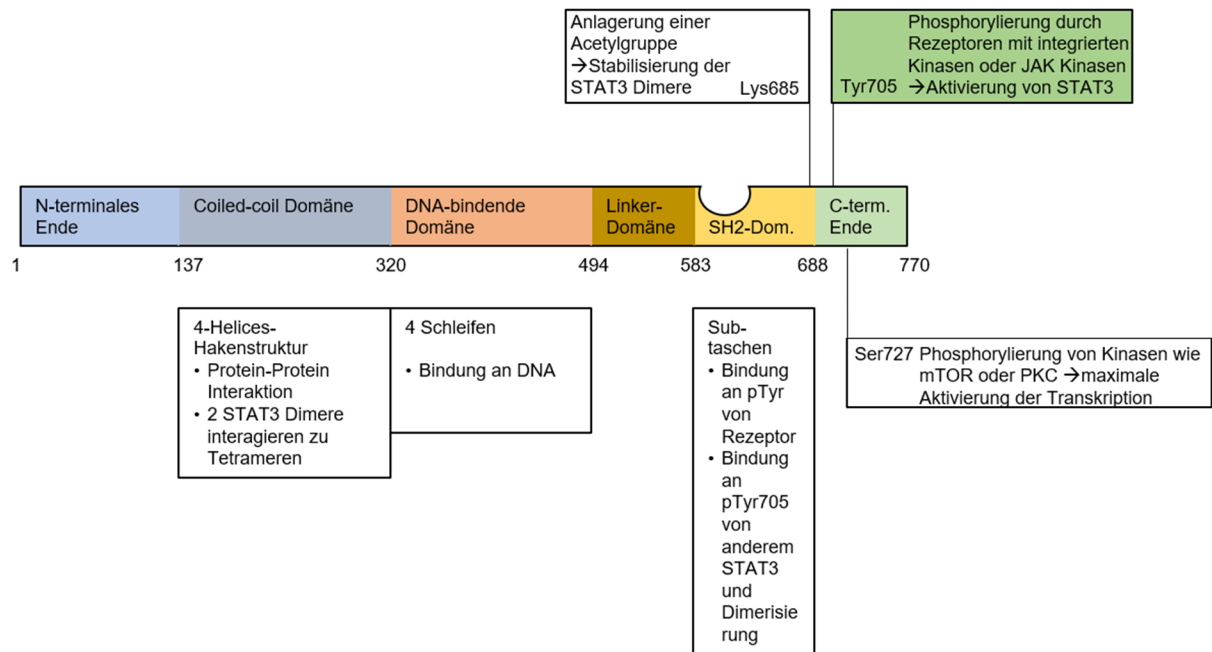
im Wesentlichen eine Rolle im Rahmen von Regulationsvorgängen des Immunsystems, wie z. B. die T-Zell-Differenzierung oder IFN- $\gamma$  vermittelte Vorgänge (Subramaniam et al., 2013). STAT6 zum Beispiel ist nach Aktivierung durch IL-4 am Klassenwechsel von Immunglobulinen und der Hochregulation von *major histocompatibility complex class II* (MHCII) beteiligt (Ihle, 1995). STAT4 wird durch IL-12 aktiviert und übernimmt eine Funktion im Rahmen der T-Helfer-1-Zell-Differenzierung (Takeda et al., 1997). STAT1, STAT3, STAT5 werden in unterschiedlichen Geweben von verschiedenen Liganden aktiviert und vermitteln ebenfalls über IFN- $\gamma$ -Signalwege wichtige Funktionen des Immunsystems wie die Entwicklung von Zellen der myeloischen Zellreihe. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle in der Embryogenese und Zelldifferenzierung zum Beispiel von Brustdrüsenzellen (Subramaniam et al., 2013, Mui, 1999). Die Mitglieder dieser Gruppe sind zudem an der Regulation der Zellproliferation sowie des programmierten Zelltods, der Apoptose beteiligt. Aufgrund ihrer Aufgabe im Rahmen der Regulation des Zellwachstums sowie der Apoptose und der Angiogenese werden vor allem STAT1, 3 und 5 als Proteine angesehen, die zur Tumorbildung und Tumorförderung beitragen können. Vor allem ist durch ihre wichtige Rolle im Immunsystem bei Fehlregulation die *immune surveillance* beeinträchtigt, was ebenfalls für die Tumorentstehung entscheidend sein kann (Bromberg, 2002).

### 1.5.3 Isoformen

Das STAT3 Gen ist auf dem Chromosom 17q21 gelegen (Choi et al., 1996) und codiert für ein Protein, das 770 Aminosäuren lang ist und dessen Molekulargewicht mit 92 kDa angegeben wird (Aggarwal et al., 2009). Es gibt vier verschiedene Spleißvarianten, benannt STAT3 $\alpha$ - $\delta$ . STAT3 $\alpha$  stellt den Wildtyp dar. STAT3 $\beta$  ist 80 kDa schwer und im Vergleich zum Wildtyp fehlt ihm eine 50 Nukleotide lange Sequenz am C-terminalen Ende (Caldenhoven et al., 1996). STAT3 $\beta$  scheint während der Akute Phase Reaktion als negativer Regulator von durch STAT3 $\alpha$  induzierbaren Genen zu fungieren (Yoo et al., 2002, Levy and Lee, 2002). Die Isoformen STAT3 $\gamma$  und STAT3 $\delta$  sind weniger gut untersucht und scheinen eine Bedeutung im Rahmen der Differenzierung von Granulozyten zu haben (Wake and Watson, 2015).

### 1.5.4 Aufbau und Struktur

STAT3 besteht aus fünf funktionellen Domänen. Der N-terminalen Domäne, der DNA-bildenden Domäne, der *Linker*-Domäne, der *Src homology 2* (SH2)-Domäne und der C-terminalen Domäne. Jede Domäne hat besondere dreidimensionale Strukturen und Aminosäureabfolgen, die die für die Domäne spezielle Funktion ermöglichen (Wake and Watson, 2015). Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der einzelnen Domänen.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur von STAT3**

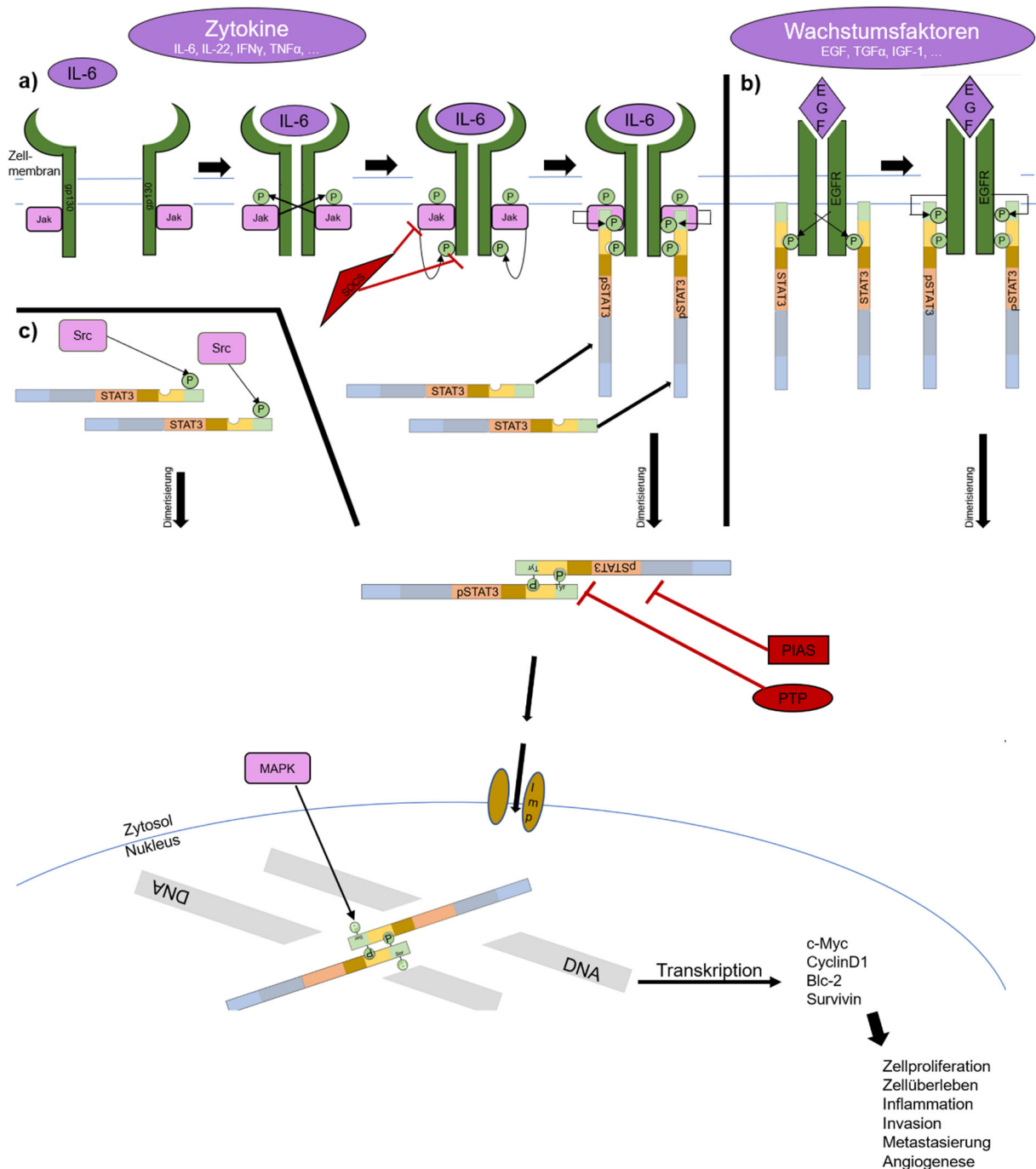
Nummeriert sind die Aminosäure-Stellen, die die einzelnen Domänen verbinden und die funktionell wichtigen Aminosäuren Lysin an Stelle 685, Tyrosin an Stelle 705 und Serin an Stelle 727. pTyr = phosphoryliertes Tyrosin, SH2-Domäne = *Src homology 2*. Modifiziert nach (Wake and Watson, 2015, Subramaniam et al., 2013).

Am N-terminalen Ende befindet sich die *Coiled-coil* (= Doppelwendel)-Domäne, die aus vier Helices besteht, die eine Hakenstruktur bilden. Sie ist für die Interaktion von Proteinen zuständig. Zwei STAT3 Dimere können sich zu einem Tetramer verbinden, um die Transkription zu starten. Die daneben befindliche DNA-bindende Domäne wird aus vier Schleifen gebildet. An diesem Abschnitt bindet STAT3 an den DNA-Strang. Überbrückt von einer *Linker*-Domäne folgt die SH2-Domäne. Hier befinden sich drei Subtaschen, die an phosphoryliertem Tyrosin binden können. Zum einen dient die SH2-Domäne der Bindung von STAT3 an den Rezeptor. Zum anderen dient sie der Bindung eines STAT3 Monomeres an das phosphorylierte Tyrosin an Stelle 705 eines weiteren STAT3 Monomers, wodurch Dimere entstehen. Von Stelle 688 bis 770 befindet sich die C-terminale Domäne. In dieser Domäne befinden sich insbesondere zwei wichtige Aminosäuren im STAT3 Protein: Das Tyrosin in der C-terminalen Domäne an Stelle 705 kann von Rezeptoren mit integrierten Tyrosinkinasen oder Rezeptor-assoziierten Januskinasen phosphoryliert werden. Hierdurch wird STAT3 aktiviert. Das Serin an Stelle 727 kann von verschiedenen Kinasen wie mTOR oder der Protein Kinase C delta (PKC $\delta$ ) phosphoryliert werden, was zur Aktivierung der Transkription im Zellkern führt. Häufig wird dies durch das IL-22 induziert. An das Lysin an Stelle 685 in der SH2 Domäne kann durch die Histonacetyltransferase p300 eine Acetylgruppe angelagert werden. Dies führt zur Stabilisierung der STAT3 Dimere (Wake and Watson, 2015, Siveen et al., 2014).

### 1.5.5 Signalweg

STAT3 wird durch viele verschiedenen Zytokine, Wachstumsfaktoren und Umweltreize aktiviert. Es gibt dabei verschiedene Wege der Aktivierung, die vereinfacht dargestellt alle in

der Dimerisierung von STAT3 münden, worauf der Transport in den Zellkern folgt. Im Folgenden werden drei Aktivierungswege in Abb. 3 schematisch dargestellt, in der Abbildungserklärung kurz zusammengefasst und im Folgenden detailliert ausgeführt.



**Abb. 3: Signalwege von STAT3**

In der Abbildung sind 3 Signalwege schematisiert: a) Der bekannteste Signalweg ist der JAK/STAT-Signalweg mit folgenden Komponenten: IL-6 bindet an gp(Glykoprotein)130Rezeptoren  $\rightarrow$  Autophosphorylierung der Rezeptor-assoziierte Januskinasen (JAK)  $\rightarrow$  Phosphorylierung der STAT3 Monomere an Stelle 705  $\rightarrow$  Bildung von STAT3 Dimeren  $\rightarrow$  Transport in den Zellkern über Importin  $\alpha$ 5 und  $\alpha$ 7  $\rightarrow$  Bindung an DNA-Strang  $\rightarrow$  Transkription von nachgeschalteten Genen wie c-Myc (= *cellular Myelocytomatosis oncogene*), Cyclin D1, Bcl2 (= *B-cell-lymphoma*) und Survivin. Kinasen wie die MAPK (= *mitogen-activated protein*)-Kinase phosphorylieren STAT3 an der Aminosäure Serin an Stelle 727,

was zur Verstärkung der Transkriptionsaktivität führt. b) Ein zweiter Signalweg ist rechts dargestellt: EGF (*Epidermal growth factor*) bindet an den EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), Autophosphorylierung des EGFR, Phosphorylierung von STAT3. c) Ein dritter alternativer Signalweg ist die Phosphorylierung von STAT3 durch die Tyrosinkinase Src (= Akronym aus *cellular* und *sarcoma*). Hier dargestellt als permanent aktive *non-receptor tyrosine kinase*. SOCS (= *suppressor of cytokine signalling*), PIAS (= *protein inhibitor of activated STAT*) und PTP (= Protein Tyrosin Phosphatasen) sind Proteine, die die Signalwege von STAT3 regulieren. Modifiziert nach (Siveen et al., 2014, Wake and Watson, 2015, Amboss GmbH, o. J.-c)

Der wichtigste Signalweg scheint der IL-6/gp130/JAK/STAT3-Signalweg zu sein (Heinrich et al., 1998). Das Zytokin IL-6 leitet die Signalkaskade ein. Durch Bindung von IL-6 an zwei gp130-Rezeptor-Monomere werden diese aktiviert, was zur Dimerisierung des gp(Glykoprotein)130-Rezeptors führt. Die Dimerisierung ermöglicht die gegenseitige Phosphorylierung (Autophosphorylierung) der Januskinasen, die sich auf der zytosolischen Seite der Rezeptormonomere befinden. Hierdurch aktivieren sie sich und katalysieren wiederum die Phosphorylierung von Tyrosinresten des jeweiligen gp130 Monomers. Hierdurch entstehen Bindungsstellen für die SH2-Domänen der im Zytosol vorliegenden STAT3 Proteine. Nach Anbindung der STAT3 Monomere an die Rezeptoren phosphorylieren die Januskinasen die STAT3 Monomere an ihrem Tyrosinrest an Stelle 705, wodurch die STAT3 Monomere aktiviert werden und angeregt werden, vom Rezeptor zu dissoziieren und Dimere zu bilden. Hierbei bindet die SH2-Domäne des einen STAT3 an den phosphorylierten Tyrosinrest des anderen STAT3 (Siveen et al., 2014, Wake and Watson, 2015, Amboss GmbH, o. J.-c).

STAT3 bildet entweder Homodimere mit einem weiteren STAT3 Protein. Es können aber auch Heterodimere gebildet werden, was zu Folge hat, dass eine größere Anzahl an Genen reguliert wird. Bevorzugt wird hier das STAT1 Protein aufgrund seiner Ähnlichkeit zu STAT3 verwendet (Wake and Watson, 2015).

Der Transport des aktivierten STAT3 erfolgt über die Proteine Importin  $\alpha 5$  und  $\alpha 7$ , die an Arginin an den Stellen 214 und 215 in der *Coiled-coil*-Domäne und an Arginin an den Stellen 414 und 417 in der DNA-Bindungsdomäne von STAT3 binden (Ma and Cao, 2006). Auch nicht phosphoryliertes und damit nicht aktiviertes STAT3 kann in den Zellkern transfundieren, wobei der Transport der aktivierten Variante schneller ist (Siveen et al., 2014).

Im Zellkern binden die Homo- oder Heterodimere über ihre DNA-Bindungsstelle an distale Kontrollelemente. Hier fungiert STAT3 als Transkriptionsfaktor und startet die Transkription von spezifischen Genen wie zum Beispiel *cellular Myelocytomatosis oncogene* (c-Myc), Cyclin D1, Bcl2 und Survivin. Die entstehenden Proteine greifen wiederum in Mechanismen wie Zellproliferation und Zellüberleben ein. (Wake and Watson, 2015, Subramaniam et al., 2013, Siveen et al., 2014, Amboss GmbH, o. J.-c). Kinasen wie die MAP (= *mitogen-activated protein*)-Kinase phosphorylieren STAT3 an der Aminosäure Serin an Stelle 727, was zur Verstärkung der Transkriptionsaktivität führt.

Der JAK/STAT-Signalweg wird durch verschiedene Proteinfamilien reguliert. Die *suppressor of cytokine signalling* (SOCS)-Proteine verhindern die STAT3-Aktivierung durch Bindung an aktivierte Januskinasen oder Rezeptoren. Die PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) -

Proteine binden blockierende Proteine an die aktivierten STAT3 Dimere. Die PTP (Protein Tyrosin Phosphatasen) können STAT3 oder aktivierte Kinasen dephosphorylieren (Wake and Watson, 2015).

Ein zweiter wichtiger Signalweg ist der über den *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Dies ist ein Rezeptor mit eigener Kinaseaktivität: Er katalysiert die Phosphorylierung eigener Tyrosinreste, die dadurch zu Bindungsstellen für die STAT3 Monomere werden. Vollständig sieht der Signalweg dann wie folgt aus: EGF bindet an den EGF-Rezeptor, was zur Autophosphorylierung durch die Rezeptortyrosinkinasen führt. Hierdurch entstehen Bindungsstellen für die SH2-Domäne von STAT3. Nach Bindung von STAT3 an den Rezeptor phosphorylieren die Rezeptorkinasen den Tyrosinrest an Stelle 705 von STAT3 und aktivieren die STAT3 Monomere.

Ein dritter alternativer Signalweg ist die Phosphorylierung von STAT3 durch die Tyrosinkinase Src (= Akronym aus *cellular* und *sarcoma*). Die Tyrosinkinase Src kann wie die Januskinasen als Rezeptor-assoziierte Kinase agieren oder aber als permanent aktive *non-receptor tyrosine kinase* STAT3 aktivieren (Wake and Watson, 2015, Siveen et al., 2014, Doccheck, o. J.-b). In der Abbildung ist sie als permanent aktive *non-receptor tyrosine kinase* dargestellt.

### **1.5.6 Physiologische Funktion**

#### **1.5.6.1 Die besondere Stellung von STAT3 in der STAT Familie**

Über die Jahre wurde nachgewiesen, dass den meisten STAT Proteinen ein spezifischer Signalweg und spezifische Aktivoren zuzuordnen sind. Im Gegensatz hierzu ist das STAT3 Protein an der Regulation einer Vielzahl verschiedener Signalwege beteiligt (Levy and Lee, 2002). So kann STAT3 durch zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert werden und ist an der Steuerung mehrerer wichtiger Zellfunktionen gleichzeitig beteiligt. Die große funktionelle Bedeutung von STAT3 wird unter anderem auch dadurch verdeutlicht, dass anders als bei den anderen STAT Proteinen die Ablation von STAT3 zum embryonalem Tod führt (Levy and Lee, 2002). Abhängig vom Zielgewebe, in dem sich STAT3 befindet, aktiviert es unterschiedliche Gen-Sets, die wiederum zelluläre Mechanismen wie Differenzierung, Wachstum und Apoptose regulieren. Dabei fungiert das Protein teils als Aktivator teils als Repressor. So induziert STAT3 in B-Zellen zum Beispiel anti-apoptotische Gene, die durch Inhibierung des programmierten Zelltodes die Zellproliferation antreiben. In Monozyten dagegen hemmt STAT3 die Expression von c-Myc und c-Myb, was wiederum die Differenzierung von Monozyten stimuliert (Levy and Lee, 2002).

#### **1.5.6.2 Physiologische Aufgaben von STAT3**

STAT3 erfüllt sowohl im Rahmen der Embryogenese als auch in adulten Zellen zahlreiche Aufgaben.

So scheint das Protein bei der Embryogenese eine wichtige Rolle im Rahmen der Entwicklung des Endoderms sowie für das Verweilen embryonaler Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand zu spielen (Raz et al., 1999, Matsuda et al., 1999, Levy and Lee, 2002, Takeda et al., 1997).

In adultem Brustdrüsengewebe ist STAT3 wesentlich an der Involution nach der Laktation beteiligt. So entdeckte Chapman, dass STAT3 in Brustdrüsenzellen nach der Laktation das Protein *insulin-like-growth-factor-binding-protein-5* (IGFBP-5) induziert, welches wiederum das anti-apoptotische Protein IGF-1 inhibiert. Es zeigte sich, dass in STAT3 inaktivierten Brustdrüsenzellen die Involution deutlich später einsetzte. Dies wurde auf eine Abnahme des programmierten Zelltodes der Brustdrüsenzellen zurückgeführt (Chapman et al., 1999). Der Rückgang des Brustdrüsengewebes nach Laktation ist ein typisches Beispiel für den in adulten Organismen physiologisch vorkommenden regulierten Zelltod, welcher durch STAT3 beeinflusst wird.

Auch in der Haut ist STAT3 an der Regulation wichtiger biologischer Funktionen wie der Zelldifferenzierung und Zellmigration beteiligt. So spielt STAT3 eine wichtige Rolle in der Wundheilung, indem es die Migration, Zelldifferenzierung und Zellregeneration von epidermalen Zellen beeinflusst (Subramaniam et al., 2013). Im Mausmodell hatte die Inaktivierung von STAT3 in epidermalen und follikulären Keratinozyten zur Folge, dass die Haut und Haarfollikel sich zwar normal entwickelten, jedoch der zweite Haarzyklus beeinträchtigt war und mit fortschreitendem Alter Ulcera entstanden. Durch Stimulation der STAT3 inaktivierten Zellen mit Wachstumshormonen war die Migration der Keratinozyten, nicht jedoch die Proliferation beeinträchtigt (Sano et al., 1999). Hauser zeigte, dass STAT3 eine Rolle in der Zelldifferenzierung in ruhenden, nicht am Zellzyklus teilnehmenden Zellen spielt. In Keratinozyten waren während der Zelldifferenzierung die STAT3 bindenden DNA Abschnitte aktiv, wurden jedoch bei mitogenen Stimuli herunterreguliert (Hauser et al., 1998). Die Stimulation von STAT3 in Keratinozyten bewirkte Psoriasis ähnliche Hautveränderungen. Betrachtet man diese im Sinne eines übermäßigen Durchlaufens von normaler Reepithelisierung, wird die Funktion von STAT3 im Rahmen der Wundheilung deutlich (Sano et al., 2005).

Insbesondere bei der Regulation immunologischer Vorgänge scheint STAT3 eine wichtige Rolle zu besitzen. So induziert es bei entzündlichen Prozessen die Synthese von Akute Phase Proteinen in der Leber (Alonzi et al., 2001). Darüber hinaus kann STAT3 aber auch Immunreaktionen eindämmen und damit überschießende Immunreaktionen verhindern: Das Zytokin IL-10 verursacht in Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten, also Zellen der myeloischen Zellreihe, die Aktivierung von STAT3, welches hier die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF  $\alpha$  oder IL-6 supprimiert. Der Tumornekrosefaktor TNF  $\alpha$  wird also weniger exprimiert, sodass keine Apoptose stattfindet. Grundlage zu dieser Annahme von Takeda war, dass sich die Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in STAT3-defizienten Mäusen abnormal aktiviert zeigten und erhöhte Th1-Zell Aktivität zu erkennen war (Takeda et al., 1999).

In dendritischen Zellen verhindert STAT3 die Reifung zu antigenpräsentierenden Zellen. Dies geschieht über den IL-6/JAK/STAT3-Signalweg. STAT3 verhindert bei ausbleibendem Infekt und somit nicht notwendiger Antigenpräsentation die Entwicklung von unreifen zu reifen Zellen. Auf diese Weise bleibt die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen bestehen und autoimmun gerichtete Prozesse werden verhindert (Park et al., 2004).

## 1.6 Die Rolle von STAT3 in der Tumorentstehung

### 1.6.1 STAT3 als Onkogen

Bei Stimulation vermittelt STAT3 entsprechend seiner physiologischen Funktion die akute Immunantwort im Sinne einer Inflammation über Bildung von Akute Phase Proteinen. Es ist jedoch gleichzeitig für die Eindämmung von spezifischen Immunreaktionen zuständig, um überschießende oder autoimmun gerichtete Antworten zu verhindern.

In normalen Zellen ist STAT3 bei der physiologischen Entzündungsreaktion kurz und akut in hohem Ausmaß aktiviert. Im Gegensatz dazu ist STAT3 in Tumorzellen jedoch abnormal dauerhaft und in niedrigerem Ausmaß aktiviert (Wake and Watson, 2015). Dies zeigen verschiedene Untersuchungen solider und hämatologischer Malignome wie z. B. dem Mamma-, Colon-, Magen-, Bronchial- oder Prostatakarzinom und Tumoren im Kopf-, Hals- und Hautbereich sowie der Akuten und Chronischen Myeloischen Leukämie (Siveen et al., 2014).

Bei vielen Tumoren ist die Ursache ihrer Entstehung auf Genmutationen zurückzuführen. Eine Genmutation im STAT3 Gen ist jedoch meist nicht die Ursache für seine onkogenen Eigenschaften. Stattdessen ist die onkogene Wirkung von STAT3 auf eine dauerhafte Aktivierung in seiner physiologischen Rolle als Vermittler der Reaktion auf inflammatorische Reize zurückzuführen. Kanzerogene Faktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum, Umweltgifte oder Radioaktivität wirken als Reize auf das menschliche Gewebe (Siveen et al., 2014). Die chronische Reizung löst eine überstimulierte Inflammation aus. STAT3 wird dadurch dauerhaft aktiviert statt der physiologisch akuten Aktivierung. Es entsteht keine akute Entzündungsreaktion mit hoher STAT3 Aktivierung, sondern eine dauerhafte Entzündungsreaktion mit auf niedrigerem Niveau aktiviertem STAT3 (Wake and Watson, 2015). Vermittelt wird die dauerhafte Aktivierung von STAT3 durch ein Überangebot von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, durch erhöhte Expression von EGFR, durch Mutationen, die JAKs aktivieren oder durch Beeinträchtigungen von Proteinen wie den SOCS, die Teil der negativen Kontrollmechanismen der STAT3 Aktivierung sind (Siveen et al., 2014).

STAT3 greift als Transkriptionsfaktor in den Zellmechanismus ein und reguliert die Expression von verschiedenen Genen. Dadurch werden über vermehrtes Bilden von anti-apoptotischen, proliferativen und angiogenetischen Proteinen der Zelltod verhindert, die Zellteilung vermehrt und Blutgefäße gebildet, was zur Tumorentstehung führt (Subramaniam et al., 2013).

STAT3 ist also kein Onkogen, das durch Mutation entsteht, sondern erlangt durch dauerhafte unphysiologische Aktivierung die Rolle als Onkogen (Wake and Watson, 2015).

Zudem führt die vermehrte Aktivierung von STAT3 zur Etablierung eines adäquaten Milieus um die Tumorzellen, welches vorteilhaft für die Tumorausbreitung und Metastasierung ist. Durch STAT3 werden dauerhaft inflammatorische Zytokine (IL-6) und angiogenetische Faktoren (VEGF) ausgeschüttet. Diese wirken auf die Tumorumgebung, indem sie in Zellen des Immunsystems die JAK/STAT-Kaskade aktivieren und das Entzündungsgeschehen aufrecht halten (Wake and Watson, 2015).

Das Immunsystem kann als „extrinsischer Suppressor von Tumoren“ (Kortylewski et al., 2005) fungieren. Die Eigenschaft, durch Ausbildung Tumor-spezifischer Antigene die Tumorzellen zu eliminieren wird *tumor immune surveillance* genannt (Swann and Smyth, 2007). Kortylewski

et al. fanden heraus, dass dauerhaft exprimiertes STAT3 in Tumoren die *immune surveillance* hemmt und dendritische Zellen, T-Zellen, natürliche Killerzellen und Neutrophile in ihrer Funktion supprimiert (Kortylewski et al., 2005).

In dendritischen Zellen verhindert das dauerhaft aktivierte STAT3 eine gezielte Immunantwort, so dass die unreifen dendritischen Zellen nicht zu Antigen präsentierenden Zellen ausreifen (Nefedova et al., 2004). In Makrophagen und Neutrophilen hält das dauerhaft aktivierte STAT3 die Suppression von Faktoren aufrecht, die die Fähigkeit haben, über Aktivierung von T-Helferzellen eine spezifische Immunantwort zu generieren. Des Weiteren werden durch von STAT3 induzierten Zytokinen vermehrt T-Regulatorzellen gebildet, welche die Aktivierung des spezifischen Immunsystems unterdrücken, indem sie CD 4+ (*Cluster of Differentiation*) und CD 8+ Zellen inhibieren. Zum anderen wirken sie antiinflammatorisch auf Th1-Zellen, indem sie das antiinflammatorische Zytokin *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) induzieren (Corthay, 2009). Die pathologische Überaktivierung von T-Regulatorzellen durch STAT3 im Tumorgewebe führt somit zu einer Inhibition des spezifischen Immunsystems und damit zu einer Reduktion der körpereigenen immunologischen Reaktion gegen die Tumorzellen, wodurch die Entstehung und Progression von Tumoren begünstigt wird (Wake and Watson, 2015).

Zusammengefasst verhindert dauerhaft aktiviertes STAT3 in Zellen Apoptose, ermöglicht ungehinderte Zellproliferation, Angiogenese, übermäßige Inflammation, Zellmigration und Zellinvasion sowie die Umgehung der *tumor immune surveillance*. Dadurch werden Tumorentstehung, Metastasierung, Tumorstadium und ungehemmte Tumorzellausbreitung begünstigt.

### 1.6.2 Durch STAT3 regulierte Gene

STAT3 reguliert in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor die Expression vielzähliger nachgeschalteter Gene, die wiederum in verschiedene Zellmechanismen eingreifen. Meist wirkt STAT3 als *enhancer*: eine übermäßige Aktivierung von STAT3 hat eine übermäßige Expression der Zielgene zur Folge. Bei Inhibition von STAT3 kann folglich eine Herunterregulierung der Zielgene beobachtet werden. Durch Hochregulierung von c-Myc, Cyclin D1 und Survivin aktiviert STAT3 die Zellproliferation, durch Hochregulierung von Survivin und Bcl2 inhibiert STAT3 Apoptose.

Das Zielgen Cyclin D1 spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus und damit für die Zellproliferation. Cycline sind Proteine, die Cyclin-abhängige Proteinkinasen (cdk) aktivieren, indem sie mit ihnen Komplexe bilden. Die Proteinkinasen phosphorylieren wiederum Proteine, die den Übergang zwischen den Zellzyklusphasen vermitteln. Cyclin D1 aktiviert die Kinasen cdk4 und cdk6 und vermittelt den Übergang von der G1- zur S-Phase (Amboss GmbH, o. J.-e, Horn, 2012b, Welsch, 2006). Auch in malignen Tumoren wie dem Magenkarzinom, dem colorektalen Karzinom und Plattenepithelkarzinom an Kopf und Hals scheint das aktivierte STAT3 über eine Stimulation der Cyclin D1 Expression die Proliferation zu regulieren. Entsprechend führte eine Inhibition von STAT3 in Versuchen mit Blasenkarzinomzellen zu einer verminderten Expression von Cyclin D1 und Abnahme der Zellproliferation (Siveen et al., 2014).



C-Myc ist ein Gen, welches für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor codiert, der die Zellteilung einleitet, indem er die Expression der Cycline D1, D2, E, von CDK4 und der cdc25-Phosphatase steuert (Netzker, 2012e). Es ist an der Steuerung des Übergangs in den Zustand der terminalen Differenzierung beteiligt, welchen Tumorzellen umgehen können (Yu and Jove, 2004). C-Myc ist Teil der durch gp130 vermittelten JAK/STAT Signalkaskade. Bei Versuchen in Neuroblastomen und Ovarialkarzinomen, in denen die Hemmung von STAT3 ein eingeschränktes Tumorwachstum zur Folge hatte, war unter anderem c-Myc herunterreguliert (Siveen et al., 2014).

Cateninb1 (auch BetaCatenin1 oder  $\beta$ 1-Catenin) ist eine Komponente der Wnt-Signalkaskade. Durch Bindung von Wnt an seinen *Frizzled*-Rezeptor wird der Abbau von Cateninb1 verhindert, wodurch es sich im Zytoplasma anreichert und vermehrt in den Zellkern gelangt. Es bindet im Zellkern an Transkriptionsfaktoren, woraufhin es die Genexpression zum Beispiel von Cyclin D1 steuert (Valenta et al., 2012, Shang et al., 2017). Chen et al. fanden heraus, dass Niclosamid dazu führt, dass *Frizzled1* in die Zelle aufgenommen wird und somit die  $\beta$ -Catenin-Signalübertragung blockiert (Chen et al., 2009).

STAT3 kann den programmierten Zelltod über die Expression anti-apoptotischer Gene umgehen. Dass die alternden oder mutierten Zellen nicht wie in physiologischem Normalzustand der Apoptose zugeführt werden und somit ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Überleben und Zelltod vorliegt, begünstigt die Tumorentstehung und Progression (Hanahan and Weinberg, 2000). Wichtige Proteine in diesem Zusammenhang sind das anti-apoptotische Protein Survivin und die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-Familie, zu der das Bcl2 Gen gehört. Sie werden von STAT3 reguliert (Siveen et al., 2014). Survivin spielt eine wichtige Rolle für das Überleben von Tumorzellen (Altieri, 2008). Es wird auch BIRC5 (*Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing*) genannt und gehört wie das XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) bzw. BIRC4 zu der IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Familie. Indem Survivin einen Komplex mit XIAP bildet, verhindert es dessen Abbau. Der Komplex aus Survivin und XIAP hemmt Caspasen, wodurch die Apoptose inhibiert wird und aktiviert die NF- $\kappa$ B- (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Signalübertragung, was die Invasion von Tumorzellen ermöglicht (Dohi et al., 2004, Lu et al., 2007, Mehrotra et al., 2010). Darüber hinaus greift Survivin in die Mitose von Zellen ein. Es kontrolliert während der Zellteilung in der G2/M-Phase die Mikrotubuli-Stabilität und ermöglicht den Aufbau einer mitotischen Spindel (Bollrath et al., 2009, Giodini et al., 2002, Siveen et al., 2014). Kanda et al. konnten zeigen, dass konstitutiv aktiviertes STAT3 in Magenkarzinomen vorkommt und die Hemmung von STAT3 die Survivin Expression verringerte (Kanda et al., 2004). Bcl2 gehört zu der Bcl-Familie, welche Regulatorproteine für die Apoptose darstellen und pro- wie auch anti-apoptotische Proteine beinhaltet (Netzker, 2012b). Bcl steht dabei für „*B-cell lymphoma*“ (Liu et al., 2018). Bcl2 ist ein Membranprotein in der Mitochondrienmembran und wirkt anti-apoptotisch, indem es das Membranpotential stabilisiert (Horn, 2012b). Xiong et al. zeigten im kolorektalen Karzinom, dass STAT3 Bcl2 reguliert, da es nach einer gezielten Inhibition von JAK zu einer Abnahme der STAT3- und Bcl2- Expression kam (Xiong et al., 2008).

## 1.7 Inhibition von STAT3 durch Niclosamid

Auf der Suche nach neuen Substanzen im Einsatz gegen Krebs wurde in verschiedenen Screening Untersuchungen Niclosamid als vielversprechender potenzieller Wirkstoff identifiziert.

### 1.7.1 Anwendung von Niclosamid als Anthelminthikum

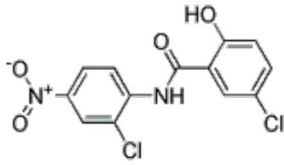
Niclosamid ist ein bekanntes Medikament, das als Anthelminthikum besonders wirksam gegen die menschlichen Bandwürmer (Cestoden) ist und seit circa 50 Jahren zur Behandlung von Darminfektionen beim Menschen mit dem Bandwurm angewendet wird. Beispiele sind die Behandlung des Rinderbandwurms (*Taenia saginata*), des Fischbandwurms (*Diphyllobothrium latum*) und des Hundebandwurms (*Dipylidium caninum*) (Li et al., 2014). Es tötet den Bandwurm durch Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und Stimulation der Adenosidtriphosphatase-Aktivität in den Mitochondrien. Seit 1962 ist es für den Gebrauch beim Menschen als Yomesan auf dem Markt, 1982 wurde es von der *FDA*, der amerikanischen Arzneimittelbehörde zur oralen Behandlung des Bandwurms zugelassen. Entdeckt wurde Niclosamid 1953 und wurde zunächst als Mittel gegen Schnecken seit 1959 vermarktet (Chen et al., 2018).

### 1.7.2 Studien zur Niclosamidwirkung

Zur Identifizierung von Krebsmedikamenten gibt es die Möglichkeit, im Sinne eines Screenings eine Vielzahl von bereits etablierten Wirkstoffen auf deren Wirkung auf Tumorzellen zu untersuchen. In einem solchen Screening entdeckten Ren et al. Niclosamid als wirksam in HeLa-Epithelzellkarzinomzellen, Wieland et al. in Glioblastomzellen und Satoh et al. in adrenokortikalen Karzinomzellen (Ren et al., 2010, Satoh et al., 2016, Wieland et al., 2013). Es zeigte sich, dass Niclosamid in verschiedene Signalwegen eingreift, die dafür bekannt sind, eine Rolle im Rahmen der Entstehung und Progression bösartiger Erkrankungen zu spielen. So greift Niclosamid in den Wnt/ $\beta$ -Catenin-, den mTOR1-, den NF- $\kappa$ B-, den Notch- und den STAT3-Signalweg ein (Chen et al., 2018, Li et al., 2014). Der genaue Wirkmechanismus ist dabei unklar, bislang wurde kein bestimmtes biologisches Zielmolekül identifiziert, an das Niclosamid bindet (Chen et al., 2018).

### 1.7.3 Struktur und pharmakologische Eigenschaften von Niclosamid

Der chemische Name von Niclosamid ist 2',5-dichloro-4'-nitrosalicylanilid (Jin et al., 2010). Es ist ein Salicylsäure-Derivat, hat die Summenformel  $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$  und eine molare Masse von 327,12 g/mol (Doccheck, o. J.-a, Selleckchem, o. J., Chen et al., 2018). Abb. 4 zeigt die chemische Struktur.

**Abb. 4: Chemische Struktur von Niclosamid**

Die Abbildung ist übernommen von (Selleckchem, o. J.)

Durch das in ihm enthaltende Aryl- $\beta$ -Hydroxycarbonyl-Motiv, das auch in anderen pharmakologischen Wirkstoffen wie Doxycyclin oder Aminosalicylsäure vorhanden ist, spricht man ihm einen pleiotropen Effekt und die Fähigkeit zu, verschiedene biologische Ziele anzugreifen (Chen et al., 2018).

## 1.8 Ziele der Arbeit

Die gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Karzinome sind eine Untergruppe der neuroendokrinen Neoplasien, die selten, aber in ihrer Inzidenz steigend sind. Sie zeichnen sich durch ein aggressives biologisches Verhalten, eine hohe Mortalität und schlechte Prognose aus. Die im metastasierten Stadium angewandten Chemotherapien haben sich als kaum wirksam erwiesen und es stehen nur wenige erfolgversprechende spezifische Therapiemöglichkeiten zur Verfügung, was die Erforschung von neuen Therapieansätzen notwendig macht.

Das Protein STAT3 gilt als vielversprechende Zielstruktur für neue Therapieansätze im Rahmen bösartiger Erkrankungen. In zahlreichen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass eine abnorme STAT3-Signalübertragung die Entstehung und das Fortschreiten von Krebserkrankungen beim Menschen fördert, indem sie entweder die Apoptose hemmt oder die Zellproliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung fördert. Ob das Protein STAT3 auch an der Entstehung und Progression gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome beteiligt ist und als potenzielle Zielstruktur für neue zielgerichtete Therapieansätze fungieren könnte, ist bislang nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es demzufolge, zu analysieren, ob STAT3 eine potenzielle Zielstruktur für neue Therapieansätze im Rahmen der Behandlung gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome darstellen könnte.

Hierzu sollten zunächst Gewebeproben von GEP-NEN und korrespondierendem Normalgewebe mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen bezüglich der Expression von STAT3 analysiert werden. Im Rahmen der Expressionsanalyse sollte geprüft werden ob und inwiefern sich die STAT3 Expression im Tumor- und Normalgewebe unterscheidet. Zudem sollte analysiert werden ob eine Assoziation zwischen der STAT3 Expression im Tumorgewebe und klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, T-Stadium, N-Stadium, M-Stadium, *Grading*, etc. und der Prognose der Patienten besteht.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten dann im Rahmen von *in vitro* Experimenten die Auswirkungen einer Inhibition von STAT3 in GEP-NEC Zelllinien analysiert werden. Hierzu sollten die GEP-NEC Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 mit der Substanz Niclosamid behandelt und anschließend mit Hilfe verschiedener Verfahren untersucht werden. Zunächst sollte der Einfluss der STAT3 Inhibition auf die Proliferation und Apoptoseinduktion in GEP-NEC Zellen analysiert werden. Anschließend sollten die Auswirkungen der STAT3 Inhibition auf potenzielle Zielgene von STAT3, wie Survivin, Cyclin D1, c-Myc und Bcl2 untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 4: Laborgeräte**

| Gerät                             | Produktname                       | Hersteller                    | Firmensitz                |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Sicherheitswerkbank               | Hera Safe KS                      | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA              |
| Wasserbad                         | Thermostatic Waterbath            | Fried Electric                | Haifa, Israel (ISR)       |
| Mikroskop                         | Wilovert                          | Hund Wetzlar                  | Wetzlar, Deutschland (DE) |
| Brutschrank                       | Thermo Heaeus HeraCell Inkubator  | Heraeus                       | Hanau, DE                 |
| Gefrierschrank                    | Sparkfree Laboratory Freezer      | Thermo Electron Corporation   | Waltham, USA              |
| Pipette                           | Eppendorf Pipette                 | Eppendorf                     | Hamburg, DE               |
| Stripetten Aufzieher              | Universal 30 RF                   | Eppendorf                     | Hamburg, DE               |
| Stripetten Aufzieher              | 2,5 – 1000 µl<br>Accu jet pro     | Brand                         | Wertheim, DE              |
| Zählkammer                        | Neubauer Zählkammer               | Brand                         | Wertheim, DE              |
| Kryokonservierer                  | Biosafe® MD                       | Cryotherm                     | Siegtal, DE               |
| Reagenzglasmixer                  | Analog Vortex Mixer               | VWR                           | Radnor, USA               |
| Zentrifuge                        | Heraeus Fresco 17 Mikrozentrifuge | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA              |
| Photometer                        | BioPhotometer                     | Eppendorf                     | Hamburg, DE               |
| Photometer-Drucker                | Thermal Printer DPU-141           | Seiko Instruments             | Chiba, Japan (JPN)        |
| Gefrierschrank                    | Premium No Frost -20 °C           | Liebherr                      | Bulle, Schweiz (CHE)      |
| Heizplatte                        | Thermomixer comfort               | Eppendorf                     | Hamburg, DE               |
| Mini-Zentrifuge                   | Spectrafuge                       | Neolab                        | Heidelberg, DE            |
| Elektrophorese Kammer und Zubehör | Mini-PROTEAN® Comb, 10 Well       | Bio-Rad                       | Hercules, USA             |
|                                   | Mini-PROTEAN® Tetra               | Bio-Rad                       | Hercules, USA             |
|                                   | PowerPac HC                       | Bio-Rad                       | Hercules, USA             |
| Blotting Kammer und Zubehör       | Mini Trans-Blot® Cell             | Bio-Rad                       | Hercules, USA             |
|                                   | Criterion-Blotter                 | Bio-Rad                       | Hercules, USA             |
| Rollplatte                        | Rollenmischer RM5                 | Hecht Assistent               | Sondheim, DE              |
|                                   | Sunlab®Rollenmischer SU1400       | Sunlab                        | Bayern                    |

|                       |                                   |                   |                            |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|
| Imager                | Molecular Imager<br>VersaDoc™     | Bio-Rad           | Hercules, USA              |
| Absorptionsmesser     | infinite® 200                     | Tecan Group<br>AG | Männedorf, CHE             |
| Thermal Cycler        | Dyad Disciple qPCR                | Bio-Rad           | Hercules, USA              |
| Zentrifuge für Platte | Kühlzentrifuge Universal<br>30 RF | Hettich           | Tuttlingen, DE             |
| Magnetrührer          | IKA Magnetrührer RCT              | IKA Werke         | Staufen im<br>Breisgau, DE |

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 5: Plastikwaren/Einmalartikel**

| Material                                                                          | Hersteller                  | Firmensitz                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Zellkulturflaschen: 25cm <sup>2</sup> ,<br>75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> | Sarstedt<br>Greiner Bio-One | Nümbrecht, DE<br>Solingen, DE |
| Pipettenspitzen 10 – 1000 µl                                                      | Biozym Scientific GmbH      | Hessisch Oldendorf, DE        |
| Pipettenspitzen 2,5 µl                                                            | Starlab                     | Hamburg, DE                   |
| Lange Pipettenspitzen                                                             | Corning Ink.                | Corning, USA                  |
| Costar Stripetten 2-25 ml                                                         | Corning Ink.                | Corning, USA                  |
| Falkon-Tubes 15 ml, 50 ml                                                         | Greiner Bio-One             | Solingen, DE                  |
| Cryoröhrchen                                                                      | Greiner Bio-One             | Solingen, DE                  |
| Pasteur Pipetten                                                                  | Brand                       | Wertheim, DE                  |
| Eppendorf Tubes 1,5 ml und<br>2 ml                                                | Eppendorf                   | Hamburg, DE                   |
| Küvetten 10 x 4x 45 mm                                                            | Sarstedt                    | Nümbrecht, DE                 |
| 6- und 96-Well-Platten                                                            | Corning Ink.                | Corning, USA                  |
| Spritzen 1 ml Omnifix                                                             | B. Braun SE                 | Melsungen, DE                 |
| Kanülen                                                                           | B. Braun SE                 | Melsungen, DE                 |
| Objekträger                                                                       | Engelbrecht                 | Edermünde, DE                 |
| Deckgläschen                                                                      | Engelbrecht                 | Edermünde, DE                 |

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 6: Chemikalien**

| Reagenzien                                                                                                  | Hersteller                | Firmensitz    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------|
| Trypsin 0,05 % + 0,02 %<br>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)<br>ad Phosphatgepufferte Salzlösung<br>(PBS) | Gibco (Life Technologies) | Carlsbad, USA |

|                                                                       |                               |                                       |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)                           | Gibco (Life Technologies)     | Carlsbad, USA                         |
| Dimethyl sulphoxide (DMSO)                                            | Sigma-Aldrich                 | St. Louis, USA                        |
| Trypanblau 0,4 %                                                      | Gibco (Life Technologies)     | Carlsbad, USA                         |
| Radio-Immunpräzipitationsassay (RIPA) Puffer                          | Sigma-Aldrich                 | St. Louis, USA                        |
| Phosphatase Inhibitor PhosSTOP                                        | Roche                         | Basel, CHE                            |
| Protease Inhibitor cOmplete™, EDTA-free                               | Roche                         | Basel, CHE                            |
| Aqua dest.                                                            | Gibco (Life Technologies)     | Carlsbad, USA                         |
| DNase/RNase-free distilled Water                                      | Gibco (Life Technologies)     | Carlsbad, USA                         |
| Dye Reagent Concentrate                                               | Bio-Rad                       | Hercules, USA                         |
| Ethanol (EtOH) absolut > 99.8 %                                       | VWR                           | Radnor, USA                           |
| Acrylamide/ Bis Solution 37,5:1 30 % Fertigmischung                   | Bio-Rad                       | Hercules, USA                         |
| Trishydroxymethylaminomethane                                         | Sigma-Aldrich                 | St. Louis, USA                        |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS)                                          | Sigma-Aldrich                 | St. Louis, USA                        |
| Ammoniumpersulfat 10 %                                                | Merck                         | Darmstadt, DE                         |
| Tetramethylethylenediamine (TEMED)                                    | Sigma-Aldrich                 | St. Louis, USA                        |
| Glycin                                                                | Merck                         | Darmstadt, DE                         |
| Laemmli Sample Buffer                                                 | Bio-Rad                       | Hercules, USA                         |
| Precision Plus Protein™ WesternC Standards                            | Bio-Rad                       | Hercules, USA                         |
| Chromatography-Paper                                                  | Whatman                       | Little Chalfont, Großbritannien (GBR) |
| Nitrocellulose Membran                                                | Thermo Fisher Scientific Inc. | Waltham, USA                          |
| Ponceau S Pulver                                                      | Sigma-Aldrich                 | St. Louis, USA                        |
| Essigsäure (Eisessig)                                                 | Merck                         | Darmstadt, DE                         |
| Magermilchpulver Gloria                                               | Nestlé                        | Vevey, CHE                            |
| Bovine Serum Albumin Fraction                                         | PAA Laboratories              | Cölbe, DE                             |
| Natriumchlorid                                                        | VWR                           | Radnor, USA                           |
| Methanol                                                              | Merck                         | Darmstadt, DE                         |
| Tween 20                                                              | Sigma-Aldrich                 | St. Louis, USA                        |
| Clarity Western ECL Substrate, Luminol/enhancer und Peroxide solution | Bio-Rad                       | Hercules, USA                         |
| Demineralisiertes Wasser                                              | Fischar                       | Saarbrücken, DE                       |

|                                                                           |                           |                  |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------|
| Precision Protein™ StrepTactin-HRP<br>(Horse Radish Peroxidase) Conjugate | Bio-Rad                   | Hercules, USA    |
| beta-Mercaptoethanol                                                      | Merck                     | Darmstadt, DE    |
| Bromphenolblau                                                            | Merck                     | Darmstadt, DE    |
| Glycerol                                                                  | Merck                     | Darmstadt, DE    |
| Coomassie Blue R250 stain                                                 | Bio-Rad                   | Hercules, USA    |
| CellTiter 96® AQueous One Solution Cell<br>Poliferation                   | Promega Corporation       | Fitchburg, USA   |
| β-Mercaptoethanol                                                         | Sigma-Aldrich             | St. Louis, USA   |
| 70 %iges Ethanol                                                          | Merck                     | Darmstadt, DE    |
| Nuklease freies Wasser                                                    | Gibco (Life Technologies) | Carlsbad, USA    |
| Oligo dT-Primer                                                           | Invitrogen                | Carlsbad, USA    |
| RT-Puffer (5x)                                                            | Roche                     | Basel, CHE       |
| Protector RNase Inhibitor                                                 | Roche                     | Basel, CHE       |
| desoxyNukleosidtriphosphat (dNTP)-<br>Mix                                 | Roche                     | Basel, CHE       |
| Transcriptor reverse transcriptase                                        | Roche                     | Basel, CHE       |
| FastStart TaqMan® Probe Master                                            | Roche                     | Basel, CHE       |
| Xylol                                                                     | Merck                     | Darmstadt, DE    |
| 1 × PBS Tabletten                                                         | Gibco (Life Technologies) | Carlsbad, USA    |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                       | Merck                     | Darmstadt, DE    |
| Mayers Hämalaun                                                           | Merck                     | Darmstadt, DE    |
| Corbit Balsam                                                             | Hecht International       | Burgoberbach, DE |
| Antibody diludent                                                         | Zytomed Systems           | Bargteheide, DE  |

#### 2.1.4 Medium für die Zellkultur

**Tabelle 7: Zellkulturmedien**

|                                   |                    |               |
|-----------------------------------|--------------------|---------------|
| RPMI 1640 Glutamine<br>+ 10 % FCS | Gibco (Life Tech.) | Carlsbad, USA |
| + 1 % Penicillin/Streptomycin     | Biochrom GmbH      | Berlin, DE    |

#### 2.1.5 BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) -Assay

**Tabelle 8: BrdU-Assay**

|                                                  |                                                              |            |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------|
| Cell Proliferation ELISA, BrdU<br>(colorimetric) | Roche                                                        | Basel, CHE |
| Vorbereitung der Lösungen:                       |                                                              |            |
| BrdU labeling solution                           | BrdU labeling reagent verdünnt 1:100 mit<br>Zellkulturmedium |            |



|                                           |                                                                            |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Anti-BrdU-peroxidase (POD) stock solution | Anti-BrdU-POD verdünnt in 1,1 ml Aqua dest.                                |
| Anti-BrdU-POD working solution            | Anti-BrdU-POD stock solution verdünnt 1:100 mit Antibody dilution solution |
| Washing solution                          | Washing buffer concentrate 1:10 verdünnt in Aqua dest.                     |

### 2.1.6 Antikörper/ Puffer für Westernblot

**Tabelle 9: Antikörper für Westernblot**

| Primärantikörper                                                                            | Hersteller        | Firmensitz               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|
| STAT3 (124H6) Mouse monoclonal antibody (mAb)                                               | Cell Signaling    | Cambridge, GBR           |
| Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP Rabbit mAb                                                 | Cell Signaling    | Cambridge, GBR           |
| Survivin Antibody NB500- 201                                                                | Novus Biologicals | Littleton, Colorado, USA |
| Anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) antibody (6C5)-loading control ab8245 | abcam             | Cambridge, GBR           |
| Sekundärantikörper                                                                          | Hersteller        | Firmensitz               |
| Anti- mouse immune globulin G (IgG) peroxidase Conjugat                                     | Sigma-Aldrich     | St. Louis, USA           |
| Anti- rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074                                                 | Cell Signaling    | Cambridge, GBR           |

**Tabelle 10: Puffer und Lösungen für Westernblot**

| Puffer                | Zusammensetzung                                                                    |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1,5 mol Tris (pH 8,8) | 181,65 g Tris ad 1000 ml Aqua dest.                                                |
| 1,0 mol Tris (pH 6,8) | 60,55 g Tris ad 500 ml Aqua dest.                                                  |
| 10 % SDS              | 10 g SDS ad 100 ml Aqua dest.                                                      |
| 10x SDS-Laufpuffer    | 30,3 g Tris (250 mM)<br>144 g Glycine (1,9 M)<br>10 g SDS<br>ad 1800 ml Aqua dest. |
| 10x Transferpuffer    | 30,2 g Tris (25 mM)<br>144 g Glycine (192 mM)<br>ad 1000 ml Aqua dest.             |
| 1x Transferpuffer     | 100 ml 10 x Transferpuffer                                                         |

|                                                    |                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                    | 200 ml Methanol<br>1 ml SDS (10 %)<br>ad 699 ml Aqua dest.                                                        |
| Ponceau Puffer                                     | 0,5 g Ponceau S Pulver<br>100 ml 5 % Essigsäure                                                                   |
| 10x tris-buffered saline (TBS)<br>Waschpuffer      | 87,6 g Natriumchlorid (1,5 M)<br>12,1 g Tris (100 mM)<br>ad 1000 ml Aqua dest.<br>ph 7,5                          |
| 1x TBST Waschpuffer                                | 100 ml 10x TBS Puffer<br>899 ml Aqua dest.<br>1 ml Tween 20                                                       |
| 5 % Milch- Blocking Puffer                         | 2,5 g Milchpulver<br>ad 50 ml TBST Waschpuffer                                                                    |
| 5 % Bovines Serumalbumin<br>(BSA)- Blocking Puffer | 2,5 g BSA<br>ad 50 ml TBST Waschpuffer                                                                            |
| Laemmli-Puffer 6x                                  | 3 ml beta-Mercaptoethanol<br>Spatelspitze Bromphenolblau<br>3 ml Glycerol<br>1 g SDS<br>3,75 ml 1 mol Tris ph 6,8 |

### 2.1.7 Primer/ Referenz-RNA/ Kits für PCR

Tabelle 11: Primer für die Real Time PCR

| Zielgen                | Richtung        | Sequenz 5' - 3'                  | Sonde | Firma                |
|------------------------|-----------------|----------------------------------|-------|----------------------|
| c-Myc                  | <i>forward</i>  | GCT GCT TAG ACG TGG ATT T        | 66    | Roche                |
|                        | <i>backward</i> | TAA CGT TGA GGG GCA TCG          |       |                      |
| GAPDH                  | <i>left</i>     | AGC CAC ATC GCT CAG ACA C        | 60    | Roche                |
|                        | <i>right</i>    | GCC CAA TAC GAC CAA ATC C        |       |                      |
| Survivin<br>(BIRC5)    | <i>reverse</i>  | AAC CGG ACG AAT GCT TTT TA       | 11    | Eurofins<br>Genomics |
|                        | <i>forward</i>  | GCC CAG TGT TTC TTC TGC TT       |       |                      |
| Cateninb1<br>(CTNNB1)  | <i>left</i>     | GCT TTC AGT TGA GCT GAC CA       | 21    | Eurofins<br>Genomics |
|                        | <i>right</i>    | CAA GTC CAA GAT CAG CAG<br>TCT C |       |                      |
| Cyclin D1<br>(CCND1_2) | <i>forward</i>  | GCC GAG AAG CTG TGC ATC          | 58    | Roche                |
|                        | <i>reverse</i>  | CCA CTT GAG CTT GTT CAC CA       |       |                      |
| Bcl2                   | <i>left</i>     | AGT ACC TGA ACC GGC ACC T        | 75    | Roche                |

|                                                               |              |                            |  |       |
|---------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------|--|-------|
|                                                               | <i>right</i> | GCC GTA CAG TTC CAC AAA GG |  |       |
| Die Sonden stammen aus dem Universal Probe Library Set, Human |              |                            |  | Merck |

Die Tabelle zeigt alle verwendeten Primer, sowie deren Sequenzen und die verwendete Sonde

**Tabelle 12: Referenz-RNA für die Real Time PCR**

|                                           |                      |
|-------------------------------------------|----------------------|
| Stratagene qPCR Human Reference Total RNA | Agilent Technologies |
|-------------------------------------------|----------------------|

**Tabelle 13: Kits für die Real Time PCR**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| RNeasy Mini Kit       | Qiagen |
| RNase- Free DNase Set | Qiagen |

### 2.1.8 Antikörper/ Kits/ Puffer für Immunhistochemie (IHC)

**Tabelle 14: Antikörper für Immunhistochemie**

|                                |                              |                |
|--------------------------------|------------------------------|----------------|
| Primärantikörper               | STAT3α (D1A5) XP® Rabbit mAb | Cell Signaling |
| Antikörper zur Isotypkontrolle | Rabbit X0903                 | Daco           |

**Tabelle 15: Kits für Immunhistochemie**

|                                                         |            |                 |
|---------------------------------------------------------|------------|-----------------|
| ZytoChem- Plus HRP Kit, Broad Spectrum                  | HRP008DAB  | Zytomed Systems |
| DAB (3,3'-diaminobenzidine) Substrate Kit High Contrast | DAB500plus | Zytomed Systems |

**Tabelle 16: Puffer für Immunhistochemie**

|                          |                                                                                      |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Natrium Citrat Puffer    | 6 g Natriumcitrat in 2 l dH <sub>2</sub> O durch Zugabe von HCl auf pH von 6 bringen |
| Waschlösung              | 1 l PBS<br>+ 1 ml Tween20                                                            |
| Wasserstoffperoxidlösung | 9 ml PBS<br>+ 1000 µl 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                              |

### 2.1.9 Zelllinien

Es wurde mit den Zelllinien NEC-DUE1-3 gearbeitet. NEC-DUE1 und 2 wurden 2014 durch Krieg et al. etabliert, es handelt sich um Zelllinien, die aus großzelligen neuroendokrinen

Karzinomen etabliert wurden. NEC-DUE3 wurde 2018 von Dizdar et al. aus einem kleinzelligen Karzinom des Analkanals etabliert (Krieg et al., 2014, Dizdar et al., 2018).

Die Zelllinie NEC-DUE1 stammt aus einer atypisch resezierten Lebermetastase eines großzelligen neuroendokrinen Karzinoms des gastrooesophagealen Überganges mit einem Ki-67-Proliferationsindex von 80 %. Bei einem TNM-Status von pT3 N1 M1 L1 V1 G3 wurde eine neoadjuvante Chemotherapie mittels Cisplatin/Etoposid und eine erweiterte Gastrektomie sowie eine atypische Leberresektion durchgeführt. Nach adjuvanter Chemotherapie mit FOLFOX4-Schema war der Patient 38 Monate nach Diagnosestellung noch am Leben. Die runden Zellen bilden Kolonien mit einer traubenartigen Morphologie (Krieg et al., 2014).

NEC-DUE2 stammt aus einer Lymphknotenmetastase eines großzelligen neuroendokrinen Karzinoms der rechten Colonflexur mit einem Ki-67-Proliferationsindex von 80 %. Bei einem TNM-Status von pT4a N2b M1a (LYM) L1 V1 Pn1 G3 wurde eine subtotale Kolektomie mit Ileosigmoidostomie, Hemigastrektomie mit Gastrojejunostomie, totale Pankreatektomie, Splenektomie und systematischer Lymphadenektomie ohne neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt. Der Patient verstarb drei Monate nach der Operation. *In vitro* bildet die Zelllinie NEC-DUE2 Kolonien aus polygonalen Zellen (Krieg et al., 2014).

NEC-DUE3 stammt aus einer inguinalen Lymphknotenmetastase eines kleinzelligen neuroendokrinen Karzinoms des Analkanals mit einem Ki-67-Index von 90 %. Bei einem TNM-Status von pT2 pN0 (0/7) pM1 (OTH) L0 V1 PN0 R1 G3 wurde eine abdominoperineale Rektumresektion mit terminaler Sigmoidostomie und linksseitiger inguinaler Lymphknotendisektion mit Teilresektion der *Vena femoralis* durchgeführt. Es folgte eine adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin/Etoposid in Kombination mit einer Strahlentherapie der linken Leistenregion (Dizdar et al., 2018).

### 2.1.10 Gewebeproben

Die Gewebeproben stammen von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien, die in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf reseziert wurden und im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf aufbereitet, in Paraffinblöcke eingebettet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Daten bezüglich klinisch- pathologischer Parameter der Patienten wurden aus den Patientenakten entnommen. Für die Verwendung der Patientenproben und Daten zu Forschungszwecken lag ein positives Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf vor (Studiennummer 2316 und 3821). Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen entsprechen den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen, welche im Rahmen der Deklaration von Helsinki definiert wurden.

Aus den oben genannten Gewebeproben waren im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Krieg *tissue microarrays* (TMAs) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Bei den TMAs handelt es sich um Paraffinblöcke, die aus zahlreichen Gewebestanzten verschiedener Tumorproben gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien zusammengestellt wurden. Dies erlaubte die zeitgleiche Anfärbung mehrerer Patientenproben und somit eine bessere

Vergleichbarkeit sowie eine deutliche Ressourcenersparnis. Nach immunhistochemischer Färbung wurden mit folgenden Kriterien nicht verwendbare Proben ausgeschlossen: 1) unzureichende Gewebemenge 2) unvollständige Patientendaten 3) fehlerhafte Anfärbung. Insgesamt konnten Gewebeproben von 65 Patienten für die Auswertung verwendet werden. Die Proben beinhalteten dabei sowohl Primärtumorproben (61), als auch Gewebeproben von Metastasen (28). Die Metastasen waren in Lymphknoten (16), der Leber (9), in Fettgewebe (1), in Bindegewebe (1) und in der Appendix vermiformis (1) angesiedelt. Die Primärtumore der Patientenproben waren in Colon/Rektum, Dünndarm, Magen und Pankreas lokalisiert.

Um einen Vergleich der STAT3 Expression in Tumor- und Normalgewebe durchführen zu können, wurden zu insgesamt 15 GEP-NEN Primärtumorproben korrespondierende Normalgewebeproben des gleichen Patienten ausgewählt. Hierbei handelte es sich um Gewebeproben aus den tumorfreen Absetzungsrandern der Primärtumoren.

### 2.1.11 STAT3 Inhibitor

Als pharmakologischer STAT3 Inhibitor wurde Niclosamid mit dem Handelsnamen Niclocide von der Firma Selleckchem verwendet. Es wurde entsprechend der Herstellerangaben in Ethanol gelöst.

### 2.1.12 Software

|                                    |           |                  |
|------------------------------------|-----------|------------------|
| Tecan i-control™ Microplate Reader | Tecan     | Zürich, CHE      |
| Opticon Monitor                    | Bio-Rad   | Kalifornien, USA |
| Quantity One Basic Version 4.6     | Bio-Rad   | Kalifornien, USA |
| Image Lab™                         | Bio-Rad   | Kalifornien, USA |
| IBM® SPSS® Statistics Version 25   | IBM       | New York, USA    |
| GraphPad Prism® Version 7.03       | GraphPad  | Kalifornien, USA |
| Microsoft 365, Excel, Version 2108 | Microsoft | Washington, USA  |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer *laminar flow bank* von Thermo Scientific unter sterilen Bedingungen durchgeführt, die verwendeten Lösungen wurden vor Benutzung für 20 min bei 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Die adhären wachsenden Zellen der Zelllinien NEC-DUE1-3 wurden in 12 ml Nährmedium in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät und bei 37 °C, 5 %iger CO<sub>2</sub>- Atmosphäre und 75 %iger Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 Glutamine verwendet, welchem 10 % fetales Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt.

Bei 70-80 %iger Konfluenz des Zellrasens nach durchschnittlich 7 Tagen wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin/EDTA für 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium in

gleicher Menge inaktiviert. Nach Zentrifugation bei 800 *rounds per minute* (rpm) über 4 min bei Raumtemperatur (RT), einem Waschvorgang in PBS und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen dann für die weiteren Experimente verwendet oder zur Passagierung in frischem Nährmedium abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie im Verhältnis 1:2 bis 1:8 verdünnt und in neuen Kulturflaschen ausgesät.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen

Die zuvor gelösten Zellen wurden mit einer definierten Menge des Mediums verdünnt. Hieraus wurden 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau im Verhältnis 1:1 gefärbt. 10 µl dieser Suspension wurden in eine Neubauer Zählkammer mit 4 Eckquadraten verteilt, wobei jedes dieser Eckquadrate ein Volumen von 0,1 µl (1 mm Breite x 1 mm Tiefe x 0,1 mm Höhe) misst. Die nicht angefärbten und somit als lebend markierten Zellen wurden gezählt und die Zellmenge in der ursprünglichen Zellsuspension mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellmenge pro ml in der ursprünglichen Suspension} = \frac{\text{Zellzahl}}{4 [\text{Zahl der Eckquadrate}]} \times 2 \times 10^4$$

### 2.2.3 Pharmakologische Behandlung der Zellen

Zur Behandlung mit dem STAT3 Inhibitor Niclosamid wurden die Zellen in Zellkulturflaschen zu gleichen Teilen ausgesät und mindestens 24 Stunden kultiviert, bis ungefähr 70 % des Bodens bedeckt waren. Das Compound Niclosamid wurde auf die gewünschten Konzentrationen von 0,1 µM, 0,3 µM oder 1 µM im Zellkulturmedium verdünnt und nach Abnahme des alten Mediums auf die Zellen gegeben.

### 2.2.4 Untersuchung der Zellviabilität

Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit der verwendeten Zelllinien wurde der *CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* der Firma Promega verwendet. Dieser Assay basiert darauf, dass das zu den Zellen gegebene Reagenz MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) bei Anwesenheit von NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) oder NADP in das kolorimetrisch nachzuweisende Substrat Formazan reduziert wird. NADPH und NADP fallen jedoch nur in metabolisch aktiven Zellen an. Die Menge des bei einer bestimmten Wellenlänge absorbierten Formazan ist dabei proportional zu der Anzahl an stoffwechselaktiven und damit lebenden Zellen. Somit lässt sich die Wirkung des Compounds Niclosamid auf die Zellviabilität messen.

Auf eine 96-Well-Platte wurden 100.000 Zellen pro Well ausgesät und über 24 Stunden bei 37 °C und 5 %iger CO<sub>2</sub>- Atmosphäre kultiviert. Es erfolgte die Behandlung mit Niclosamid in folgenden Konzentrationen: 10 µM, 3 µM, 1 µM, 0,3 µM, 0,1 µM, 0,03 µM, 0,01 µM, 0,003 µM. Dabei wurden für jede Konzentration drei Wells angesetzt. In gleicher Weise wurden die Zellen als Kontrolle mit dem für Niclosamid verwendeten Lösungsmittel Ethanol behandelt. Nach 72 Stunden Inkubation wurde jedem Well 20 µl MTS zugesetzt und der Farbumschlag des Mediums nach 30, 60 und 90 Minuten mit Hilfe des Tecan infinite<sup>®</sup> 200 Microplate Reader

(Tecan, Zürich, Schweiz) gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Zellen im Brutschrank kultiviert.

Bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm wurde die Absorption im Tecan infinite® 200 Microplate Reader (Tecan, Zürich, Schweiz) gemessen. Die Auswertung erfolgte in Excel mit den jeweils durch das Programm tecan i-control™ exportierten Differenzwerten zwischen diesen Wellenlängen, wodurch die unspezifische Hintergrundabsorption als mögliche Fehlerquelle reduziert werden konnte. Zur Bestimmung des Anteils vitaler Zellen nach einer Behandlung mit Niclosamid in Relation zur unbehandelten Kontrolle die folgende Formel verwendet:

$$\text{Viabilität behandelte Zellen (\%)} = \frac{\text{Absorptionsmenge des behandelten Wells}}{\text{Mittelwert Absorptionsmenge der Kontrollwells}} \times 100$$

Jeder Versuch wurde dreimal und für die Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels GraphPad Prism® zusammengefasst und visualisiert. Ebenso erfolgte hiermit die Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC50, also der Niclosamidkonzentration bei der die Viabilität der behandelten Zellen auf 50 % reduziert wurde.

### 2.2.5 Untersuchung der Zellproliferation

Es wurde der *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetrics) Assay* der Firma Roche angewendet. Das Reagenz 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) wird analog zu dem Nukleosid Thymidin (bestehend aus der Base Thymin und der Pentose Desoxyribose), welches Bestandteil der DNA ist, während der Synthese in diese eingebaut. Der Versuch gründet darauf, dass statt des Thymidins das BrdU während der Zellproliferation in die DNA inkorporiert und mittels immunologischer Verfahren sichtbar gemacht wird, wodurch eine Aussage über die Zellzahl der proliferierenden Zellen getroffen werden kann. Bei vorheriger Behandlung der Zellen mit Niclosamid lässt sich somit eine Aussage über die Wirkung des Niclosamids auf die Zellproliferation machen (Roche, o. J.).

Die Zellen werden zunächst mit unterschiedlichen Niclosamid-Konzentrationen behandelt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit BrdU, womit der Einbau des Analogons in die DNA proliferierender Zellen ermöglicht wird. Die DNA wird dann denaturiert, womit die Zugänglichkeit für die Antikörper verbessert wird. Es wird der Antikörper hinzugegeben, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist (Anti-BrdU-POD). Durch dann folgende Substratzugabe kommt es zu einem Farbumschlag. Die Absorption wird photometrisch detektiert und ausgewertet. Folgende Kontrollen wurden angesetzt: In die als *blank* bezeichneten Kontrollwells wurden keine Zellen ausgesät, jedoch nach Protokoll BrdU und Anti-BrdU-POD hinzugegeben, die gemessene Absorption zeigte also unspezifische Bindungen des Antikörpers und wurde von den anderen Messwerten abgezogen (Roche, o. J.).

In eine 96-Well-Platte wurden pro Well 100.000 Zellen in 100 µl ausgesät und über 24 Stunden kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von Niclosamid bzw. von Ethanol in absteigenden Konzentrationen von 10 µM, 3 µM, 1 µM, 0,3 µM, 0,1 µM, 0,03 µM, 0,01 µM, 0,003 µM. Pro Konzentrationsstufe wurden 3 Wells angesetzt. Nach Inkubation über 72 Stunden bei 37 °C wurde pro Well 10 µl BrdU *labeling solution* hinzugegeben und die Platte wiederum für 2

Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde dann durch Sog entfernt und 200 µl FixDenat Lösung pro Well hinzugegeben. Nach 30- minütiger Inkubation bei RT wurde dieses durch Sog entfernt. Der Antikörper wurde dann in Form von 100 µl *anti-BrdU-POD working solution* in jedes Well gegeben und über 90 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Wells dreimal mit 250 µl *washing solution* gereinigt, bevor 100 µl der *substrate solution* hinzugefügt wurden. Die Absorption wurde im infinite® 200 Microplate Reader der Firma Tecan nach 5, 10 und 15 Minuten bei einer Wellenlänge von 370 nm gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Messung der Absorption bei der Referenzwellenlänge von 492 nm. Die Differenz aus gemessener Absorption bei 370 nm und der Absorption bei der Referenzwellenlänge wurde für die weiteren Berechnungen verwendet. Die Auswertung erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Proliferierende Zellen (\%)} = \frac{\text{Absorption des behandelten Wells}}{\text{Mittelwert Absorption der Kontrollwells}} \times 100$$

## 2.2.6 Proteinchemische Untersuchung

### 2.2.6.1 Proteinisolierung

Nach der gewünschten Inkubationszeit im Brutschrank wurden die adhärenenten Zellen nach Waschung mit DPBS mit Trypsin abgelöst und zusammen mit dem zuvor abgenommenen Medium in einem Falconröhrchen zentrifugiert. Nach zweimaliger Waschung mit DPBS und jeweiligem Verwerfen des Überstandes nach Zentrifugation wurden die Zellen auf Eis weiterbehandelt: Sie wurden mit 200 µl eines Ansatzes zu gleichen Anteilen bestehend aus Protein-Lysepuffer, Phosphatase-Inhibitor und Protease-Inhibitor resuspendiert.

Zur Optimierung des Proteinaufschlusses wurden die Proben circa 20 mal durch eine feine Kanüle gezogen. Diese Mischung wurde 15 min auf Eis inkubiert und dabei alle 5 min mittels Vortex durchmischt, bevor das Lysat 30 min bei 13,3 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde zur weiteren Behandlung auf Eis gekühlt oder bei -80 °C gelagert.

### 2.2.6.2 Konzentrationsmessung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels photometrischer Messung nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Dazu wurden 2 µl der jeweiligen Proteinlösung zu 998 µl eines 1:5 verdünnten Färbereagens (*Bio-Rad Dye Reagent Concentrate*) gegeben, 4 min inkubiert und die Absorption bei 595 nm mittels Photometer gemessen.

### 2.2.6.3 Vorbereitung der Proteinproben und Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der Proteinproben auf die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die jeweils gleiche Menge an Protein (je nach Versuch 15-35 µg) mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 - 38 µl verdünnt und Laemmli-Ladepuffer im Verhältnis 1:6 zugefügt. Nach Abzentrifugieren bei 7,8 rpm für 10 s wurden die Proteine durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min denaturiert, erneut für 10 s zentrifugiert, auf Eis zwischengelagert und der weiteren Verarbeitung zugeführt.

Für das Trenngel als unteren Bestandteil des SDS- haltigen Polyacrylamid Elektrophoresegels wurden die Komponenten Aqua dest., 30 %iges Acrylamid, Tris (1,5 mol), 10 %iges SDS, 10



%iges APS und TEMED zusammengefügt, um ein Gesamtvolumen von 10 ml zu erhalten (siehe

Tabelle 17). Dabei wurde der Anteil an Aqua dest. und Acrylamid in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der Zielproteine variiert. Für die Herstellung des 5 %igen Sammelgels in einem Volumen von 4 ml als oberen Bestandteils des Elektrophoresegels wurde 1- molares Tris verwendet, die genaue Zusammensetzung ist in

Tabelle 17 aufgelistet. Es wurde auf das ausgehärtete Trenngel gegeben und mittels eines aufgesetzten Kamms Taschen gebildet, die nach Aushärtung mit den vorbereiteten Proteingemischen befüllt wurden. Zusätzlich wurden 3 µl des *Precision Plus Protein Western C Standards* als Laufmarkierung in eine randständige Tasche eingesetzt, die restlichen Taschen wurden mit Laemmli- Puffer befüllt. Bei einer Spannung von 90 V über 30 min, gefolgt von 115 V über 60 min erfolgte die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Kammer.

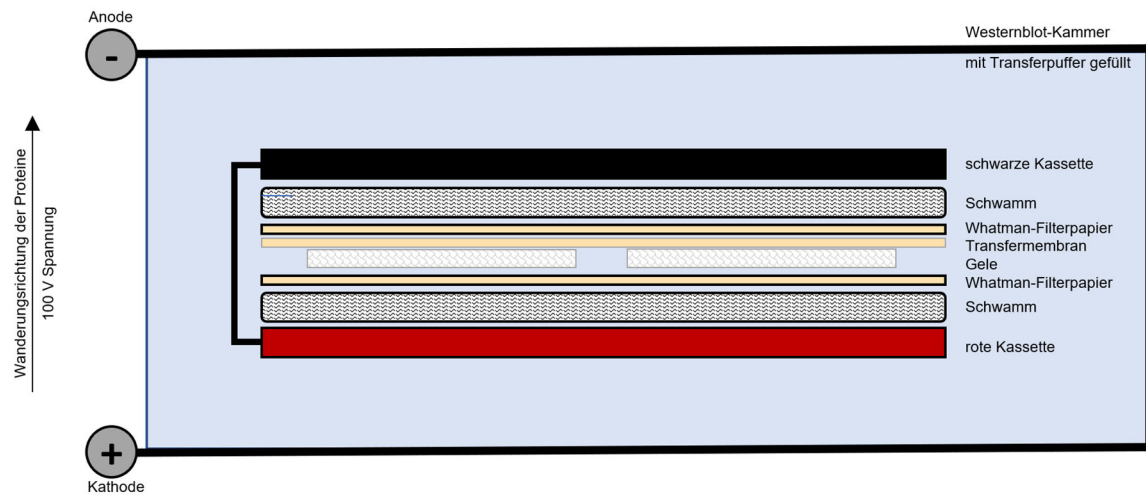
**Tabelle 17: Zusammensetzung der Elektrophoresegele**

| Substanz               | Trenngel<br>(insgesamt 10 ml) |       | Sammelgel<br>(insgesamt 4 ml) |
|------------------------|-------------------------------|-------|-------------------------------|
|                        | 10 %                          | 15 %  | 5 %                           |
| Aqua dest.             | 4,0                           | 2,3   | 2,7                           |
| 30 % Acrylamid Mix     | 3,3                           | 5,0   | 0,67                          |
| 1,5 mol Tris (pH 8,8)  | 2,5                           | 2,5   | -                             |
| 1,0 mol Tris (pH 6,8)  | -                             | -     | 0,5                           |
| 10 % SDS               | 0,1                           | 0,1   | 0,04                          |
| 10 % Ammoniumpersulfat | 0,1                           | 0,1   | 0,04                          |
| TEMED                  | 0,004                         | 0,004 | 0,004                         |

Die Tabelle zeigt die Mengenangaben der Substanzen zur Herstellung der unterschiedlichen Trenngele und des Sammelgels. Für die Versuche mit STAT3 und pSTAT3 wurde 10 %iges Gel, für die Versuche mit Survivin wurde 15 %iges Geld verwendet.

#### 2.2.6.4 Western Blotting

Der Transfer der Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose Membran wurde mit der *western blotting* Technik durchgeführt. Das Gel wurde dafür aus seiner Halterung befreit und luftblasenfrei auf die Nitrocellulosemembran gelegt, zu beiden Seiten mit Whatman-Filterpapier und Schwämmen ummantelt und in eine Kassette gelegt (siehe Abb. 5). Diese wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Westernblot-Kammer gestellt und eine Spannung von 100 V über 60 min bei 4 °C angelegt. Somit wurden die Proteine in Richtung Anode auf die Membran übertragen.



**Abb. 5: Aufbau Westernblot- Kassette und Kammer**

Schematisch aufgezeichnet ist der Aufbau der einzelnen Komponenten bei Western Blotting Verfahren. Indem eine Spannung von 100 V in der Westernblot-Kammer angelegt wird, wandern die Proteine in Richtung Anode vom Gel auf die Transfermembran

Um zu überprüfen, ob eine Übertragung des Proteins auf die Membran erfolgt war, wurde der Farbstoff Ponceaurot verwendet. Nach Spülung der Membran mit TBS-T (1x TBS zugesetzt mit 0,1 % Tween 20) erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungen mit 7,5ml 5 %iger Milchlösung für 60 min bei RT auf einem Rollbrett.

#### 2.2.6.5 Immundetektion

Für die Immundetektion der aufzusuchenden Proteine wurde zunächst der Primärantikörper in der aus Tabelle 18 zu entnehmenden Verdünnung in 3 ml Milchpulver- oder BSA-Lösung gegeben und für 16 Stunden bei 4 °C auf einer Dreh-Schwenkplatte inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit TBS-T über jeweils 5 min wurde der Sekundärantikörper in gleicher Konzentration sowie 1,3 µl Strep Tactin in 3 ml 5 %iger Milchpulverlösung auf die Membran gegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes 3-maliges Waschen mit TBS-T über jeweils 5 min, wonach die Membranen bis zur Auswertung in TBS-T gefüllten Tubes gelagert wurden.

**Tabelle 18: Primärantikörper und deren Versuchsbedingungen**

| Protein                       | STAT3                    | pSTAT3                     | Survivin | GAPDH         | alphaTubulin  |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|---------------|---------------|
| Molekulargewicht [kDa]        | STAT3α: 86<br>STAT3β: 79 | pSTAT3α: 86<br>pSTAT3β: 79 | 16,5     | 37            | 50            |
| Acrylamidanteil des Trenngels | 10 %                     | 10 %                       | 15 %     | 10 % und 15 % | 10 % und 15 % |

| Blocken unspezifischer Bindungen      |                                |                                |                                |                                |                                |
|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Blockierungslösung                    | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T |
| Menge der Lösung<br>[ml]              | 7,5                            | 7,5                            | 7,5                            | 7,5                            | 7,5                            |
| Inkubationszeit [h]                   | 1                              | 1                              | 1                              | 1                              | 1                              |
| Inkubationstemperatur                 | RT                             | RT                             | RT                             | RT                             | RT                             |
| Inkubation mittels Primärantikörper   |                                |                                |                                |                                |                                |
| Verdünnung                            | 1 : 1000                       | 1 : 2000                       | 1 : 1000                       | 1 : 5000                       | 1 : 5000                       |
| Inkubationslösung                     | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 % BSA<br>in TBS-T            | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T |
| Inkubationszeit [h]                   | 16                             | 16                             | 16                             | 1                              | 0,67                           |
| Inkubationstemperatur [°C]            | 4                              | 4                              | 4                              | RT                             | RT                             |
| Inkubation mittels Sekundärantikörper |                                |                                |                                |                                |                                |
| Sekundärantikörper                    | Mouse IgG<br>Peroxidase        | Rabbit IgG<br>HRP              | Rabbit IgG<br>HRP              | Mouse IgG<br>Peroxidase        | Mouse IgG<br>Peroxidase        |
| Verdünnung                            | 1 : 1000                       | 1 : 2000                       | 1 : 1000                       | 1 : 5000                       | 1 : 5000                       |
| Inkubationslösung                     | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T | 5 %<br>Milchpulver<br>in TBS-T |
| Inkubationszeit [h]                   | 1,5                            | 1,5                            | 1,5                            | 1                              | 0,67                           |
| Inkubationstemperatur                 | RT                             | RT                             | RT                             | RT                             | RT                             |

Für die Immundetektion gelten unterschiedliche Versuchsbedingungen für die jeweiligen zu detektierenden Proteine. Abhängig von dem Molekulargewicht wurde der Acrylamidanteil des Elektrophoresegels ausgewählt. Die Verdünnung der Primärantikörper sowie die zu verwendende Blockierlösung und der zu verwendende Sekundärantikörper wurde unter Berücksichtigung der Herstellerangaben und der im Forschungslabor gesammelten Versuchserfahrungen gewählt.

#### 2.2.6.6 Housekeeping

Als *Housekeeping* Kontrolle wurden die Proteine GADPH und alphaTubulin auf gleiche Weise auf der jeweiligen Membran detektiert: Die Inkubation der Membran mit dem Primär- und Sekundärantikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 %iger Milchpulverlösung über 60 min bzw. über 40 min bei RT.

#### 2.2.6.7 Auswertung

Die Membran wurde mit 1 ml einer 1:1 Mischung aus Luminol/*enhancer*- und Peroxide- Lösung beschichtet, mittels Versadoc von Bio-Rad belichtet und fotografiert (Einstellungen: 1x Gain, 1 x 1 Bin, Blende auf 2,8).

## 2.2.7 Molekulargenetische Untersuchungen

Um die Expression bestimmter Gene in den verwendeten Zelllinien und die Wirkung der Behandlung mit Niclosamid auf diese Gene zu untersuchen, wurde die Polymerase Ketten Reaktion (*Polymerase chain reaction* (PCR)) durchgeführt. Dies ist eine Methode, die die Quantifizierung von RNA möglich macht. Dazu wird zunächst RNA aus den Zellen isoliert und zu einer komplementären DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgt eine Amplifikation dieser cDNA. Es wurden unbehandelte Zellen für Aussagen zur Grundexpression untersucht und über 12, 24 und 72 Stunden mit Niclosamid behandelte Zellen für Aussagen über die Wirkung des Niclosamids auf die Zielgene.

### 2.2.7.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA aus den Zellen wird das *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen verwendet. Dabei werden die Zellen durch ein Guanidine-Thiocyanat enthaltenden RLT Puffer lysiert und homogenisiert, wobei zugleich RNasen inaktiviert werden. Die freiwerdende intakte RNA wird dann auf Säulen gegeben, die mit Silica Membranen beschichtet sind, welche selektiv RNA bindende Eigenschaften besitzen. Die RNA wird hierauf von Kontaminationen freigewaschen und in Wasser gelöst (Qiagen, o. J.).

Zunächst wurden die Zellen durch Trypsinierung vom Flaschenboden gelöst und mittels PBS gewaschen. 10 ml RLT-Puffer wurden mit 10 µl β-Mercaptoethanol vermischt. Das Zellpellet wurde mit 350 µl RLT-Puffergemisch resuspendiert und durch 10 - 15- maliges Aufziehen in einer Kanüle homogenisiert. Das gewonnene Lysat wurde anschließend mit einer gleichen Menge 70 %igem Ethanol gemischt, um optimale Bindungsbedingungen zu schaffen. Dieses Gemisch wurde auf die Säule geladen und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Es folgte der DNase-Verdau auf der Membran: 350 µl RW 1 Puffer wurden auf die Säule pipettiert und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurden 10 µl *DNase I StockSolution* vermischt mit 70 µl RDD Puffer auf die Membran gegeben und diese bei RT 15 min inkubiert. Es wurden erneut 350 µl RW1 Puffer auf die Säule geladen und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurden 2 Durchgänge mit jeweils 500 µl RPE Puffer durchgeführt, wobei beim ersten Mal 15 s und beim zweiten Mal 2 min bei 8000 x g zentrifugiert wurde, worauf das Trockenzentrifugieren über eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit erfolgte. Die Säule wurde dann auf ein neues 1,5 ml fassendes Tube überführt, 40 µl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben, diese eine Minute stehen gelassen und eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Bei diesem Vorgang wurde die RNA von der Membran in das Wasser gelöst und damit ein RNA Extrakt hergestellt. Dieses wurde bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung der RNA Konzentration in der jeweiligen Probe erfolgte mit dem infinite® 200 von Tecan. Dabei wurden jeweils 1,5 µl der Extrakte sowie als Blank 1,5 µl RNase freies Wasser auf die Messfelder gegeben und die Konzentration in ng/µl durch das Programm i-control Microplate Reader in eine Excel Tabelle exportiert.

### 2.2.7.2 cDNA- Synthese durch reverse Transkription

Die Voraussetzung zur Durchführung der PCR ist die Umschreibung der RNA in die komplementäre DNA (cDNA), welche durch Verwendung des Enzymes Reverse Transkriptase durchgeführt wurde. Dies ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Pro Ansatz wurden 2 µg RNA mit H<sub>2</sub>O auf das Volumen von 11 µl gebracht. Hinzu wurden 2 µl der zuvor 1:1 mit nukleasefreiem Wasser verdünnten Oligo dT-Primer gefügt und für 10 min bei 65 °C inkubiert, wodurch sich die Primer an die RNA anlagerten. Folgender Ansatz, der alle für die Transkription notwendigen Bestandteile enthielt, wurde zusammenpipettiert:

4 µl RT- Puffer

0,5 µl Protector RNase Inhibitor

2 µl dNTP-Mix

0,5 µl Reverse Transkriptase

Zu der RNA/Primer Lösung wurden 7 µl des Ansatzes gegeben, mittels Vortex durchmischt und 30 min bei 55 °C inkubiert. Danach wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen für 5 min auf 85°C inaktiviert. Als Produkt entstanden somit 20 µl cDNA, welches bei -20 °C gelagert wurde.

Für jede Probe wurde eine *No-Amplification* Kontrolle ohne Reverse Transkriptase sowie eine *No-Template* Probe ohne RNA mitgeführt, um eine Verunreinigung des Ansatzes auszuschließen.

### 2.2.7.3 Realtime PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, bei der spezifische DNA-Sequenzen vervielfältigt werden bei Durchlaufen mehrerer Zyklen. Jeder Zyklus besteht dabei aus 3 Schritten: Bei der Denaturierung (Schritt 1) werden die Doppelstränge in Einzelstränge gebrochen, bei dem *Annealing* (Schritt 2) legen sich die Primer an ihre komplementäre Sequenz des Einzelstranges an und bei der Elongation (Schritt 3) bildet das thermostabile Enzym DNA-Polymerase neue komplementäre Nukleinsäuresequenzen. Bei jedem Zyklus wächst die Anzahl der Amplifikationen damit exponentiell (Netzker, 2012d). Bei der Realtime PCR werden spezielle Sonden verwendet, die sich zwischen die Primer setzen. Bei der Elongation werden diese hydrolytisch gespalten, wobei es zu der Anregung und Aussendung eines Fluoreszenzsignales kommt. Da sich dieses proportional zu der neu gebildeten DNA verhält, erhält man durch Messung des Signals eine Aussage über die Quantität der amplifizierten DNA (Heid et al., 1996).

Die Messung der cDNA-Proben erfolgte in Dreifachansätzen. Folgende Vorbereitungen wurden durchgeführt. Die jeweilige cDNA wurde auf 25 ng/µl mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die für die zu detektierende Nukleinsäuresequenz, im Folgenden auch Zielsequenz genannt, wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Primer und Sonden benutzt. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. Die Primer wurden jeweils 1 : 5 verdünnt. Es wurde der *FastStart TaqMan® Probe Master* Reaktionsmix von der Firma Roche benutzt.

Folgender Ansatz wurde zusammengefügt und in jedes Well pipettiert:

12,5 µl TaqMan® *Mastermix*

0,25 µl Sonde

0,25 µl Forward Primer

0,25 µl Reverse Primer

10,75 µl H<sub>2</sub>O

Daraufhin wurde pro Slot 1 µl der cDNA, also 25 ng hinzugefügt.

Für die *No-Template* und *No-Amplification* Kontrollen wurden ebenfalls Wells angesetzt und zusätzlich eine als *blank* bezeichnete, statt cDNA 1 µl Wasser führende Kontrolle angesetzt. Die Platte wurden mit Deckeln verschlossen, kurz anzentrifugiert und der Reaktion zugefügt. Diese fand in dem Thermal Cycler Dyad Disciple qPCR von Bio-Rad unter folgenden Bedingungen statt:

1. 95°C für 10 min
2. 95°C für 15 s
3. 60°C für 1 min
4. Messung
5. Wiederholung der Schritte 2. bis 4. für 39 weitere Zyklen
6. Ende

Das Programm Opticon Monitor von Bio-Rad zeigt die  $C_T$  (*threshold cycle*) Werte an: Dieser Schwellenwert ist definiert als die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals über das Hintergrundsignal ansteigt. Je kleiner dieser Wert ist, desto weniger Zyklen wurden benötigt, um das Hintergrundsignal zu übertreffen und desto größer war die Ausgangskonzentration der zu untersuchenden DNA-Zielsequenz. Es besteht also ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen  $C_T$ -Werten und der Konzentration der Zielsequenz.

#### 2.2.7.4 Auswertung

Zur Auswertung wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode nach Livak und Schmittgen verwendet (Livak and Schmittgen, 2001). Es erfolgte zum einen die Bestimmung der Grundexpression. Dabei wurde die relative Expression des Zielgens in den Zelllinien NEC-DUE1-3 ( $\Delta C_{T\text{NEC-DUE1-3}}$ ) der relativen Expression des Zielgens in aus Referenz-RNA synthetisierter cDNA entgegengestellt ( $\Delta C_{T\text{Referenz}}$ ), woraus sich der relative Expressionsunterschied der Genexpression bezogen auf die Referenz-RNA ergibt ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ). Dieser Ausdruck wird auch mit *fold change to reference* bezeichnet. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, sodass 6 Messwerte gewonnen wurden.

$\Delta\Delta C_T = (C_T^* \text{ Zielgen, NEC-DUE1-3} - C_T^* \text{ Houskeeping, NEC-DUE1-3}) - (C_{T\text{-MW}}^{**} \text{ Zielgen, Referenz} - C_{T\text{-MW}}^{**} \text{ Houskeeping, Referenz})$

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{ NEC-DUE1-3}} - \Delta C_{T\text{ Referenz}}$

$2^{-\Delta\Delta C_T}$  = Expressionsunterschied bezogen auf die Referenz-RNA

\*Hier werden die  $C_T$  Werte aus jedem einzelnen Well benutzt.

\*\*Hier werden die Mittelwerte, gebildet aus den  $C_T$  Werten aus den drei Wells benutzt.

Zum anderen erfolgte die Untersuchung der Auswirkung der Behandlung mit Niclosamid auf die jeweiligen Zielgene. Dabei wurde die relative Expression des Zielgens in den behandelten Zellen ( $\Delta C_T$  behandelte Zelle) der relativen Expression des Zielgens in den unbehandelten Zellen (also denen, bei denen EtOH zum Medium hinzugefügt wurde) ( $\Delta C_T$  unbehandelte Zelle) entgegengestellt, woraus sich die relative Veränderung der Genexpression bezogen auf die Kontrolle (EtOH) ergibt ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ). Dieser Ausdruck wird auch mit *fold change to control* bezeichnet. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, sodass 9 Messwerte gewonnen wurden.

$$\Delta\Delta C_T = (C_T^* \text{ Zielgen, behandelt} - C_T^* \text{ Houskeeping, behandelt}) - (C_{T-MW}^{**} \text{ Zielgen, unbehandelt} - C_{T-MW}^{**} \text{ Houskeeping, unbehandelt})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ behandelte Zelle} - \Delta C_T \text{ unbehandelte Zelle}$$

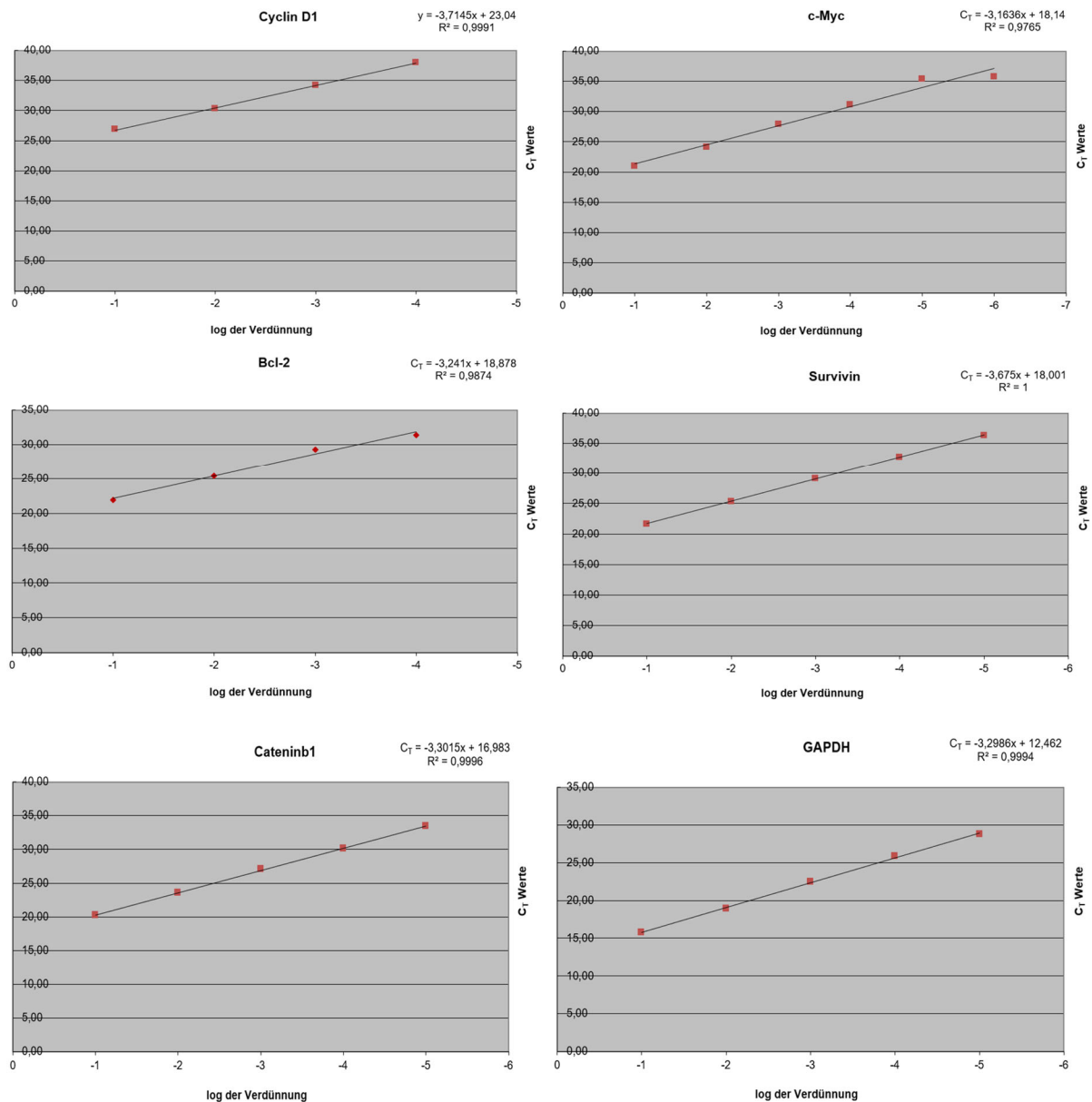
$2^{-\Delta\Delta C_T}$  = relative Veränderung der Genexpression bezogen auf die unbehandelte Zelle/Kontrolle

\*Hier werden die  $C_T$  Werte aus jedem einzelnen Well benutzt.

\*\*Hier werden die Mittelwerte, gebildet aus den  $C_T$  Werten aus den drei Wells benutzt.

Die Ergebnisse wurden im Programm GraphPad Prism visualisiert und die statistischen Signifikanzen mittels eines nichtparametrischen Mann-Whitney-U Tests ermittelt.

Vor Beginn der Untersuchungen wurden Effizienzkurven für die jeweiligen Primer unter Benutzung von humaner Referenz-RNA erstellt. Dafür wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe der cDNA Konzentrationen erstellt und die  $C_T$ -Werte mittels PCR ermittelt. Dabei entstand eine Gerade mit der Gleichung  $C_T = m \times x + b$ , wobei  $m$  die Steigung, also die Effizienz der PCR-Reaktion,  $x$  die jeweils eingesetzte cDNA Konzentration und  $b$  den y-Achsenabschnitt darstellt. Somit wurde die optimale eingesetzte cDNA Menge bestimmt, die bei allen Versuchen 25  $\mu\text{g}$  betrug.



**Abb. 6: Effizienzkurven der Primer unter Benutzung von humaner Referenz-RNA**

Abgebildet sind die Referenzkurven für die einzelnen Primer. Sie wurden erstellt mit Messwerten, die bei der Durchführung der PCR unter Verwendung von humaner Referenz-RNA in logarithmischer Verdünnungsreihe gewonnen wurden. Gleichung:  $C_T = m \times x + b$ ,  $m$  = Steigung (Effizienz der PCR-Reaktion),  $x$  = jeweils cDNA Konzentration,  $b$  = y-Achsenabschnitt.

## 2.2.8 Immunhistochemische Untersuchungen

### 2.2.8.1 Prinzip Immunhistochemie

Zur Untersuchung der Expression von STAT3 in verschiedenen Gewebeproben wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Immunhistochemie ist eine Methode, die eine Visualisierung von Zielantigenen möglich macht, indem Antikörper benutzt werden, die an bestimmte Bereiche des nachzuweisenden Antigens binden (Hantschke and Palmedo, 2015). Diese Aminosäuresequenzen werden Epitope genannt. Unter Verwendung des ZytoChem-Plus HRP Kit der Firma Zytomed wurden die Primärantikörper mit dem Streptavidin-Biotin-Prinzip nachgewiesen.



An den Primärantikörper bindet dabei ein biotinylierter Sekundärantikörper, an welchen wiederum ein Enzymkonjugat, bestehend aus Streptavidin und Peroxidase, gebunden wird. Diese Peroxidase (*Horse Radish Peroxidase* = HRP) ermöglicht im nächsten Schritt die enzymatische Reaktion von hinzugegebenen DAB (3,3'-diaminobenzidine), wobei ein bräunlicher Farbstoff als Reaktionsprodukt entsteht und somit am Ort der initialen Primärantikörperbindung im Mikroskop sichtbar wird. Somit kann mit Hilfe der Immunhistochemie das Vorhandensein des gesuchten Proteins sichtbar gemacht werden (Zytomed Systems, o. J.).

#### **2.2.8.2 Färbung**

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimal über 10 min in Xylol entparaffiniert. Es folgte die Befreiung der Schnitte vom Xylol in einer absteigenden Alkoholreihe von jeweils zwei Minuten in 2 × 99,5 % Ethanol, 2 × 96 % Ethanol, 2 × 80 % Ethanol, 1 × 70 % Ethanol und die Inkubation in Aqua dest. für 5 min. Zum Freimachen der Epitope wurden die Schnitte in Natrium Citrat Puffer für 30 min gekocht, 20 min abgekühlt und 5 min in eine Waschlösung aus 1 × PBS + 0,1 % Tween20 gestellt.

Auch zwischen den folgenden Schritten wurden die Schnitte jeweils mit der PBS/Tween20 Lösung für 3 × 2 Minuten gespült. Eine endogene Peroxidase, die neben der HRP zu Reaktionen und damit zu falsch positiven Anfärbungen führen würde, wurde mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibiert: Dazu wurde 150 µl eines Gemisches aus 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS auf die Schnitte gegeben und für 10 min inkubiert. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Proben mit der im Kit vorhandenen Blockierlösung (3 Tropfen) für 10 min behandelt. Es folgte nun die Inkubation zunächst mittels 150 µl des Primärantikörpers pro Schnitt für 60 min. Anschließend wurden 3 Tropfen des biotinylierten Sekundärantikörpers für 15 min auf die Schnitte gegeben. Es folgte das Betropfen mit dem Enzymkonjugat (3 Tropfen) und die Inkubation für 30 Minuten. Zum Schluss wurden je 4 Tropfen des DAB Substrates auf die Schnitte gegeben und für 7,5 min im Dunkeln inkubiert, bis der bräunliche Farbumschlag sichtbar wurde. Dann wurden die Proben für 5 min in Aqua dest. gespült, für 15 Sekunden mit Mayers Hämalaun gefärbt und für 15 min unter fließendem Wasser gewaschen. Abschließend erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 1 min in 70 % Ethanol, 80 % Ethanol und 99 % Ethanol, die Inkubation mit Xylol für 2 min und das Eindeckeln mittels Corbit. Die Schnitte wurden luftgetrocknet.

#### **2.2.8.3 Antikörperkonzentration und Kontrollen**

In allen Versuchen wurde nach vorheriger Testung verschiedener Versuchsbedingungen und Verdünnungen mit einer Verdünnung von 1:250 gearbeitet. Da der verwendete monoklonale Antikörper STAT3α (D1A5) XP Rabbit in einer Konzentration von 80 µg/ml vorlag, wurde bei einer Verdünnung von 1:250 durch Zugabe von Antibody diluent auf eine Konzentration von 0,32 µg/ml verdünnt. Als Negativkontrollen wurden Gewebeschnitte verwendet, die mit der Isotyp Kontrolle Rabbit X0903 von Daco in gleicher Konzentration behandelt wurden. Unspezifische Färbungen konnten nicht nachgewiesen werden. Als Positivkontrollen wurden

Schnitte von Colonkarzinom und Tonsillengewebe verwendet, in denen sich eine starke STAT3 Expression zeigte.

#### 2.2.8.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mittels des von Remmele und Stegner etablierten *Immunreactive Score* (IRS), wobei die Färbeintensität und der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Zellen miteinander in Verbindung gebracht wurden, siehe Tabelle 19 (Remmele and Stegner, 1987). Es wurden jeweils ein IRS- Wert für die Zellkerne und für das Zytoplasma gebildet und getrennt voneinander ausgewertet. Bei Vorhandensein zweier Stansen wurde der Mittelwert gebildet.

Tabelle 19: IRS Score

| <b>Färbeintensität</b><br><b>Anteil</b><br><b>der pos.</b><br><b>gefärbten Zellen</b> | <b>keine</b><br><b>Farbreaktion</b> | <b>schwache</b><br><b>Farbreaktion</b> | <b>mäßige</b><br><b>Farbreaktion</b> | <b>starke</b><br><b>Farbreaktion</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>keine positiven Zellen</b><br><b>= 0 Punkte</b>                                    | IRS = 0                             | IRS = 0                                | IRS = 0                              | IRS = 0                              |
| <b>&lt;10 % positive Zellen</b><br><b>= 1 Punkt</b>                                   | IRS = 0                             | IRS = 1                                | IRS = 2                              | IRS = 3                              |
| <b>10 - 50 % positive Zellen</b><br><b>= 2 Punkte</b>                                 | IRS = 0                             | IRS = 2                                | IRS = 4                              | IRS = 6                              |
| <b>51 - 80 % positive Zellen</b><br><b>= 3 Punkte</b>                                 | IRS = 0                             | IRS = 3                                | IRS = 6                              | IRS = 9                              |
| <b>&gt; 80 % positive Zellen</b><br><b>= 4 Punkte</b>                                 | IRS = 0                             | IRS = 4                                | IRS = 8                              | IRS = 12                             |

#### 2.2.9 Statistische Auswertung

##### 2.2.9.1 Mann-Whitney-U Test

Der Mann-Whitney-U Test als ein nichtparametrischer statistischer Test wurde angewendet, da dessen Benutzung sich bei Vorhandensein von Messwerten ohne Normalverteilung, kleiner Gesamtstichprobe und unabhängiger Stichproben eignet. Mit ihm lassen sich zwei Gruppen dahingehend vergleichen, ob sie sich in bestimmten Werten statistisch signifikant voneinander unterscheiden (Hemmerich, o. J.).

Bei der Auswertung der Immunhistochemie wurden zum einen die IRS Werte der Normalgewebe mit den IRS Werten der Tumorgewebe verglichen und mittels Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterschiede überprüft. Zum anderen wurden die Tumor IRS Werte bezogen auf die Ausprägung bestimmter klinisch-pathologischer Parameter miteinander verglichen.

Zudem wurde der Mann-Whitney-U Test bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse des BrdU-Assays, des Westernblots sowie der PCR verwendet um signifikante Unterschiede der Zellproliferation (BrdU-Assay), der Proteinexpression (Westernblot) oder der Expression eines Zielgenes (PCR) zwischen den mit Niclosamid behandelten Proben und Kontrollen zu identifizieren.

P-Werte unter dem Schwellenwert 0,05 galten dabei als statistisch signifikant, womit eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % angenommen wurde.

#### **2.2.9.2 Chi-Quadrat-Test und Fisher`s exact Test**

Um eine Einordnung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung zu ermöglichen, erfolgte eine Kategorisierung der GEP-NEN entsprechend ihrer STAT3 Expression in hoch und niedrig exprimierende Neoplasien. Die Einteilung erfolgte entsprechend des Medians des STAT3 IRS. Zur Analyse von Zusammenhängen dieser kategorialen Daten mit klinisch-pathologischen Parametern wurden entweder der Chi-Quadrat Test oder der Fisher`s exact Test angewendet. Folgende Voraussetzungen waren für den Chi-Quadrat Test zu erfüllen: Der Wert der erwarteten Werte sollte in 80 % 5 oder mehr betragen, kein Erwartungswert sollte unter 1 betragen und der Stichprobenumfang sollte mindestens 20 sein (McHugh, 2013). Wurden diese Kriterien nicht erfüllt, so wurde der Fisher`s exact Test durchgeführt.

#### **2.2.9.3 Überlebensanalysen**

Für die Überlebensanalysen wurde zunächst das Gesamtüberleben der Patienten bestimmt, welches definiert wurde als Periode vom Zeitpunkt der Operation bis zum letzten Tag des Follow-Up beziehungsweise bis zum Todeszeitpunkt. Patienten, die innerhalb der ersten 30 Tage nach der Operation verstarben, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Im Rahmen der univariaten Analyse wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und die Überlebenszeiten mit Hilfe des log-rank (Mantel Cox) –Tests verglichen. *Hazard Ratios* (HR) mit einem Konfidenzintervall von 95 % wurden errechnet. Die multivariate Überlebensanalyse schloss alle untersuchten Variablen ein und wurde mittels Cox-Regression erstellt.

Um potenzielle Auswirkungen der STAT3 Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten zu untersuchen, wurden die Gewebeproben entsprechend ihres IRS-Wertes in die Gruppen hohe STAT3 Expression und niedrige STAT3 Expression kategorisiert. Als Cutoff-Wert für die Einteilung in hohe und niedrige STAT3 Expression wurde wie zuvor beschrieben der Median der IRS-Werte verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression und Bedeutung von STAT3 in Gewebeproben von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN)

Für die Untersuchung der Bedeutung von STAT3 im Tumorgewebe wurde zunächst die Expression von STAT3 $\alpha$  in Tumor- und Normalgewebe mittels immunhistochemischer Färbung untersucht und verglichen. Die Expression von STAT3 $\alpha$  wurde dann mit verschiedenen klinisch-pathologischen Faktoren der Tumorproben des Patientenkollektivs und dem Überleben der Patienten in Korrelation gesetzt, um die prognostische Wertigkeit von STAT3 in neuroendokrinen Neoplasien zu analysieren.

##### 3.1.1 Patientenkollektiv

Es wurden die Gewebeproben neuroendokriner Neoplasien von 65 Patienten analysiert. Neben Proben aus den Primärtumoren (61) befanden sich auch Stenzen aus Lymphknotenmetastasen (16) und Fernmetastasen (12) auf den TMAs. Tabelle 20 gibt eine Übersicht zum einen über die Charakteristika der Patienten, bei deren Operationen die Tumorproben entnommen wurden und zum anderen die Tumoreigenschaften. Bei einem Patienten fehlte die Angabe zum Lymphknotenbefall N. Für die statistischen Analysen wurden die Daten jeweils in zwei Gruppen zusammengefasst. Merkmale waren das Alter, die Primärtumorausbreitung, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, das Vorhandensein von Fernmetastasen, der Resektionsstatus und der Differenzierungsgrad entsprechend der WHO-Klassifikation von 2010 (siehe Abschnitt 1.1.2) in gut differenziert mit dem *Grading* 1 und 2 und schlecht differenziert mit dem *Grading* 3.

**Tabelle 20: Patientencharakteristika der verwendeten TMA Proben**

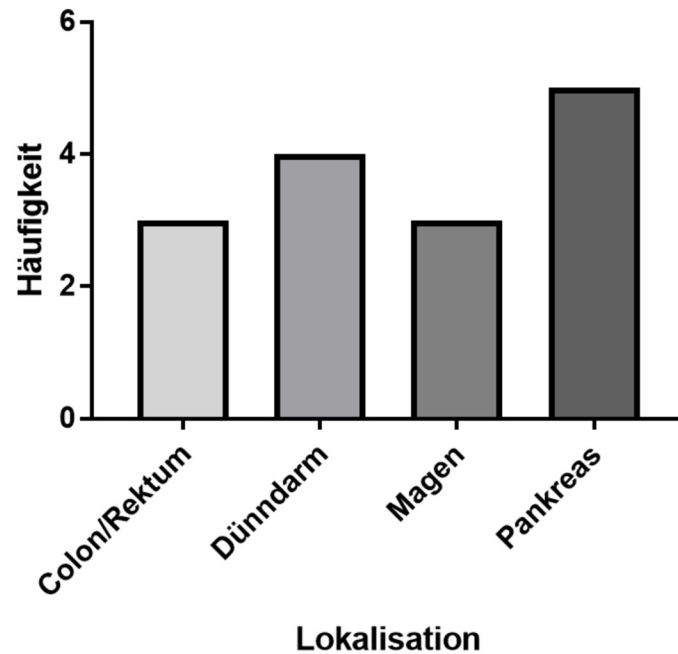
| Merkmal                  | Anzahl Patienten (%) |
|--------------------------|----------------------|
| Total                    | 65 (100)             |
| Alter bei Operation      |                      |
| ≤ Median (64)            | 33 (50,8)            |
| > Median (64)            | 32 (49,2)            |
| Geschlecht               |                      |
| männlich                 | 33 (50,8)            |
| weiblich                 | 32 (49,2)            |
| Primärtumorausbreitung T |                      |
| T1 + T2                  | 31 (47,7)            |
| T3 + T4                  | 34 (52,3)            |
| Lymphknotenmetastasen N  |                      |
| N0                       | 32 (49,2)            |
| N1 - N3                  | 32 (49,2)            |
| NX                       | 1 (1,5)              |
| Fernmetastasen M         |                      |
| M0                       | 42 (64,6)            |
| M1                       | 32 (35,4)            |

| Resektion R           |           |
|-----------------------|-----------|
| R0                    | 56 (86,2) |
| R1 + R2               | 9 (13,8)  |
| Grading G             |           |
| G1 + G2               | 52 (80,0) |
| G3                    | 13 (20,0) |
| Lokalisation          |           |
| Colon/Rektum          | 11 (16,9) |
| Dünndarm              | 14 (21,5) |
| Magen                 | 9 (13,8)  |
| Pankreas              | 31 (47,7) |
| Probenarten           |           |
| Primärtumorproben     | 61 (93,9) |
| Lymphknotenmetastasen | 16 (24,6) |
| Fernmetastasen        | 12 (18,5) |

Für die Expressionsanalysen wurden pro klinisch-pathologischer Variable zwei zu vergleichende Gruppen gebildet. Die Tabelle zeigt die Anzahl der zu diesen Gruppen gehörigen Proben des verwendeten Patientenkollektivs. In Klammern sind die Anteile in Prozent aufgelistet. T = Primärtumorausbreitung, N = Lymphknotenstatus, M = Fernmetastasen, G = *Grading*, R = Resektionsstatus

### 3.1.2 Vergleich der Expression von STAT3 zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe

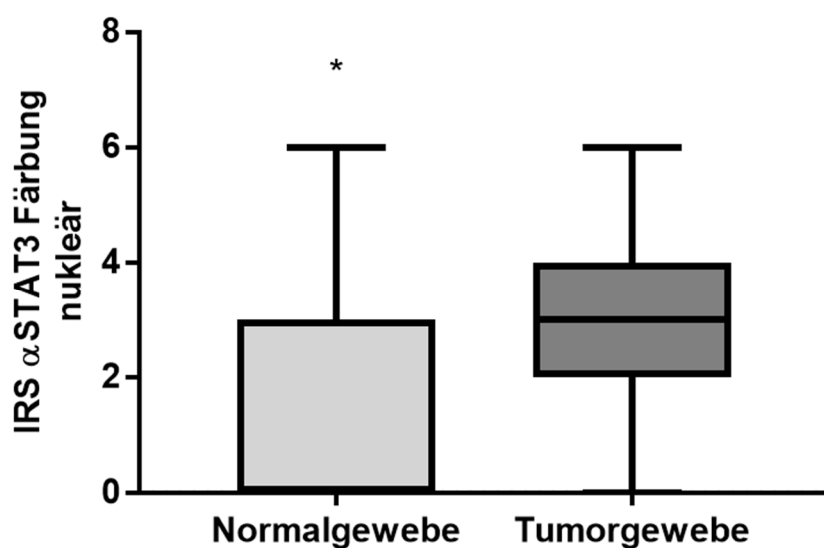
Zunächst wurde die STAT3 $\alpha$  Expression zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe verglichen. Hierzu wurde die STAT3 Expression in 15 Tumorproben mit korrespondierenden Normalgewebeproben verglichen, die aus den tumorfreien Absetzungsrändern gewonnen wurden. Je Primärtumorlokalisation wurden 3 bis 5 Patienten ausgewählt. Die Auswahl unterlag dem Zufallsprinzip. Die Färbungen wurden durch Bestimmung des IRS verglichen. Hierbei wurde jeweils der IRS Wert für die zytoplasmatische und nukleäre STAT3 Expression gesondert bestimmt.



**Abb. 7: Anzahl und Ursprung der verwendeten Proben**

Für den Vergleich zwischen Normal- zu Tumorgewebe wurden insgesamt 15 Proben ausgewählt und bezüglich der Expression von STAT3 analysiert

In den untersuchten Stichproben ergab sich ein signifikanter Unterschied für die nukleäre STAT3 Expression. Die IRS Werte waren im Tumor (Median = 3) signifikant höher als im Normalgewebe (Median = 0) ( $p = 0,048$ ). Im Nukleus der Tumorgewebe zeigte sich also eine stärkere Expression von STAT3 $\alpha$  als im Normalgewebe (Abb. 8). In Abb. 9 sind repräsentative Aufnahmen der Färbungen jeweils einer Tumorlokalisierung dargestellt.

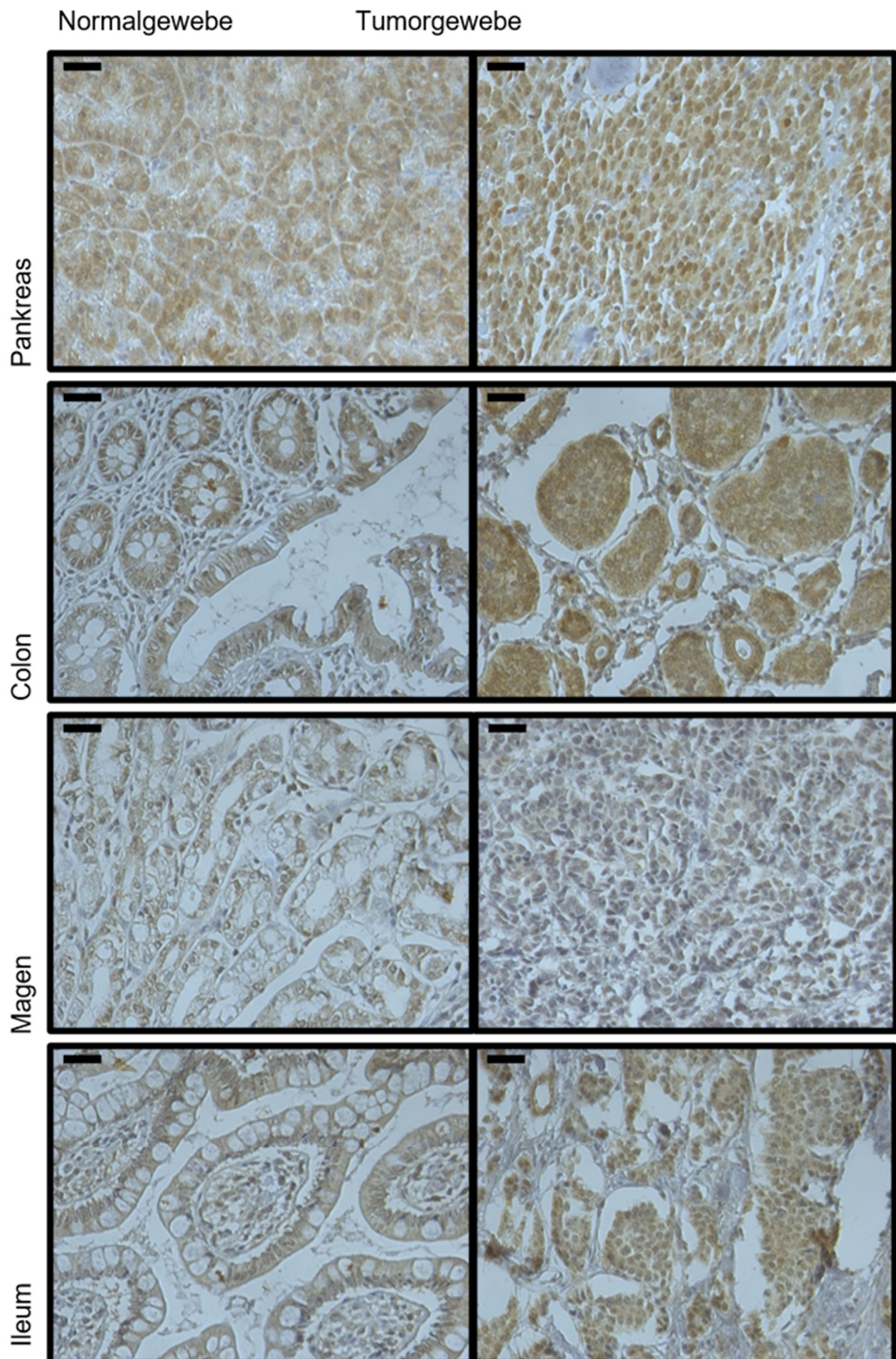


**Abb. 8: Immunhistochemie - STAT3 $\alpha$  Expression in Normal- und Tumorgewebe**

Dargestellt sind die IRS Werte der Proben aus Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe nach immunhistochemischer Anfärbung der  $\alpha$  Isoform von STAT3. Mittels *Box plots* sind Median, das obere



und untere Quartil sowie das Probenmaximum und -minimum dargestellt. Die Signifikanzmessung erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \* kennzeichnet einen p-Wert  $< 0,05$ .



**Abb. 9: Immunhistochemie - STAT3α Expression in Normal- und Tumorgewebe**

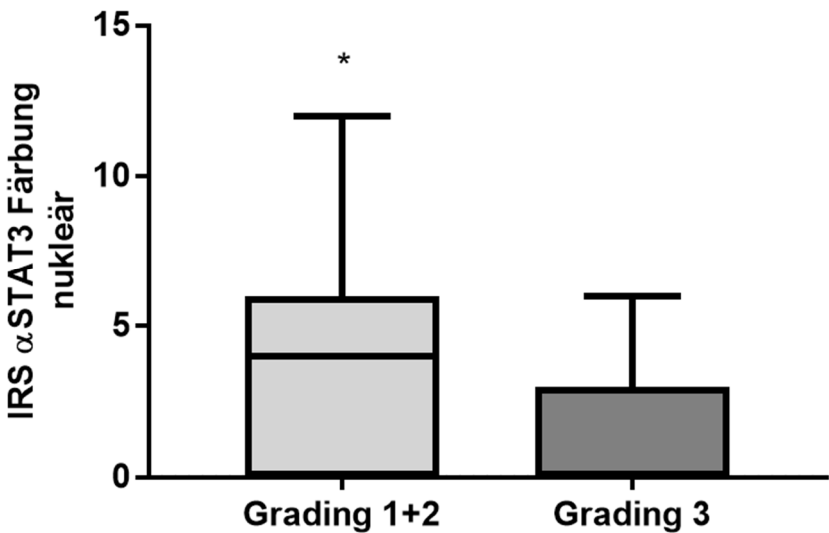
Repräsentative lichtmikroskopische Detailaufnahmen immunhistochemischer Färbungen in 40-facher Vergrößerung von Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben nach immunhistochemischer Anfärbung der α Isoform von STAT3. Die STAT3α Färbung erscheint bräunlich. Der Balken in der oberen linken Ecke entspricht 25 µm.

Bei der zytoplasmatischen STAT3α Expression konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe feststellen.

**3.1.3 Korrelation der Expression von STAT3 mit klinisch-pathologischen Faktoren**

Um mögliche Assoziationen der STAT3 Expression in GEP-NEN mit klinisch-pathologischen Parametern zu identifizieren, wurden zunächst die IRS Werte zwischen den einzelnen Kategorien jedes Parameters mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test verglichen (Tab. 21).

Patienten mit einem guten und mäßigen *Grading* (G1 und G2) zeigten in den Primärtumorseiten eine signifikant höhere Expression von STAT3α im Nukleus als solche mit einem schlechten *Grading* (G3) (p = 0,019) (Abb. 10; Tab. 21).



**Abb. 10: Immunhistochemie - nukleäres STAT3α weist eine signifikant höhere Expression in G1/2-NEN auf als in G3-NEN**

Dargestellt sind die gemessenen IRS Werte der Primärtumorseiten nach immunhistochemischer Anfärbung der α Isoform von STAT3. Mittels *Box plots* sind Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und -minimum dargestellt. Die Signifikanzmessung erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \* kennzeichnet einen p-Wert < 0,05.

**Tabelle 21: IRS Werte der Primärtumorseiten und Assoziation der STAT3α Expression mit klinisch-pathologischen Variablen**

| Merkmal | Primärtumorseiten                     |            |         |                                          |            |         |
|---------|---------------------------------------|------------|---------|------------------------------------------|------------|---------|
|         | IRS Wert/STAT3α Expression im Nukleus |            |         | IRS Wert/STAT3α Expression im Zytoplasma |            |         |
|         | Median                                | Mittelwert | p- Wert | Median                                   | Mittelwert | p- Wert |
|         |                                       |            |         |                                          |            |         |

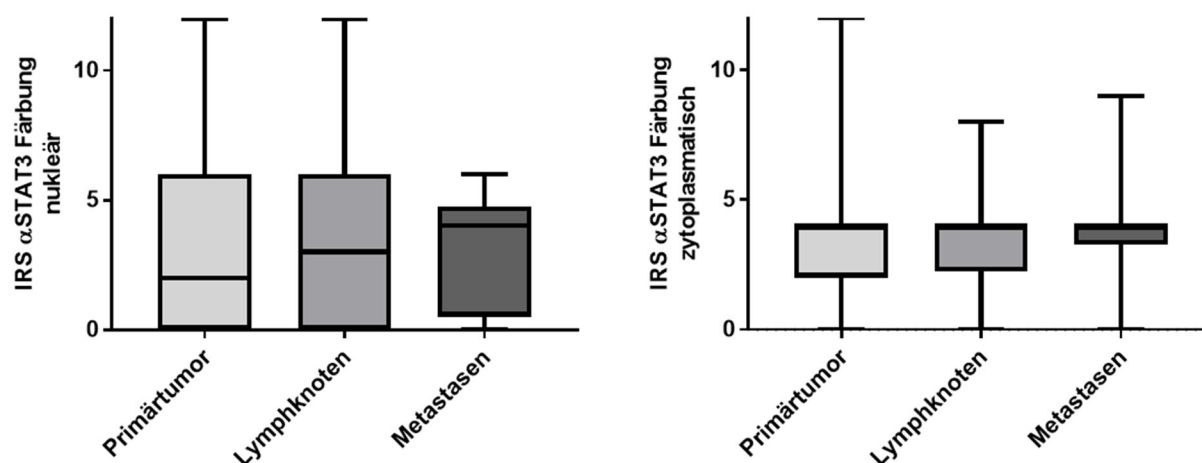


| Alter bei Operation      |      |       |                |      |      |       |
|--------------------------|------|-------|----------------|------|------|-------|
| ≤ Median (64)            | 4,00 | 3,87  | 0,171          | 4,00 | 3,90 | 0,272 |
| > Median (64)            | 1,00 | 2,58  |                | 4,00 | 3,23 |       |
| Geschlecht               |      |       |                |      |      |       |
| männlich                 | 2,00 | 3,32  | 0,863          | 4,00 | 5,25 | 0,171 |
| weiblich                 | 2,00 | 3,10  |                | 3,50 | 3,37 |       |
| Primärtumorausbreitung T |      |       |                |      |      |       |
| T1 + T2                  | 4,00 | 4,04  | 0,061          | 4,00 | 4,00 | 0,180 |
| T3 + T4                  | 0,00 | 2,52  |                | 3,96 | 3,21 |       |
| Lymphknotenmetastasen N  |      |       |                |      |      |       |
| N0                       | 4,00 | 4,00  | 0,089          | 4,00 | 4,00 | 0,301 |
| N1 - N3                  | 1,00 | 2,48  |                | 3,81 | 3,28 |       |
| Fernmetastasen M         |      |       |                |      |      |       |
| M0                       | 4,00 | 3,62  | 0,254          | 4,00 | 4,00 | 0,510 |
| M1                       | 2,00 | 2,43  |                | 3,65 | 3,38 |       |
| Resektion R              |      |       |                |      |      |       |
| R0                       | 2,00 | 3,00  | 0,251          | 4,00 | 4,00 | 0,416 |
| R1 + R2                  | 4,00 | 4,630 |                | 3,38 | 4,75 |       |
| Grading G                |      |       |                |      |      |       |
| G1 + G2                  | 4,00 | 3,71  | <b>0,019 *</b> | 4,00 | 4,00 | 0,069 |
| G3                       | 0,00 | 1,38  |                | 3,85 | 2,46 |       |

Die Tabelle zeigt die jeweiligen Mediane und Mittelwerte der IRS Werte in Abhängigkeit der klinisch-pathologischen Variablen. Die Signifikanzmessung erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \* kennzeichnet einen p-Wert < 0,05.

Bei der zytoplasmatischen STAT3α Expression konnten wir keine signifikante Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern feststellen, siehe Tabelle 21. Auch bei der Analyse der STAT3 Expression in Proben aus Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen konnten wir keine Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern feststellen.

Beim Vergleich der STAT3-IRS Werte von Primärtumorproben, Lymphknotenproben und Metastasenproben untereinander zeigte sich sowohl in der nukleären als auch in der zytoplasmatischen Expression von STAT3α kein signifikanter Unterschied, siehe Abb. 11 und Tabelle 22.



**Abb. 11. Immunhistochemie - STAT3 $\alpha$  Expression in Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen**

Dargestellt sind die gemessenen IRS Werte aller Proben von Primärtumor, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen nach immunhistochemischer Anfärbung der  $\alpha$  Isoform von STAT3. Mittels *Box plots* sind Median, das obere und untere Quartil sowie das Probenmaximum und -minimum dargestellt. Die Signifikanzmessung erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \* kennzeichnet einen p-Wert < 0,05.

**Tabelle 22: IRS Werte aller Proben von Primärtumor, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen und Vergleich untereinander**

|                                         | IRS Wert/STAT3 $\alpha$<br>Expression im Nukleus |            |         | IRS Wert/STAT3 $\alpha$<br>Expression im Zytoplasma |            |       |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|------------|---------|-----------------------------------------------------|------------|-------|
|                                         | Median                                           | Mittelwert | p- Wert | Median                                              | Mittelwert |       |
| Primärtumorproben vs. Lymphknotenproben |                                                  |            |         |                                                     |            |       |
| Primärtumorproben                       | 2,00                                             | 3,21       | 0,613   | 4,00                                                | 3,56       | 0,603 |
| Lymphknotenproben                       | 3,00                                             | 3,69       |         | 4,00                                                | 4,06       |       |
| Primärtumorproben vs. Metastasenproben  |                                                  |            |         |                                                     |            |       |
| Primärtumorproben                       | 2,00                                             | 3,21       | 0,854   | 4,00                                                | 3,56       | 0,936 |
| Metastasenproben                        | 4,00                                             | 3,04       |         | 4,00                                                | 3,58       |       |
| Lymphknotenproben vs. Metastasenproben  |                                                  |            |         |                                                     |            |       |
| Lymphknotenproben                       | 3,00                                             | 3,69       | 0,794   | 4,00                                                | 4,06       | 0,461 |
| Metastasenproben                        | 4,00                                             | 3,04       |         | 4,00                                                | 3,58       |       |

Die Tabelle zeigt die jeweiligen Mediane und Mittelwerte der IRS Werte in Abhängigkeit ihres Ursprungsgewebes. Die Signifikanzmessung erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test.

In einem weiteren Schritt wurden die Proben anhand des STAT3 $\alpha$  Expressionslevels in Neoplasien mit niedriger und hoher Expression kategorisiert. Als Cut off-Wert wurde jeweils der Median des STAT3 $\alpha$  IRS verwendet. Wie zuvor beschrieben erfolgte eine gesonderte Analyse für die nukleäre und zytoplasmatische STAT3 $\alpha$  Expression sowie für Primärtumor-, Lymphknotenmetastasen- und sonstiges Metastasengewebe. Zur Analyse dieser kategorialen Daten wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Erfüllten die Stichproben die Voraussetzungen für den Qui-Quadrat-Test jedoch nicht, so wurde der Fisher's exact Test durchgeführt (siehe 2.2.9.2).

**Tabelle 23: Kategorisierung der Proben in Expressionsgruppen**

| Untersuchte TMA Probe               | Expressionsgruppe<br>niedrige Expression<br>(Gruppe 0) | Expressionsgruppe<br>niedrige Expression<br>(Gruppe 1) |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Nukleus Primärtumor                 | IRS 0-2                                                | IRS > 2                                                |
| Nukleus Fernmetastasen              | IRS 0-4                                                | IRS > 4                                                |
| Nukleus<br>Lymphknotenmetastasen    | IRS 0-3                                                | IRS > 3                                                |
| Zytoplasma Primärtumor              | IRS 0-4                                                | IRS > 4                                                |
| Zytoplasma Fernmetastasen           | IRS 0-4                                                | IRS > 4                                                |
| Zytoplasma<br>Lymphknotenmetastasen | IRS 0-4                                                | IRS > 4                                                |

Die Einteilung der Expressionsgruppen erfolgte nach Median der IRS Werte.

Wie bei der vorhergehenden Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test zeigte sich auch nach Kategorisierung ein signifikanter Zusammenhang der nukleären STAT3 $\alpha$  Expression im Primärtumor mit dem Tumorgrading ( $p = 0,046$ ), (Tabelle 24), wobei eine hohe STAT3 $\alpha$  Expression mit einem guten Grading (G1 und G2) assoziiert war. Zudem konnte im Rahmen dieser Analysen ein Zusammenhang der zytoplasmatischen STAT3 $\alpha$  Expression im Primärtumor mit dem Alter der Patienten festgestellt werden. Dabei war eine hohe STAT3 $\alpha$  Expression mit jungen Patienten assoziiert ( $p = 0,046$ ). Für die weiteren klinisch-pathologischen Parameter zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang mit der STAT3 $\alpha$  Expression.

**Tabelle 24: Korrelation zwischen STAT3 $\alpha$  Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen in Primärtumorproben**

| Merkmal                  | Primärtumorproben            |                       |                                  |                                 |                       |                                  |
|--------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
|                          | STAT3α Expression im Nukleus |                       |                                  | STAT3α Expression im Zytoplasma |                       |                                  |
|                          | niedrig<br>n = 32<br>(%)     | hoch<br>n = 29<br>(%) | p- Wert<br>Qui-Quadr<br>Fisher`s | niedrig<br>n = 49<br>(%)        | hoch<br>n = 12<br>(%) | p- Wert<br>Qui-Quadr<br>Fisher`s |
| Alter bei Operation      |                              |                       |                                  |                                 |                       |                                  |
| ≤ Median (64)            | 14 (44)                      | 16 (55)               | 0,373                            | 21 (43)                         | 9 (75)                | <b>0,046 *</b>                   |
| > Median (64)            | 18 (56)                      | 13 (45)               |                                  | 28 (57)                         | 3 (25)                |                                  |
| Geschlecht               |                              |                       |                                  |                                 |                       |                                  |
| männlich                 | 16 (50)                      | 15 (52)               | 0,893                            | 22 (45)                         | 9 (75)                | 0,062                            |
| weiblich                 | 16 (50)                      | 14 (48)               |                                  | 27 (55)                         | 3 (25)                |                                  |
| Primärtumorausbreitung T |                              |                       |                                  |                                 |                       |                                  |
| T1 + T2                  | 12 (37,5)                    | 16 (55)               | 0,167                            | 20 (41)                         | 8 (67)                | 0,107                            |
| T3 + T4                  | 20 (62,5)                    | 13 (45)               |                                  | 29 (59)                         | 4 (33)                |                                  |

| Lymphknotenmetastasen N |         |         |                |         |         |       |
|-------------------------|---------|---------|----------------|---------|---------|-------|
| N0                      | 13 (42) | 18 (62) |                | 23 (48) | 8 (67)  |       |
| N1 - N3                 | 18 (58) | 11 (38) | 0,119          | 25 (52) | 4 (33)  | 0,245 |
| Fernmetastasen M        |         |         |                |         |         |       |
| M0                      | 19 (59) | 21 (72) |                | 31 (63) | 9 (75)  |       |
| M1                      | 13 (41) | 8 (28)  | 0,284          | 18 (37) | 3 (25)  | 0,518 |
| Resektion R             |         |         |                |         |         |       |
| R0                      | 29 (91) | 24 (83) |                | 43 (88) | 10 (83) |       |
| R1 + R2                 | 3 (9)   | 5 (17)  | 0,46           | 6 (12)  | 2 (17)  | 0,650 |
| Grading G               |         |         |                |         |         |       |
| G1 + G2                 | 22 (69) | 26 (90) |                | 37 (76) | 11 (92) |       |
| G3                      | 10 (31) | 3 (10)  | <b>0,046 *</b> | 12 (25) | 1 (8)   | 0,432 |

Statistische Auswertung der Korrelation der STAT3 $\alpha$  Expression zu klinisch-pathologischen Parametern. Die Korrelation wurde mittels Qui-Quadrat Test analysiert. Werden die folgenden Voraussetzungen nicht erfüllt, wurde der Fisher's exact Test durchgeführt: 1. Mindestens 80 % der Zellen haben eine erwartete Häufigkeit von 5 oder größer als 5. 2. Kein Erwartungswert sollte unter 1 betragen. 3. Der Stichprobenumfang sollte mindestens 20 sein. p-Wert als Signifikanzwert. \*\* kennzeichnet einen p-Wert < 0,01, \* einen p-Wert < 0,05.

Zwischen der STAT3 $\alpha$  Expression in Lymphknotenmetastasen- und sonstigen Metastasenproben und klinisch-pathologischen Parametern konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden, siehe Tabelle 25 und Tabelle 26.

**Tabelle 25: Korrelation zwischen STAT3 $\alpha$  Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen in Fernmetastasenproben**

| Merkmal                  | Metastasenproben                     |                   |                     |                                         |                   |                     |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------------------|-------------------|---------------------|
|                          | STAT3 $\alpha$ Expression im Nukleus |                   |                     | STAT3 $\alpha$ Expression im Zytoplasma |                   |                     |
|                          | niedrig<br>n = 9 (%)                 | hoch<br>n = 3 (%) | p- Wert<br>Fisher's | niedrig<br>n = 10 (%)                   | hoch<br>n = 2 (%) | p- Wert<br>Fisher's |
| Alter bei Operation      |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| ≤ Median (64)            | 6 (67)                               | 1 (33)            |                     | 6 (60)                                  | 1 (50)            |                     |
| > Median (64)            | 3 (33)                               | 2 (67)            | 0,523               | 4 (40)                                  | 1 (50)            | 1,000               |
| Geschlecht               |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| männlich                 | 4 (44)                               | 0 (0)             |                     | 4 (40)                                  | 0 (0)             |                     |
| weiblich                 | 5 (56)                               | 3 (100)           | 0,491               | 6 (60)                                  | 2 (100)           | 0,515               |
| Primärtumorausbreitung T |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| T1 + T2                  | 6 (67)                               | 0 (0)             |                     | 6 (60)                                  | 0 (0)             |                     |
| T3 + T4                  | 3 (33)                               | 3 (100)           | 0,182               | 4 (40)                                  | 2 (100)           | 0,455               |
| Lymphknotenmetastasen N  |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| N0                       | 5 (56)                               | 0 (0)             |                     | 5 (50)                                  | 0 (0)             |                     |
| N1 - N3                  | 4 (44)                               | 3 (100)           | 0,205               | 5 (50)                                  | 2 (100)           | 0,470               |

| Resektion R |        |         |       |        |         |       |
|-------------|--------|---------|-------|--------|---------|-------|
| R0          | 6 (67) | 2 (67)  |       | 6 (60) | 2 (100) |       |
| R1 + R2     | 3 (33) | 1 (33)  | 1,000 | 4 (40) | 0 (0)   | 0,515 |
| Grading G   |        |         |       |        |         |       |
| G1 + G2     | 7 (78) | 3 (100) |       | 8 (80) | 2 (100) |       |
| G3          | 2 (22) | 0 (0)   | 1,000 | 2 (20) | 0 (0)   | 1,000 |

Statistische Auswertung der Korrelation der STAT3 $\alpha$  Expression zu klinisch-pathologischen Parametern. Da die Stichprobengröße von 12 die Voraussetzungen für den Qui-Quadrat Test nicht erfüllt, wurde der Fisher's exact Test durchgeführt. p-Wert als Signifikanzwert. \*\* kennzeichnet einen p-Wert < 0,01, \* einen p-Wert < 0,05.

**Tabelle 26: Korrelation zwischen STAT3 $\alpha$  Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen in Lymphknotenmetastasenproben**

| Merkmal                  | Lymphknotenproben                    |                   |                     |                                         |                   |                     |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------------------|-------------------|---------------------|
|                          | STAT3 $\alpha$ Expression im Nukleus |                   |                     | STAT3 $\alpha$ Expression im Zytoplasma |                   |                     |
|                          | niedrig<br>n = 8 (%)                 | hoch<br>n = 8 (%) | p- Wert<br>Fisher's | niedrig<br>n = 13 (%)                   | hoch<br>n = 3 (%) | p- Wert<br>Fisher's |
| Alter bei Operation      |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| ≤ Median (64)            | 4 (50)                               | 4 (50)            |                     | 5 (38,5)                                | 3 (100)           |                     |
| > Median (64)            | 4 (50)                               | 4 (50)            | 1,0                 | 8 (61,5)                                | 0 (0)             | 0,200               |
| Geschlecht               |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| männlich                 | 1 (12,5)                             | 3 (37,5)          |                     | 3 (23)                                  | 1 (33)            |                     |
| weiblich                 | 7 (87,5)                             | 5 (62,5)          | 0,569               | 10 (77)                                 | 2 (67)            | 1,000               |
| Primärtumorausbreitung T |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| T1 + T2                  | 1 (12,5)                             | 3 (37,5)          |                     | 4 (31)                                  | 0 (0)             |                     |
| T3 + T4                  | 7 (87,5)                             | 5 (62,5)          | 0,569               | 9 (69)                                  | 3 (100)           | 0,529               |
| Fernmetastasen M         |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| M0                       | 1 (12,9)                             | 2 (25)            |                     | 2 (15)                                  | 1 (33)            |                     |
| M1                       | 7 (87,5)                             | 6 (75)            | 1,000               | 11 (85)                                 | 2 (67)            | 0,489               |
| Resektion R              |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| R0                       | 5 (62,5)                             | 5 (62,5)          |                     | 7 (54)                                  | 3 (100)           |                     |
| R1 + R2                  | 3 (37,5)                             | 3 (37,5)          | 1,000               | 6 (46)                                  | 0 (0)             | 0,250               |
| Grading G                |                                      |                   |                     |                                         |                   |                     |
| G1 + G2                  | 8 (62,5)                             | 6 (75)            |                     | 8 (61,5)                                | 3 (100)           |                     |
| G3                       | 3 (37,5)                             | 2 (25)            | 1,000               | 5 (38,5)                                | 0 (0)             | 0,509               |

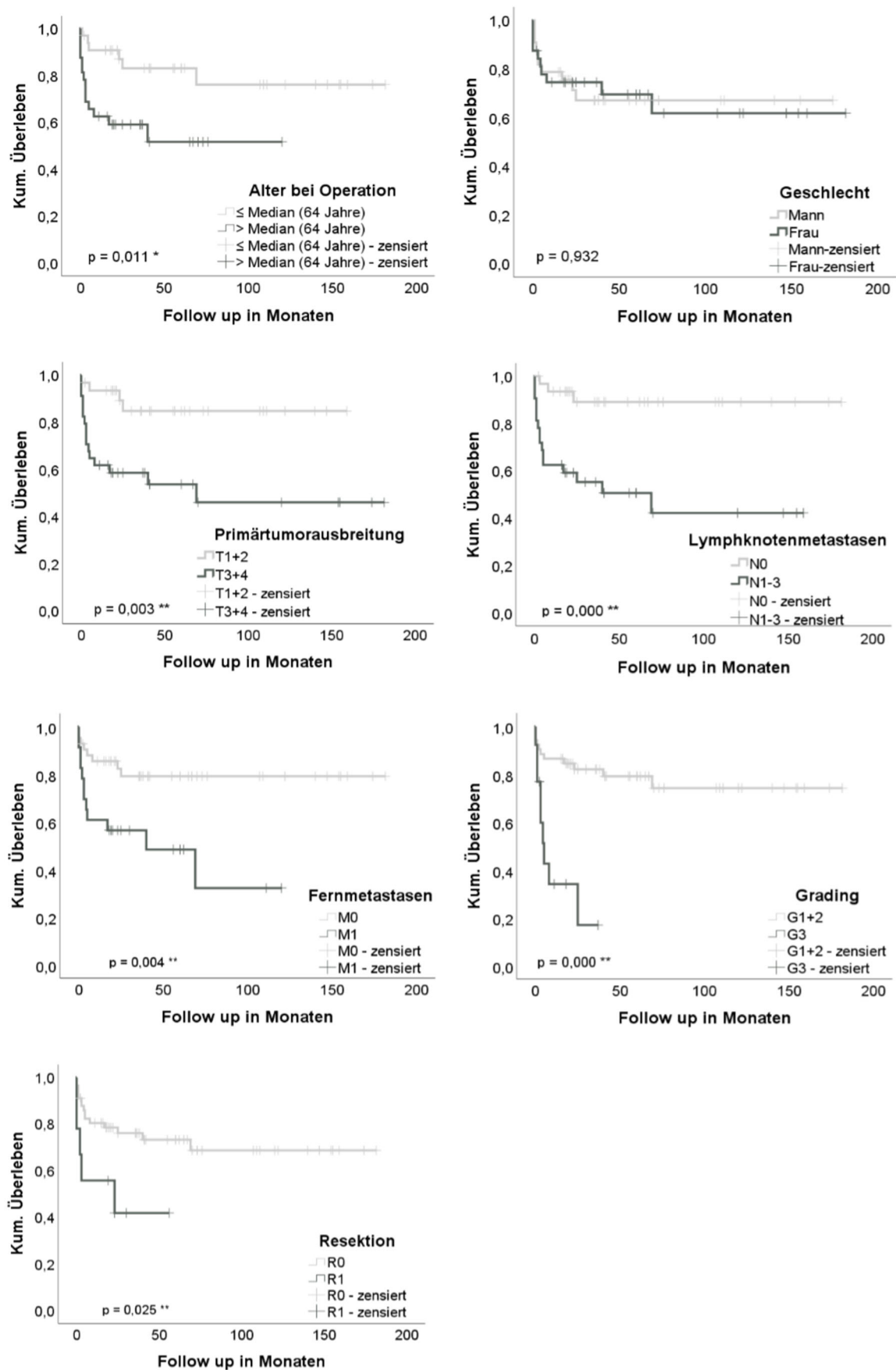
Statistische Auswertung der Korrelation der STAT3 $\alpha$  Expression zu klinisch-pathologischen Parametern. Da die Stichprobengröße von 16 die Voraussetzungen für den Qui-Quadrat Test nicht erfüllt, wurde der Fisher's exact Test durchgeführt. p-Wert als Signifikanzwert. \*\* kennzeichnet einen p-Wert < 0,01, \* einen p-Wert < 0,05.

### 3.1.4 Univariate Überlebensanalyse

Um prognoserelevante Faktoren in unserem Kollektiv von Patienten mit GEP-NEN zu identifizieren, wurde zunächst eine univariate Überlebensanalyse durchgeführt. Mit Hilfe des Kaplan-Meier-Verfahrens wurden die Überlebensraten bestimmt und graphisch ausgewertet. Anschließend wurde der Log-Rank-Test angewendet, um die Überlebenszeiten statistisch miteinander zu vergleichen. Zudem erfolgte die Berechnung der *Hazard Ratio* mit einem Konfidenzintervall (CI) von 95 %.

Das mittlere Gesamtüberleben betrug 122,21 Monate. Im Beobachtungszeitraum verstarben 20 Patienten.

Wie man an den in den in Abb. 12 dargestellten Kaplan-Meier Kurven und in Tabelle 27 sehen kann waren ein jüngeres Patientenalter, ein niedrigeres Primärtumorstadium, das Fehlen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen sowie ein gutes *Grading* und eine vollständige Tumorresektion mit einem besseren Gesamtüberleben der Patienten verbunden.



**Abb. 12: Kaplan-Meier-Kurven - univariate Überlebensanalyse bezogen auf klinisch-pathologische Parameter**

Univariate Überlebensanalyse bezogen auf klinisch-pathologische Parameter.

**Tabelle 27: Log-rank-Test - univariate Überlebensanalyse bezogen auf klinisch-pathologische Parameter und auf STAT3 $\alpha$  Expression**

| Variable/Merkmal                                                                                                | Mittelwert<br>mittlere<br>Überlebenszeit | Gesamtzahl | Anzahl<br>der<br>Ereignisse | zensiert | Signifikanz Log-rank-Test |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------|-----------------------------|----------|---------------------------|
|                                                                                                                 | Monate                                   |            |                             | Prozent  | p- Wert                   |
| Alter bei Operation                                                                                             |                                          |            |                             |          |                           |
| ≤ Median (64 Jahre)                                                                                             | 145,02                                   | 33         | 6                           | 81,8     | 0,011 *                   |
| > Median (64 Jahre)                                                                                             | 66,33                                    | 32         | 14                          | 56,3     |                           |
| Geschlecht                                                                                                      |                                          |            |                             |          |                           |
| männlich                                                                                                        | 119,84                                   | 33         | 10                          | 69,7     | 0,932                     |
| weiblich                                                                                                        | 120,22                                   | 32         | 10                          | 68,8     |                           |
| Primärtumorausbreitung T                                                                                        |                                          |            |                             |          |                           |
| T1+2                                                                                                            | 136,98                                   | 31         | 4                           | 87,1     | 0,003 **                  |
| T3+4                                                                                                            | 92,16                                    | 34         | 16                          | 52,9     |                           |
| Lymphknotenmetastasen N                                                                                         |                                          |            |                             |          |                           |
| N0                                                                                                              | 163,08                                   | 32         | 3                           | 90,6     | 0,000 **                  |
| N1 - N3                                                                                                         | 77,13                                    | 32         | 16                          | 50,0     |                           |
| Fernmetastasen M                                                                                                |                                          |            |                             |          |                           |
| M0                                                                                                              | 145,67                                   | 42         | 8                           | 81,0     | 0,004 **                  |
| M1                                                                                                              | 54,71                                    | 23         | 12                          | 47,8     |                           |
| Resektion R                                                                                                     |                                          |            |                             |          |                           |
| R0                                                                                                              | 130,00                                   | 56         | 15                          | 73,2     | 0,025 **                  |
| R1                                                                                                              | 27,08                                    | 9          | 5                           | 44,4     |                           |
| Grading G                                                                                                       |                                          |            |                             |          |                           |
| G1+2                                                                                                            | 140,42                                   | 52         | 11                          | 78,8     | 0,000 **                  |
| G3                                                                                                              | 12,75                                    | 13         | 9                           | 30,8     |                           |
| STAT3 Expression nukleär (alle TMA-Proben (= Primärtumorproben, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen))         |                                          |            |                             |          |                           |
| IRS ≤ 2                                                                                                         | 117,4                                    | 45         | 14                          | 68,9     | 0,948                     |
| IRS > 2                                                                                                         | 117,6                                    | 44         | 15                          | 65,9     |                           |
| STAT3 Expression zytoplasmatisch (alle TMA-Proben (= Primärtumorproben, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen)) |                                          |            |                             |          |                           |
| IRS ≤ 4                                                                                                         | 116,7                                    | 72         | 25                          | 65,3     | 0,240                     |
| IRS > 4                                                                                                         | 118,4                                    | 17         | 4                           | 76,5     |                           |
| Primärtumor-TMAs Nukleus                                                                                        |                                          |            |                             |          |                           |
| ≤ Median (IRS 2)                                                                                                | 105,11                                   | 32         | 12                          | 62,5     | 0,304                     |
| > Median (IRS 2)                                                                                                | 128,70                                   | 29         | 8                           | 72,4     |                           |
| Metastasen-TMAs Nukleus                                                                                         |                                          |            |                             |          |                           |
| ≤ Median (IRS 4)                                                                                                | 87,16                                    | 9          | 2                           | 77,8     | 0,601                     |
| > Median (IRS 4)                                                                                                | 80,00                                    | 3          | 1                           | 66,7     |                           |



| Lymphknoten-TMAs Nukleus    |        |    |    |      |                |
|-----------------------------|--------|----|----|------|----------------|
| ≤ Median (IRS 3)            | 16,30  | 8  | 6  | 25,0 |                |
| > Median (IRS 3)            | 97,25  | 8  | 3  | 62,5 | <b>0,048 *</b> |
| Primärtumor-TMAs Zytoplasma |        |    |    |      |                |
| ≤ Median (IRS 4)            | 117,30 | 49 | 17 | 65,3 |                |
| > Median (IRS 4)            | 117,33 | 12 | 3  | 75,0 | 0,326          |
| Lymphknoten-TMAs Zytoplasma |        |    |    |      |                |
| ≤ Median (IRS 4)            | 62,26  | 13 | 8  | 38,5 |                |
| > Median (IRS 4)            | 69,00  | 3  | 1  | 66,7 | 0,314          |

Univariate Überlebensanalyse bezogen auf klinisch-pathologische Parametern und STAT3α Färbung mittels Log-rank-Test. p-Wert als Signifikanzwert. \*\* kennzeichnet einen p-Wert < 0,01, \* einen p-Wert < 0,05.

Mittels Cox-Regression wurden zunächst für jede einzelne Variable die *Hazard Ratios* mit 95 % Konfidenzintervall errechnet, siehe Tabelle 28. Bei einem Alter zum Zeitpunkt der Operation von über 64 war das Risiko, an dem Tumor zu versterben, 3,25 -fach erhöht im Vergleich zu einem Alter von unter 64 Jahren. Bei einem T-Stadium von T3 oder T4 war das Sterberisiko 4,52 -fach erhöht. Bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen war das Sterberisiko 6,7 -fach erhöht, bei Vorliegen von Fernmetastasen war das Sterberisiko 3,4 -fach erhöht. Bei inkompletter Resektion des Tumors war das Risiko, an dem Tumor zu sterben, 3 -fach erhöht. Bei Neoplasien mit dem *Grading* 3 war das Risiko, zu versterben, 6,12 -fach erhöht.

Bei allen Werten bezüglich der STAT3α Färbung zeigten sich die p-Werte oberhalb des Signifikanzniveaus von 5 %.

**Tabelle 28: Cox-Regression - univariate Überlebensanalyse bezogen auf klinisch-pathologische Merkmale und auf STAT3α Expression**

| Variable/Merkmal                           | Hazard Ratio | Konfidenzintervall | Signifikanz      |
|--------------------------------------------|--------------|--------------------|------------------|
|                                            | HR           | CI                 | p-Wert           |
| Alter bei Operation                        |              |                    |                  |
| ≤ vs. > Median (64 Jahre)                  | 3,250        | 1,238 - 8,532      | <b>0,017 *</b>   |
| Geschlecht                                 |              |                    |                  |
| männlich vs. weiblich                      | 1,038        | 0,432 - 2,498      | 0,933            |
| Primärtumorausbreitung T                   |              |                    |                  |
| T1+2 vs. T3+4                              | 4,515        | 1,506 - 13,534     | <b>0,007 **</b>  |
| Lymphknotenmetastasen N                    |              |                    |                  |
| N0 vs. N1 - N3                             | 6,678        | 1,943 - 22,952     | <b>0,003 **</b>  |
| Fernmetastasen M                           |              |                    |                  |
| M0 vs. M1                                  | 3,407        | 1,386 - 8,378      | <b>0,008 **</b>  |
| Resektion R                                |              |                    |                  |
| R0 vs. R1                                  | 3,011        | 1,076 - 8,426      | <b>0,036 *</b>   |
| Grading G                                  |              |                    |                  |
| G1+2 vs. G3                                | 6,118        | 2,365 - 15,829     | <b>0,000 ***</b> |
| STAT3α Expression nukleär Primärtumor-TMAs |              |                    |                  |
| ≤ vs. > IRS 2                              | 0,630        | 0,256 - 1,549      | 0,314            |

| STAT3 $\alpha$ Expression nukleär Metastasen-TMAs          |       |                |       |
|------------------------------------------------------------|-------|----------------|-------|
| $\leq$ vs. $>$ IRS 4                                       | 1,881 | 0,169 - 20,909 | 0,607 |
| STAT3 $\alpha$ Expression nukleär Lymphknoten-TMAs         |       |                |       |
| $\leq$ vs. $>$ IRS 3                                       | 0,237 | 0,047 - 1,185  | 0,079 |
| STAT3 $\alpha$ Expression zytoplasmatisch Primärtumor-TMAs |       |                |       |
| $\leq$ vs. $>$ IRS 4                                       | 0,548 | 0,160 - 1,878  | 0,338 |
| STAT3 $\alpha$ Expression zytoplasmatisch Lymphknoten-TMAs |       |                |       |
| $\leq$ vs. $>$ IRS 4                                       | 0,367 | 0,045 - 2,964  | 0,347 |

Mittels Cox-Regression wurden jeweils für die Variablen und für die Färbungen einzeln betrachtet die *Hazard Ratios* mit den jeweiligen Konfidenzintervallen errechnet. Die Signifikanz wird mittels p-Wert angegeben. \* indiziert P-Wert  $\leq 0,05$ , \*\* indiziert P-Wert  $\leq 0,01$ , \*\*\* indiziert P-Wert  $\leq 0,001$

### 3.1.5 Multivariate Überlebensanalyse

Um die prognostische Wertigkeit bei Vorhandensein mehrerer Kriterien gleichzeitig zu testen, wurde mit den vorhandenen Daten eine multivariate schrittweise logistische Regression durchgeführt, siehe Tabelle 29. Eingeschlossen waren die Faktoren Alter bei Operation, Geschlecht, Primärtumorausbreitung, Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, Vorhandensein von Fernmetastasen, *Grading*, Resektionsausmaß, nukleäre STAT3 $\alpha$  Expression im Primärtumorgewebe, zytoplasmatische STAT3 $\alpha$  Expression im Primärtumorgewebe.

Bei der multivariaten Analyse erwiesen sich die Parameter Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, das *Grading* und das Alter als unabhängige prognostische Faktoren. Dabei zeigte sich der Parameter Lymphknotenmetastasen am prognostisch wichtigsten, gefolgt von dem Faktor des *Gradings* und des Patientenalters zum Zeitpunkt der Operation. Bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N1-3) zeigte sich ein 6,59 -fach erhöhtes Risiko, zu versterben, bei den hochproliferativen Tumoren (G3) ein 4,7 -fach erhöhtes Risiko, zu versterben und bei einem Altern von über 64 Jahren ein 2,71 -fach erhöhtes Risiko, zu versterben (Tabelle 29).

**Tabelle 29: Multivariate Überlebensanalyse nach schrittweiser Variablenauswahl**

| Variable/Merkmal                 | Hazard Ratio | Konfidenzintervall | Signifikanz     |
|----------------------------------|--------------|--------------------|-----------------|
|                                  | HR           | CI                 | p- Wert         |
| Alter                            |              |                    |                 |
| $\leq$ vs. $>$ Median (64 Jahre) | 2,706        | 1,004 - 7,290      | <b>0,049 *</b>  |
| Lymphknotenstatus N              |              |                    |                 |
| N0 vs. N1-3                      | 6,591        | 1,891 - 22,969     | <b>0,003 **</b> |
| <i>Grading</i> G                 |              |                    |                 |
| G1+2 vs. G3                      | 4,731        | 1,708 - 13,099     | <b>0,003 **</b> |

Mittels Cox-Regression wurden mittels vorwärts schrittweiser Methode die Variablen miteinander verglichen. p-Wert als Signifikanzwert. \*\* kennzeichnet einen p-Wert < 0,01, \* einen p-Wert < 0,05.

### **3.2 Expression und Inhibition von STAT3 in den Zelllinien NEC-DUE1-3**

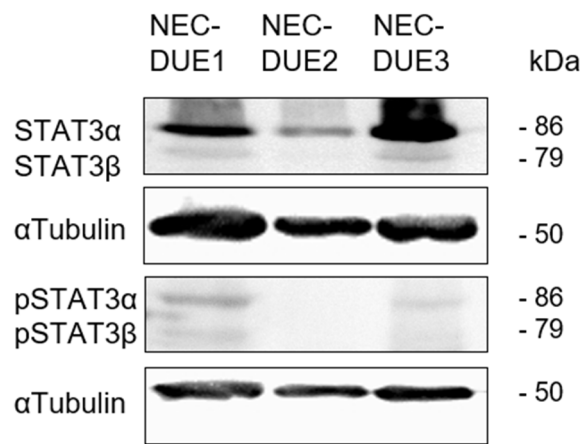
Um die Funktion und damit die Bedeutung von STAT3 und der mit STAT3 interferierenden Proteine in neuroendokrinen Karzinomen des gastroenteropankreatischen Systems auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden Zellkulturversuche durchgeführt. Dabei wurden die um die durch Krieg et al. etablierten GEP-NEC Zelllinien NEC-DUE1-3 verwendet.

Es wurde zunächst auf Protein und RNA Ebene die Expression von STAT3, pSTAT3 und weiteren Proteinen untersucht. Dann wurde die Wirkung des STAT3- Inhibitors Niclosamid auf die Zellen sowie auf Zielstrukturen auf molekularer Ebene analysiert. Diese Zielstrukturen waren zum einen STAT3 selbst sowie Proteine, die im STAT3-Signalweg eine Rolle spielen.

#### **3.2.1 Grundexpression von STAT3 und pSTAT3 auf Proteinebene**

Voraussetzend für die Folgeversuche galt es, die Grundexpression von STAT3 und pSTAT3 in den neuroendokrinen Karzinomen nachzuweisen: Diese wurde mittels Westernblot- Technik in den drei Zelllinien analysiert und verglichen. Die verwendeten Antikörper detektierten jeweils beide Isoformen, die Isoformen STAT3 $\alpha$  (86 kDa) und STAT3 $\beta$  (79 kDa) in nicht phosphoryliertem und phosphoryliertem Zustand.

Abb. 13 zeigt die Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses, welches aus den drei durchgeführten Versuchen gewählt wurde. Die beta Isoform waren in allen Durchgängen wesentlich schwächer detektierbar. Das nicht phosphorylierte STAT3 zeigte sich am schwächsten exprimiert in NEC-DUE2. Eine stärkere Expression ließ sich in der Zelllinie NEC-DUE1 darstellen und die stärkste Expression in NEC-DUE3. Das phosphorylierte STAT3 (pSTAT3) ließ sich in der Zelllinie NEC-DUE2 in keinem Versuch darstellen, eine geringe Expression zeigte sich in NEC-DUE3 und NEC-DUE1. Die Versuche wurden mit GAPDH und  $\alpha$ Tubulin als Kontrollen durchgeführt, welche die gleichmäßige Proteinverteilung zeigen.



**Abb. 13: STAT3 und pSTAT3 Expression in den Zelllinien NEC-DUE1-3**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis der Westernblots zur Untersuchung der Grundexpression von STAT3 sowie des phosphorylierten STAT3 in ihren jeweiligen Isoformen  $\alpha$  mit einer Masse von 86 kDa und  $\beta$  (79 kDa). Als Kontrolle ist hier alphaTubulin (50 kDa) gewählt.

### 3.2.2 Wirkung einer STAT3 Inhibition mit Niclosamid auf NEC Zellen

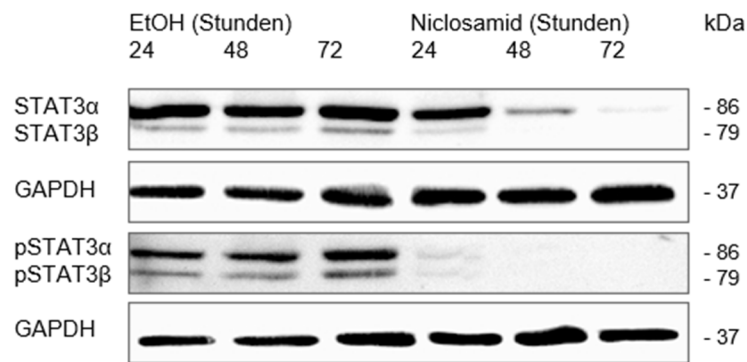
Um die Funktion von STAT3 zu untersuchen, wurden die Zelllinien mit dem STAT3 Inhibitor Niclosamid behandelt und dessen Wirkung auf verschiedenen Ebenen analysiert. Ziel war es, durch die Inhibition von STAT3 dessen wachstumsfördernde und antiapoptotische Eigenschaften zu untersuchen.

### 3.2.3 Wirkung einer STAT3 Inhibition mittels Niclosamid auf STAT3 und auf Survivin auf Proteinebene

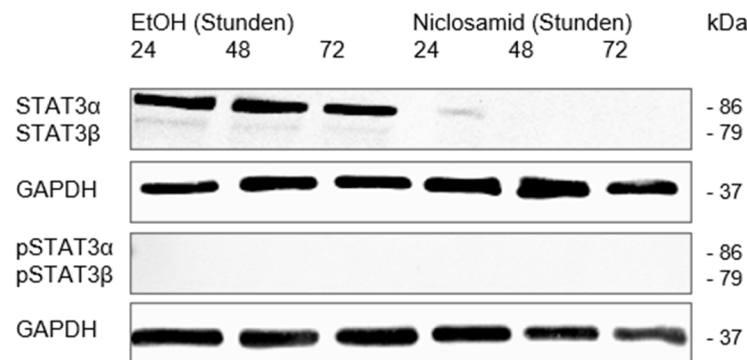
Um die Auswirkungen einer Behandlung der Zelllinien NEC-DUE1-3 mit Niclosamid auf die Expression sowie den Phosphorylierungsstatus von STAT3 zu analysieren, wurden Westernblot Untersuchungen durchgeführt. Zudem wurde die Expression des Proteins Survivin analysiert, dessen Expression durch STAT3 beeinflusst werden kann und welches eine wichtige Funktion im Rahmen der Regulation von Zellfunktionen wie Proliferation und Apoptose spielt.

Zunächst wurden die Zelllinien NEC-DUE1-3 mit Niclosamid und der Kontrolle Ethanol mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M über verschiedene Zeitspannen 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Proteinmengen wurden mittels Westernblotting Verfahren detektiert, siehe

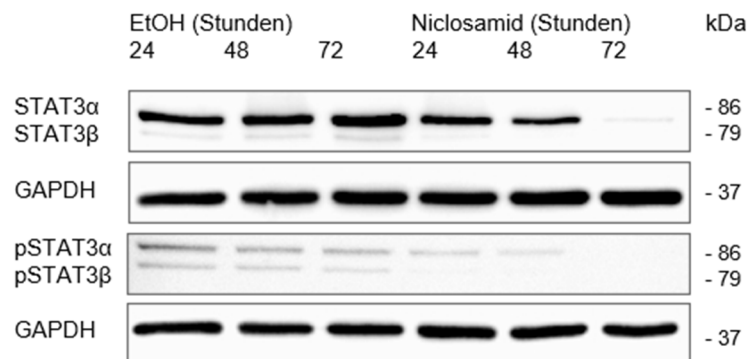
Abb. 14. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. In den Zelllinien NEC-DUE1 und 3 zeigte sich sowohl für STAT3 als auch für pSTAT3 eine von der Inkubationszeit abhängige Reduktion der Proteindetektion. Je länger die Inkubationszeit, desto geringer zeigte sich die Proteinmenge. In der Zelllinie NEC-DUE2 zeigte sich dieser Zusammenhang auch für STAT3. Das phosphorylierte STAT3 konnte in den Versuchen mit den NEC-DUE2 Zellen nicht detektiert werden, wie schon bei der Untersuchung der Grundexpression (siehe Abschnitt 3.2.1).



#### a) NEC-DUE1



#### b) NEC-DUE2



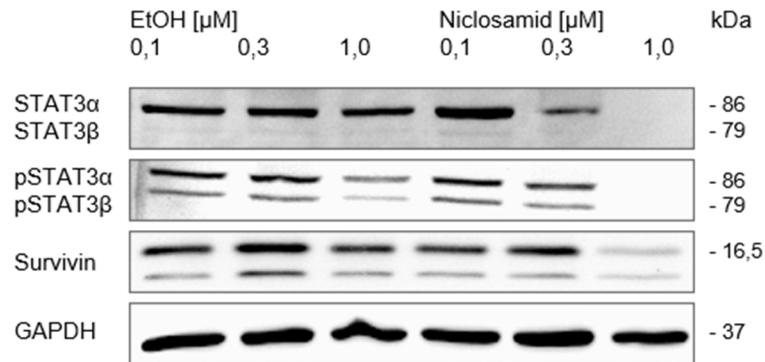
#### c) NEC-DUE3

### Abb. 14a-c: Westernblotting - Zeitabhängige Reduktion der Protein-Expression von STAT3 durch Niclosamid in NEC-DUE1-3

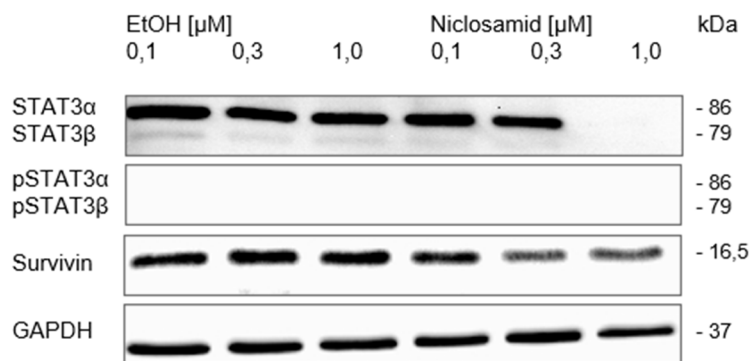
a) NEC-DUE1, b) NEC-DUE2 und c) NEC-DUE3 wurden über 24, 48 und 72 Stunden mit einer Niclosamid Konzentration von 1  $\mu$ M behandelt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis eines Westernblots. Detektiert wurden pSTAT3 und STAT3 mit deren jeweiligen Isoformen  $\alpha$  mit einer Masse von 86 kDa und  $\beta$  (79 kDa). Als Ladungskontrolle ist jeweils GAPDH (37 kDa) gewählt. Als Behandlungskontrolle diente das Lösungsmittel Ethanol.

In einem weiteren Versuch wurden die Zelllinien NEC-DUE1-3 mit Niclosamid und der Kontrolle Ethanol in absteigenden Konzentrationen von 1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M über eine Zeitspanne von 72 Stunden inkubiert und die Expression der Proteine STAT3, pSTAT3 und Survivin mittels Westernblotting Verfahren dargestellt, siehe Abb. 15. Wie in den

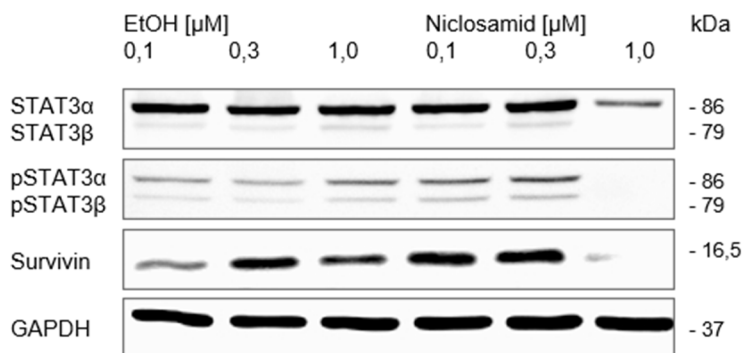
Untersuchungen zuvor konnte pSTAT3 in der Zelllinie NEC-DUE2 nicht detektiert werden. In den übrigen Versuchen zeigte sich die dosisabhängige Reduktion der STAT3 und pSTAT3 Expression mit steigender Niclosamidkonzentration. In den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 konnte bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in den überwiegenden Fällen kein Protein mehr nachgewiesen werden. Zudem zeigt sich eine Reduktion der Survivinexpression nach Behandlung mit Niclosamid.



#### a) NEC-DUE1



#### b) NEC-DUE2



#### c) NEC-DUE3

**Abb. 15a-c: Westernblotting - Konzentrationsabhängige Reduktion der Expression von STAT3 und Survivin durch Niclosamid in NEC-DUE3**

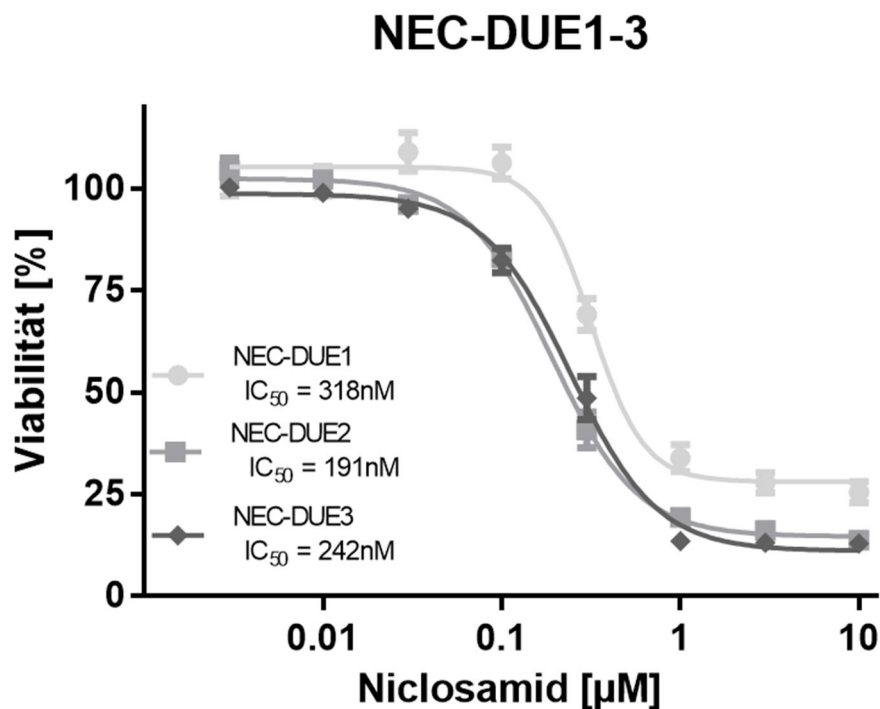
a) NEC-DUE1, b) NEC-DUE2 und c) NEC-DUE3 wurden über 72 Stunden mit einer Niclosamid Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  behandelt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis des Westernblots. Detektiert wurden pSTAT3 und STAT3 mit deren jeweiligen Isoformen  $\alpha$

mit einer Masse von 86 kDa und  $\beta$  (79 kDa) sowie das Protein Survivin. Als Ladungskontrolle ist jeweils GAPDH (37 kDa) gewählt. Als Behandlungskontrolle wurde Ethanol verwendet.

### 3.2.3.1 Beeinflussung der Zellviabilität durch Niclosamid

Mithilfe des MTS Assays wurde die Viabilität der Zellen nach Behandlung mit Niclosamid untersucht. Grundlage ist die Messung der Menge des bei einer Wellenlänge von 490 nm absorbierten Formazan, welches in stoffwechselaktiven Zellen produziert wird, nachdem sie mit Niclosamid behandelt wurden. Die gemessenen Absorptionen sind damit proportional zu der Anzahl an noch lebenden Zellen. Dazu wurden die Zelllinien NEC-DUE1-3 jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen von Niclosamid (10  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,03  $\mu$ M und 0,01  $\mu$ M, 0,003  $\mu$ M) über 72 Stunden inkubiert und in Bezug zu den als Kontrolle mit Ethanol behandelten Zellen gesetzt.

Abb. 16 zeigt die Reduktion der Menge an stoffwechselaktiven Zellen nach Behandlung mit Niclosamid in allen drei Zelllinien. Mit steigender Konzentration von Niclosamid sank bei allen Zelllinien die Viabilität. Die mittlere inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$  lag bei NEC-DUE1 bei 318 nM, bei NEC-DUE3 bei 242 nM und bei NEC-DUE2 bei 191 nM. Die Zelllinie NEC-DUE2 zeigte sich also am sensitivsten. Die Zelllinie mit der geringsten STAT3 Expression (siehe Abschnitt 3.2.1) präsentiert sich hier mit der geringsten mittleren inhibitorischen Konzentration.



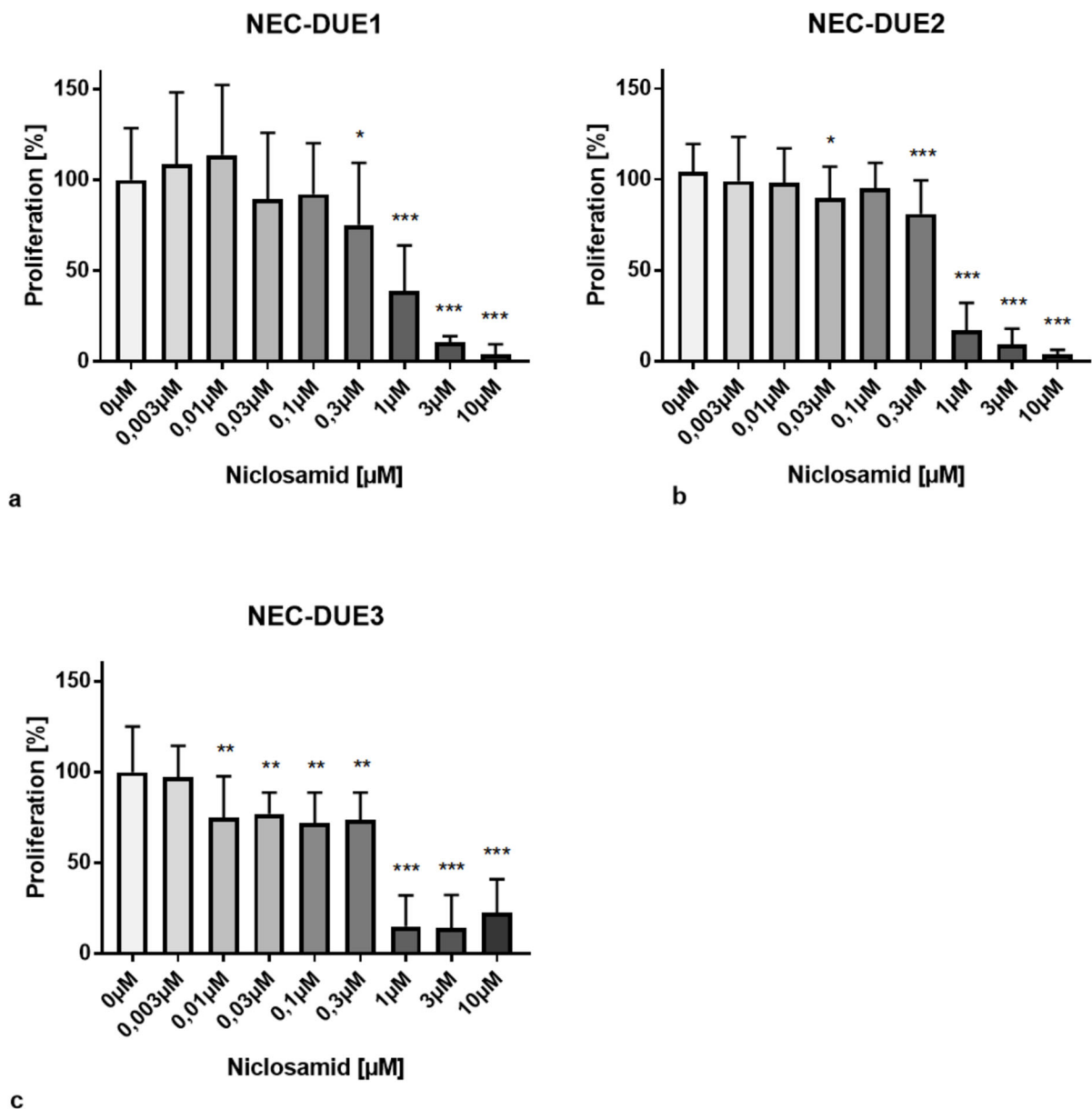
**Abb. 16: MTS Assay - STAT3 gezielte Therapie reduziert die Zellviabilität in GEP-NEC Zelllinien** NEC-DUE1-3 wurden über 72 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von Niclosamid behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTS Assay gemessen, als prozentualer Anteil der Absorption der mit Niclosamid behandelten Zellen zu der Absorption der mit Ethanol behandelten Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei voneinander unabhängigen Versuchen mit

jeweiliger Dreifachbestimmung in logarithmischer Transformierung. Die IC<sub>50</sub> Werte sind in der linken Diagrammecke angegeben.

### **3.2.3.2 Beeinflussung der Zellproliferation durch Niclosamid**

Mithilfe des BrdU Assays wurde die Proliferation der Zellen nach Behandlung mit Niclosamid untersucht. Die Zelllinien NEC-DUE1-3 wurden jeweils mit absteigenden Konzentrationen von Niclosamid (10  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,03  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M und 0,003  $\mu$ M) über 72 Stunden inkubiert. Grundlage ist, dass bei der danach ablaufenden Proliferation statt des Thymidins das BrdU inkorporiert wurde. In Bezug zu den als Kontrolle mit Ethanol behandelten Zellen gesetzt konnte somit der Anteil der noch zu Proliferation fähigen Zellen gemessen werden. Abb. 17 stellt die Ergebnisse in einem Säulendiagramm dar. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Proliferation durch die Inkubation mit Niclosamid in allen drei Zelllinien erzielt wurde. Die statistische Analyse zur Signifikanzkontrolle der Messungen zwischen den Zelllinien wurde mittels eines nichtparametrischen Mann-Whitney U Test durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche zeigte die Zelllinie NEC-DUE3 bereits bei einer niedrigen Niclosamidkonzentration von 10 nM eine signifikante Abnahme der Zellproliferation (Abb. 17c).





**Abb. 17: BrdU Assay - STAT3 gezielte Therapie reduziert die Zellproliferation in GEP-NEC Zelllinien**

Wirkung der Behandlung mit Niclosamid gemessen an der Aufnahme von BrdU in a) NEC-DUE1 Zellen, b) NEC-DUE2 Zellen, c) NEC-DUE3 Zellen, die Behandlung mit dem Lösungsmittel Ethanol diente als Kontrolle. Quantifiziert ist die Proliferation als Absorption der mit Niclosamid behandelten Zellen prozentual zu der Absorption der mit Ethanol behandelten Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei voneinander unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Dreifachbestimmung. Statistische Signifikanz errechnet durch einen nichtparametrischen Mann-Whitney U Test (\*\*\*) kennzeichnet einen p-Wert < 0,001, \*\* einen p-Wert < 0,01, \* einen p-Wert < 0,05)

### 3.2.4 Grundexpression der im STAT3-Signalweg beteiligten Proteine auf RNA Ebene

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist an der Regulation wichtiger biologischer Funktionen wie dem Immunsystem, dem Zellwachstums und der Proliferation beteiligt, indem er die Transkription spezifischer Gene beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass durch STAT3 die

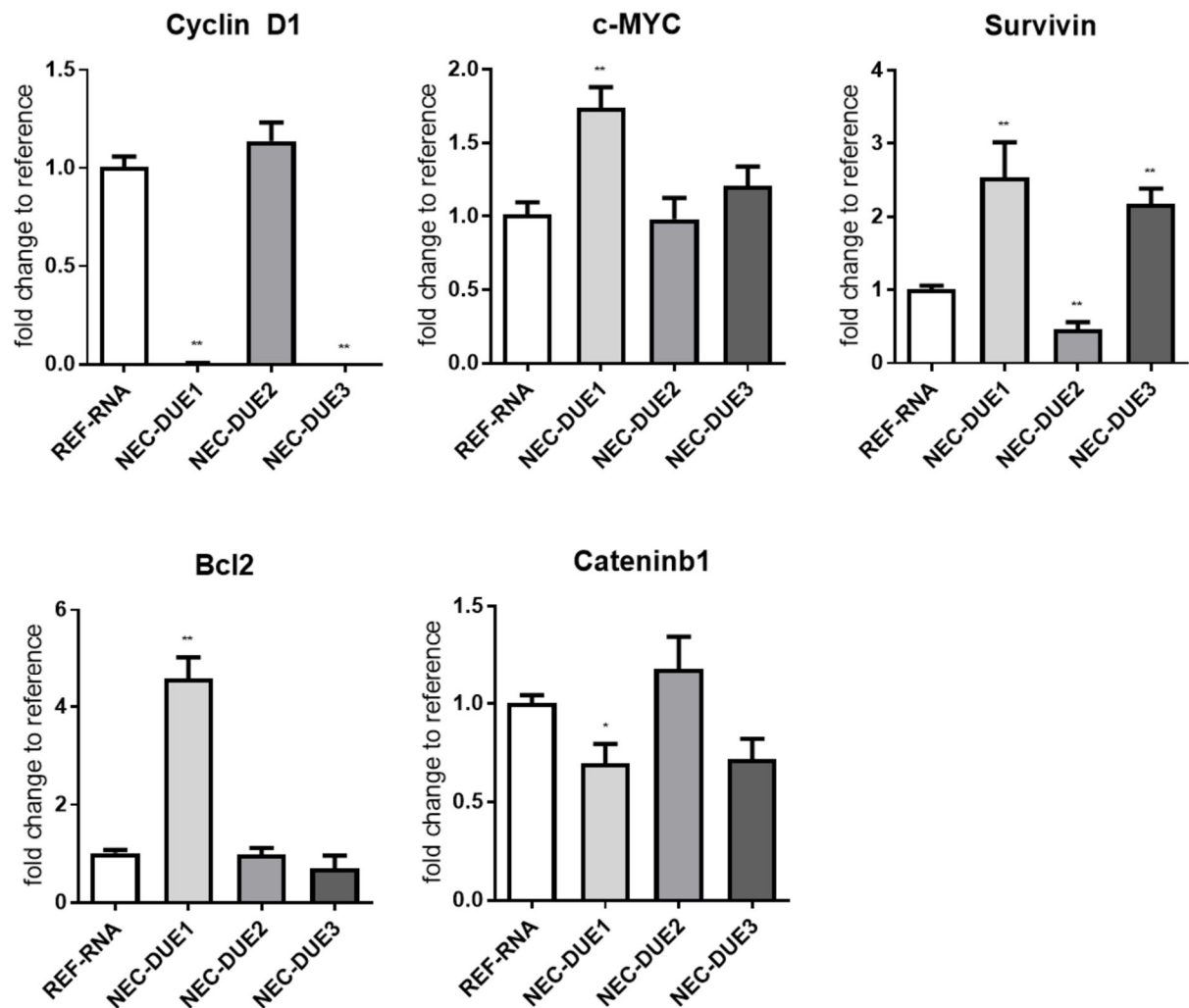
Transkription der Gene Cyclin D1, c-Myc, Survivin, Cateninb1 und Bcl2, welche eine entscheidende Funktion im Rahmen der Zellproliferation und Apoptose besitzen, beeinflusst wird (Siveen et al., 2014, Subramaniam et al., 2013, Germain and Frank, 2007, Aggarwal et al., 2006, Turkson and Jove, 2000). Um zu analysieren, ob und auf welche Weise STAT3 auch bei GEP-NECs in zelluläre Funktionen wie Apoptose und Proliferation eingreift, analysierten wir die Expression der oben genannten Gene nach Behandlung unserer GEP-NEC-Zelllinien mit dem STAT3 Inhibitor Niclosamid.

Zunächst wurde die Grundexpression der Zielgene auf RNA Ebene in den unbehandelten Zelllinien NEC-DUE1-3 mittels quantitativer PCR als Real Time PCR untersucht. Als *House Keeping* Gen wurde GAPDH verwendet.

In Abb. 18 und Tabelle 30 dargestellt ist jeweils der relative Expressionsunterschied der Genexpression der untersuchten Zielgene bezogen auf die Referenz-RNA, genannt *fold change to reference*. Als Referenz RNA wurde die Stratagene qPCR Human Reference Total RNA von der Firma Agilent Technologies angewendet, eine Mischung aus zehn humanen Zelllinien, die als Kontrolle für Genexpressionanalysen gilt (Agilent, o. J. ).

Dieser wurde mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode nach Livak und Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001) errechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezeigt. Die Signifikanzkontrollen der Unterschiede zwischen den gegenübergestellten Werten (jeweils Expression in der Zelllinie verglichen mit Expression in Referenz-RNA) wurden mittels eines nichtparametrischen Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

Mit Ausnahme von Cyclin D1 zeigte sich in allen untersuchten GEP-NEC-Zelllinien eine Expression der oben genannten Zielgene. Eine Transkription von Cyclin D1 konnte lediglich in der Zelllinie NEC-DUE2 detektiert werden. Im Vergleich zur Referenz-RNA zeigte sich in der Zelllinie NEC-DUE1 eine signifikant gesteigerte Expression der Zielgene c-Myc (1,74 -fach), Survivin (2,54 -fach) und Bcl2 (4,58 -fach) sowie eine signifikante Reduktion der Expression von Cateninb1 (0,70 -fach). Zudem zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression von Survivin in NEC-DUE2 Zellen (0,46 -fach) wohingegen die Transkription dieses Zielgens in der Zelllinie NEC-DUE3 signifikant erhöht war (2,17 -fach).



**Abb. 18: qPCR - Grundexpression der untersuchten Zielgene Cyclin D1, c-Myc, Survivin, Bcl2 und Cateninb1 in den Zelllinien NEC-DUE1-3**

Dargestellt ist der relative Expressionsunterschied der Genexpression der untersuchten Zielgene bezogen auf die Referenz-RNA, genannt *fold change to reference*. n = 6 Statistische Signifikanz errechnet mit nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test. \* p-Wert  $\leq 0,05$ , \*\* p-Wert  $\leq 0,01$ , \*\*\* p-Wert  $\leq 0,001$ . REF-RNA = Referenz-RNA

**Tabelle 30: qPCR - Statistische Daten zur Grundexpression der untersuchten Zielgene in den Zelllinien NEC-DUE1-3**

| Zielgen          | Mittelwert | Standard-abweichung | 95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts | Median | p- Wert  |
|------------------|------------|---------------------|-----------------------------------------|--------|----------|
| <b>Cyclin D1</b> |            |                     |                                         |        |          |
| NEC-DUE1         | 0,005      | 0,005               | -0,000 - 0,011                          | 0,005  | 0,002 ** |
| NEC-DUE2         | 1,137      | 0,234               | 0,891 - 1,382                           | 1,08   | 0,372    |
| NEC-DUE3         | 0          | 0                   | 0                                       | 0      | 0,002 ** |
| <b>c-Myc</b>     |            |                     |                                         |        |          |
| NEC-DUE1         | 1,74       | 0,341               | 1,38 - 2,1                              | 1,76   | 0,002 ** |
| NEC-DUE2         | 0,982      | 0,353               | 0,611 - 1,35                            | 0,925  | 0,699    |
| NEC-DUE3         | 1,21       | 0,317               | 0,087 - 1,54                            | 1,1    | 0,260    |

| Survivin  |       |       |               |       |          |
|-----------|-------|-------|---------------|-------|----------|
| NEC-DUE1  | 2,54  | 1,19  | 1,29 - 3,78   | 2,51  | 0,004 ** |
| NEC-DUE2  | 0,46  | 0,24  | 0,208 - 0,712 | 0,445 | 0,002 ** |
| NEC-DUE3  | 2,17  | 0,518 | 1,63 - 2,72   | 2,05  | 0,002 ** |
| Bcl2      |       |       |               |       |          |
| NEC-DUE1  | 4,58  | 1,1   | 3,42 - 5,73   | 4,45  | 0,002 ** |
| NEC-DUE2  | 0,977 | 0,341 | 0,619 - 1,33  | 0,955 | 0,699    |
| NEC-DUE3  | 0,703 | 0,638 | 0,034 - 1,37  | 0,63  | 0,818    |
| Cateninb1 |       |       |               |       |          |
| NEC-DUE1  | 0,695 | 0,242 | 0,441 - 0,949 | 0,665 | 0,028 *  |
| NEC-DUE2  | 1,18  | 0,399 | 0,763 - 1,6   | 1,11  | 0,240    |
| NEC-DUE3  | 0,718 | 0,249 | 0,457 - 0,98  | 0,685 | 0,071    |

Relative Unterschiede der Transkription der untersuchten Zielgene bezogen auf die Referenz-RNA, genannt *fold change to reference*. n = 6. Statistische Signifikanz errechnet mit nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test. \* p-Wert ≤ 0,05, \*\* p-Wert ≤ 0,01, \*\*\* p-Wert ≤ 0,001.

### 3.2.5 Wirkung einer STAT3 Inhibition mit Niclosamid auf die Transkription von Cyclin D1, c-Myc, Survivin, Bcl2 und Cateninb1

Um die funktionelle Bedeutung der untersuchten Zielgene in Zusammenhang mit STAT3 zu untersuchen, wurde die Wirkung der Behandlung mit Niclosamid auf die Transkription von Cyclin D1, c-Myc, Survivin, Bcl2 und Cateninb1 untersucht. Hierzu wurde die Expression der Zielgene nach Behandlung der Zellen mit Niclosamid mittels qPCR analysiert. Die Zelllinien NEC-DUE1-3 wurden jeweils 12 Stunden in verschiedenen Konzentrationen (0,1 µM, 0,3 µM und 1 µM) Niclosamid beziehungsweise dem Lösungsmittel Ethanol als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde die RNA extrahiert und die Expression der Zielgene mittels qPCR gemessen. Die Ergebnisse werden in Abb. 19 dargestellt.

Verglichen wurden die Expression der Zielgene in den mit Niclosamid behandelten Zellen mit der Genexpression in den mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelten Zellen. Dargestellt ist die relative Veränderung der Genexpression bezogen auf die Kontrolle, genannt *fold change to control*. Die Genexpression wurde mittels  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode nach Livak und Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001) errechnet. Es werden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezeigt. Die Signifikanzkontrollen der Unterschiede zwischen den jeweiligen Konzentrationen in Relation zur Kontrolle wurden mittels eines nichtparametrischen Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

Die Auswirkung einer STAT3 Inhibition mittels Niclosamid auf die Transkription von Cyclin D1 konnten nur in der Zelllinie NEC-DUE2 analysiert werden, da nur in dieser Zelllinie eine messbare Expression des Zielgenes vorlag. Mit steigender Niclosamidkonzentration konnte eine signifikante Reduktion der Cyclin D1 Expression detektiert werden (0,77 -fach erniedrigt bei 0,1 µM, 0,68 -fach erniedrigt bei 0,3 µM, 0,35 -fach erniedrigt bei 1 µM).

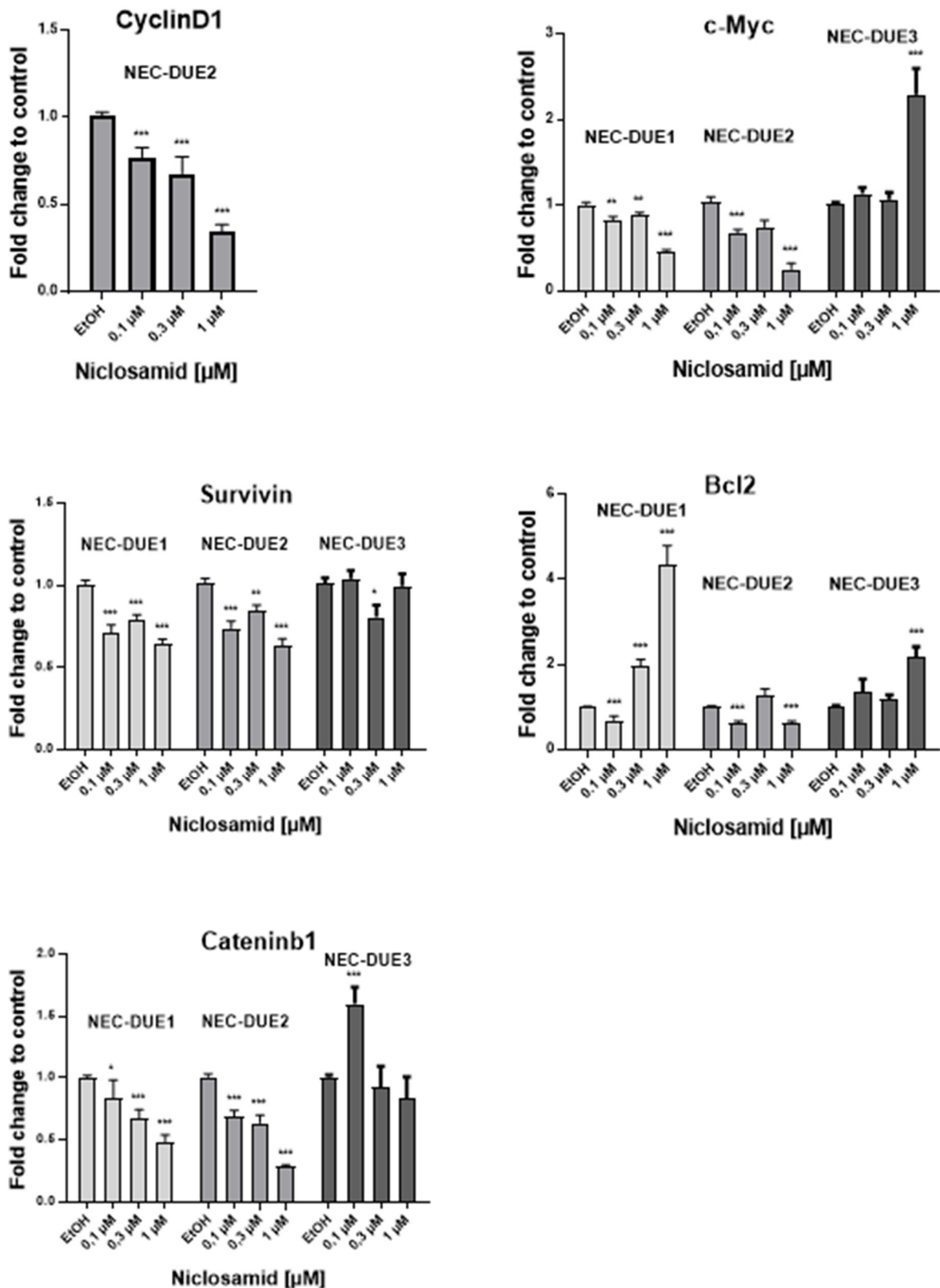
In den Zelllinien NEC-DUE1 und 2 zeigte sich eine signifikante und dosisabhängige Reduktion der Expression des Zielgenes c-Myc (Je höher die Konzentration des Niclosamid desto

geringer die c-Myc Expression). In der Zelllinie NEC-DUE3 zeigte sich hingegen bei der niedrigen und mittleren Niclosamidkonzentration kein Effekt auf die c-Myc Expression. Bei Inkubation mit der höchsten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von c-Myc (2,3 -fach erhöht).

Auch die Expression von Survivin konnte durch Behandlung mit Niclosamid in den Zelllinien NEC-DUE1 und 2 signifikant reduziert werden. In der Zelllinien NEC-DUE3 konnte jedoch keine Veränderung der Survivinexpression durch Inkubation mit Niclosamid festgestellt werden.

Für Bcl2 zeigte sich in der Zelllinie NEC-DUE1 bei Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  Niclosamid eine leichte Reduktion der Expression. Bei höheren Konzentrationen von 0,3  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Niclosamid konnte dagegen eine signifikante Zunahme der Expression detektiert werden. In der Zelllinie NEC-DUE2 zeigt sich bei den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion der Bcl2 Expression. In der Zelllinie NEC-DUE3 zeigt sich bei einer Niclosamidkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  eine signifikante Zunahme der Bcl2 Expression.

Bei der Messung von Cateninb1 zeigt sich in den Zelllinien NEC-DUE1 und 2 eine dosisabhängige proportionale Reduktion der Expression. Je höher die Konzentration von Niclosamid, desto höher die Suppression. In der Zelllinie NEC-DUE3 zeigt sich bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  eine signifikante Zunahme der Expression von Cateninb1, bei den anderen Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede.



**Abb. 19: qPCR – Auswirkung einer Behandlung mit Niclosamid auf die Expression der Zielgene Cyclin D1, c-Myc, Survivin, Bcl2 und Cateninb1 in den Zelllinien NEC-DUE1-3**

Die Zelllinien wurden über 12 Stunden mit absteigenden Konzentrationen von Niclosamid behandelt. Gemessen wurde die relative Veränderung der Genexpression bezogen auf die Ethanol-Kontrolle, genannt *fold change to control*. Statistische Signifikanz errechnet mit nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test. Signifikanz der Erhöhung/Erniedrigung der *fold change* Werte der mit Niclosamid

behandelten Zellen gegenüber den Kontrollen, n = 9. \* p-Wert  $\leq 0,05$ , \*\* p-Wert  $\leq 0,01$ , \*\*\* p-Wert  $\leq 0,001$

**Tabelle 31: qPCR - Statistische Daten zur Wirkung der Behandlung mit Niclosamid auf STAT3 abhängige Zielgene**

| Zielgen           | Mittelwert | Standard-abweichung | p-Wert    |
|-------------------|------------|---------------------|-----------|
| c-Myc             |            |                     |           |
| NEC-DUE1          |            |                     |           |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | 0,818      | 0,152               | 0,005 **  |
| 0,3 $\mu\text{M}$ | 0,878      | 0,110               | 0,007 **  |
| 1,0 $\mu\text{M}$ | 0,466      | 0,044               | 0,000 *** |
| NEC-DUE2          |            |                     |           |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | 0,678      | 0,117               | 0,000 *** |
| 0,3 $\mu\text{M}$ | 0,747      | 0,228               | 0,158     |
| 1,0 $\mu\text{M}$ | 0,255      | 0,187               | 0,000 *** |
| NEC-DUE3          |            |                     |           |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | 1,133      | 0,220               | 0,120     |
| 0,3 $\mu\text{M}$ | 1,067      | 0,243               | 0,826     |
| 1,0 $\mu\text{M}$ | 2,291      | 0,920               | 0,000 *** |
| Cyclin D1         |            |                     |           |
| NEC-DUE2          |            |                     |           |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | 0,770      | 0,167               | 0,001 *** |
| 0,3 $\mu\text{M}$ | 0,677      | 0,293               | 0,001 *** |
| 1,0 $\mu\text{M}$ | 0,347      | 0,114               | 0,000 *** |
| Survivin          |            |                     |           |
| NEC-DUE1          |            |                     |           |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | 0,708      | 0,156               | 0,000 *** |
| 0,3 $\mu\text{M}$ | 0,794      | 0,082               | 0,000 *** |
| 1,0 $\mu\text{M}$ | 0,647      | 0,077               | 0,000 *** |
| NEC-DUE2          |            |                     |           |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | 0,739      | 0,132               | 0,000 *** |
| 0,3 $\mu\text{M}$ | 0,846      | 0,107               | 0,005 **  |
| 1,0 $\mu\text{M}$ | 0,630      | 0,127               | 0,000 *** |
| NEC-DUE3          |            |                     |           |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | 1,039      | 0,153               | 0,558     |
| 0,3 $\mu\text{M}$ | 0,807      | 0,223               | 0,031 *   |
| 1,0 $\mu\text{M}$ | 0,994      | 0,230               | 0,826     |
| Bcl2              |            |                     |           |
| NEC-DUE1          |            |                     |           |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | 0,697      | 0,356               | 0,001 *** |
| 0,3 $\mu\text{M}$ | 1,975      | 0,501               | 0,000 *** |
| 1,0 $\mu\text{M}$ | 4,351      | 1,543               | 0,000 *** |

|           |       |       |           |
|-----------|-------|-------|-----------|
| NEC-DUE2  |       |       |           |
| 0,1 µM    | 0,626 | 0,177 | 0,000 *** |
| 0,3 µM    | 1,291 | 0,394 | 0,074     |
| 1,0 µM    | 0,650 | 0,085 | 0,000 *** |
| NEC-DUE3  |       |       |           |
| 0,1 µM    | 1,372 | 0,878 | 0,855     |
| 0,3 µM    | 1,192 | 0,311 | 0,120     |
| 1,0 µM    | 2,192 | 0,694 | 0,000 *** |
| Cateninb1 |       |       |           |
| NEC-DUE1  |       |       |           |
| 0,1 µM    | 0,839 | 0,496 | 0,024 *   |
| 0,3 µM    | 0,675 | 0,234 | 0,000 *** |
| 1,0 µM    | 0,487 | 0,190 | 0,000 *** |
| NEC-DUE2  |       |       |           |
| 0,1 µM    | 0,689 | 0,147 | 0,001 *** |
| 0,3 µM    | 0,636 | 0,179 | 0,000 *** |
| 1,0 µM    | 0,290 | 0,033 | 0,000 *** |
| NEC-DUE3  |       |       |           |
| 0,1 µM    | 1,599 | 0,401 | 0,000 *** |
| 0,3 µM    | 0,923 | 0,505 | 0,242     |
| 1,0 µM    | 0,830 | 0,532 | 0,220     |

Statistische Signifikanz errechnet mit nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test. Signifikanz der Erhöhung/Erniedrigung der *fold change* Werte der mit Niclosamid behandelten Zellen gegenüber der Ethanolkontrolle, n = 6. \* p-Wert ≤ 0,05, \*\* p-Wert ≤ 0,01, \*\*\* p-Wert ≤ 0,001.



## 4 Diskussion

### 4.1 Klassifizierung der neuroendokrinen Neoplasien

Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, unterscheidet man nach der WHO-Klassifikation von 2010 die neuroendokrinen Neoplasien mit dem *Grading* 1 und 2 als gut differenzierte neuroendokrine „Tumoren“ von den Neoplasien mit dem *Grading* 3 als schlecht differenzierte neuroendokrine „Karzinome“. Die Klassifikation wurde 2017 aktualisiert, da erkannt wurde, dass es insbesondere bei Lokalisation im Pankreas neuroendokrine Neoplasien existieren, die entsprechend histologischer Kriterien gut differenziert sind, aber aufgrund ihres hohen Ki-67-Index als hochproliferative G3-Neoplasien eingeteilt werden (Cives and Strosberg, 2018). Sie unterscheiden sich jedoch von schlecht differenzierten, hoch proliferativen Neoplasien dadurch, dass sie eine bessere Prognose zeigen (Sorbye et al., 2014). In der aktualisierten Klassifikation von 2017 wird das *Grading* getrennt von der Differenzierung betrachtet. Das *Grading* wird weiterhin nach Ki-67-Index bzw. Mitoserate bestimmt. Die Differenzierung wird anhand von Kriterien wie Zellmorphologie und Gewebearchitektur bestimmt. Charakteristisch für eine gute Differenzierung sind zum Beispiel kleine in Inseln angeordnete monomorphe Zellen. Schlecht differenzierte Zellen sind pleomorph und zeigen starke Nekrosen (Cives and Strosberg, 2018). Entsprechend der WHO-Klassifikation von 2017 werden gut differenzierte neuroendokrine Tumore (NET) mit dem *Grading* G1, G2 und G3 von den schlecht differenzierte neuroendokrinen Karzinomen (NEC), die per definitionem ein hohes *Grading* (G3) aufweisen, unterschieden. Die NEC werden weiterhin anhand morphologischer Kriterien in klein- und großzellige Typen unterteilt (Cives and Strosberg, 2018, Neumann, o. J.-b). Darüber hinaus wird in der neuen Klassifikation der Begriff MANEC für *mixed adeno-neuroendocrine carcinoma* durch die Gruppe der MiNEC für *Mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasms* ersetzt und damit weitergefasst (Nagtegaal et al., 2020). Die MiNEC sind definiert als Gewebe mit zwei verschiedenen neoplastischen Komponenten, wovon eine den des neuroendokrinen Phänotyps zeigt (de Mestier et al., 2017).

**Tabelle 32: Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien nach WHO 2017**

|                                    | Bezeichnung | Differenzierung   | Ki-67-Index | Mitoserate     | klinisches Verhalten                            |
|------------------------------------|-------------|-------------------|-------------|----------------|-------------------------------------------------|
| <b>Neuroendokriner Tumor (NET)</b> | NET G1      | gut differenziert | < 3 %       | ≤ 2 pro HPF    | langsames Tumorwachstum, benigne/niedrigmaligne |
|                                    | NET G2      |                   | 3 - 20 %    | 2 - 20 pro HPF | moderates Tumorwachstum, niedrigmaligne         |
|                                    | NET G3      |                   | > 20 %      | > 20 pro HPF   | schnelles Tumorwachstum, in der Regel maligne   |

|                                                                       |              |                     |                                 |          |              |                                              |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------|---------------------------------|----------|--------------|----------------------------------------------|
| <b>Neuroendokrines Karzinom (NEC)</b>                                 | Groß-zellig  | per definitionem G3 | schlecht differenziert          | > 20 %   | > 20 pro HPF | sehr schnelles Wachstum, hochmaligne         |
|                                                                       | Klein-zellig |                     |                                 |          |              |                                              |
| <b>Gemischt neuroendokrine/nicht neuroendokrine Neoplasie (MiNEN)</b> |              |                     | gut oder schlecht differenziert | variabel | variabel     | abhängig vom Phänotyp, häufig NEC, aggressiv |

Die Tabelle ist modifiziert nach (Nagtegaal et al., 2020, Breitling et al., 2019). Die Mitoserate ist definiert als Anzahl an Mitosen im Mikroskop pro 10 *High-Power Fields* (HPF). Das Hauptgesichtsfeld ist dabei der sichtbare Ausschnitt eines Präparates bei 400-facher Vergrößerung am Mikroskop (Neumann, o. J.-b).

Die für die Immunhistochemie verwendeten Gewebeproben und die für die Zellkultur verwendeten Zelllinien stammen von Patienten, die vor 2017 operiert wurden. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass bei der histologischen Untersuchung die Nomenklatur von 2010 verwendet wurde. Die Ausführungen dieser Arbeit beziehen sich daher auf die aktuell nicht mehr aktuellen Nomenklatur der WHO von 2010. Die Tatsache, dass die Nomenklatur der neuroendokrinen Neoplasien in den letzten Jahrzehnten häufig verändert wurde, erschwert den Vergleich von Studien und Veröffentlichungen erheblich. Auch den Ausführungen der vorliegenden Arbeit ist diese Tatsache als Fehlerquelle zu berücksichtigen.

## 4.2 Analyse der STAT3 Expression in GEP-NEN Gewebeproben

### 4.2.1 Grundgedanken

Bislang gibt es kaum Untersuchungen, die den Zusammenhang zwischen STAT3 und gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien untersuchen. Die wenigen, die jedoch bestehen, weisen auf eine potenzielle Bedeutung von STAT3 hin. Lopez et al. untersuchten, dass eine erhöhte STAT3 Expression mit einer erhöhten Proliferation und einer schlechten Prognose in GEP-NET einhergehen (Lopez-Aguilar et al., 2020). Cigrovski Berkovic et al. untersuchten genetische Unterschiede verschiedener Zytokingene in GEP-NET in Hinblick darauf, dass STAT3 über Zytokine wirkt und seine Aktivität von diesen beeinflusst wird. Sie konnten spezielle Zytokingenotypen den einzelnen GEP-NET zuordnen und ihnen eine Bedeutung für die Tumorgenese zusprechen (Cigrovski Berkovic et al., 2014).

Es existieren zahlreiche Untersuchungen in anderen Malignomen, die Belege für eine wichtige Rolle von STAT3 im Rahmen der Entstehung und Progression maligner Prozesse liefern (Siveen et al., 2014).

Auf Grundlage dieser Untersuchungen sahen wir ein hohes Potential, STAT3 in Verbindung zu GEP-NEN zu bringen und die Expression und biologische Funktion von STAT3 in den Tumoren zu untersuchen.

#### **4.2.2 Kernaussagen der Immunhistochemischen Untersuchungen**

Zunächst haben wir dazu die Expression in Gewebeproben mittels immunhistochemischer Anfärbung analysiert. Im Rahmen der IHC wurde folgendes beobachtet:

- a) Es zeigte sich eine höhere nukleäre STAT3 Expression im Tumor- im Vergleich zu Normalgewebe.
- b) Es zeigte sich eine höhere nukleäre STAT3 Expression in G1- und G2- Tumoren im Vergleich zu G3-Tumoren.
- c) Es zeigte sich eine höhere zytoplasmatische STAT3 Expression bei jungen Patienten.
- d) In unserer Analyse zeigte sich keine Assoziation mit dem Überleben der Patienten.

#### **4.2.3 IHC und Untersuchung der Relevanz der STAT3 Expression in der Entstehung von GEP-NEN**

##### **4.2.3.1 Unterschied zwischen nukleärem und zytoplasmatischem STAT3**

Das nukleäre STAT3 unterscheidet sich in seiner Bedeutung von dem zytoplasmatischen STAT3: Zytoplasmatisches STAT3 ist nicht aktiviert. Nach Dimerisierung von zwei STAT3 Monomeren erfolgt die Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3. Das aktivierte STAT3 Dimer transloziert in den Zellkern und beeinflusst hier an der DNA die Transkription. Das nukleäre STAT3 ist also phosphoryliert und aktiviert. Das zytoplasmatische STAT3 ist nicht phosphoryliert und nicht aktiviert (Siveen et al., 2014, Wake and Watson, 2015, Ma and Cao, 2006).

Deshalb haben wir in unseren immunhistochemischen Untersuchungen die STAT3 Expression in diesen zwei unterschiedlichen Lokalisationen getrennt voneinander untersucht.

Wir verglichen Tumorproben mit Normalgewebe. Während die zytoplasmatische STAT3 Expression in Tumor- und Normalgewebe sich nicht voneinander unterschied, zeigte sich eine signifikant höhere nukleäre STAT3 Expression im Tumorgewebe. Dies werten wir als Hinweis darauf, dass die aktive Form von STAT3 eine Rolle in GEP-NEN spielt.

##### **4.2.3.2 Kanzerogene Eigenschaften von STAT3 - Zusammenhänge von Inflammation und GEP-NEN und STAT3**

STAT3 gilt als bedeutender Faktor für die Inflammation in Geweben. Inflammation ist die Reaktion von Gewebe auf Umweltreize. Wenn diese Umweltreize in Form von Noxen wie zum Beispiel Alkohol oder Nikotin auf Gewebe einwirken, werden in diesen exponierten Geweben Zytokine und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet. Diese binden an die jeweiligen Rezeptoren, wodurch der JAK/STAT3-Signalweg aktiviert wird. Das aktivierte STAT3 transloziert in die Zellkerne und bewirkt hier die Aktivierung von Proliferation und Hemmung der Apoptose (Ma and Cao, 2006, Siveen et al., 2014). Durch übermäßige Zytokinausschüttung kommt es zur übermäßigen Aktivierung von STAT3 und damit zur übermäßigen Aktivierung von

proinflammatorischen Mechanismen. Hierin besteht das onkogene Potential von STAT3, denn die proinflammatorischen Mechanismen wie Angiogenese und Invasion wirken gleichzeitig kanzerogen (de Visser et al., 2006, Cigrovski Berkovic et al., 2014). Die Aktivierung von STAT3 während inflammatorischer Prozesse gilt als bedeutungsvoll für das Entstehen von Tumoren (Cigrovski Berkovic et al., 2014).

Schon von Virchow wurde ein Zusammenhang zwischen Inflammation und Krebsentstehung beschrieben (Grivennikov et al., 2010, Cigrovski Berkovic et al., 2014, Macarthur et al., 2004). In vielen Tumorentitäten des Magendarmtraktes ist der Zusammenhang chronischer Entzündungen mit Tumorgenese bekannt. Es ist erwiesen, dass chronisch entzündliche Erkrankungen wie Colitis ulcerosa mit einem erhöhten Risiko für Colonkarzinome einhergehen (Okayasu, 2012), dass eine chronische Pankreatitis mit einem erhöhten Risiko der Entstehung von Pankreas-Adenokarzinomen einhergeht oder die chronische Oesophagitis mit Oesophaguskarzinomen (Fukuda et al., 2011, Macarthur et al., 2004). Es liegt demnach nahe, dass es auch einen Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung enteroendokriner Zellen im Gastrointestinaltrakt und der Entstehung von neuroendokrinen Neoplasien gibt.

Cigrovski Berkovic et al. untersuchten genau diesen Zusammenhang in ihren Forschungen an GEP-NEN. Grundlage für ihre Überlegungen ist, dass Zytokine entscheidend bei einer Immunreaktion sind. Zytokine können ein Gewebsumilieu günstig oder hemmend für Tumorwachstum beeinflussen. Ob es zu Tumorunterdrückung oder Progression kommt, hängt also vom Zytokinprofil in der Mikroumgebung eines Tumors ab. Für die Zytokine IL-6, IL-17 und TNF  $\alpha$  ist zum Beispiel bekannt, dass sie wichtig für das Tumorwachstum sind (Cigrovski Berkovic et al., 2014).

Cigrovski Berkovic et al. untersuchten genetische Unterschiede der Zytokingene in GEP-NEN. Es unterscheiden sich die Gene interindividuell vor allem in den Einzelnukleotiden, man spricht von Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms* = SNP). Je nach Allelmuster wird das Ausmaß an Zytokinreaktion beeinflusst. Dies hat zur Folge, dass es individuelle Unterschiede in Prävalenz und Prognose von Tumorerkrankungen gibt. (Cigrovski Berkovic et al., 2014). Tatsächlich haben sie herausgefunden, dass einzelne Zytokinallele bedeutsam in der Entstehung von GEP-NEN sind. IL-2-330G Allele zum Beispiel erhöhten das Risiko der Entwicklung von gastrointestinalen NET, TNF  $\alpha$ -308A Allele sind spezifisch für die Entwicklung von NET in den vorderen Darmabschnitten, IL-6-174G Allele sind mit der Entwicklung von nicht funktionellen pankreatischen NET verbunden.

Der Zusammenhang zu STAT3 besteht darin, dass STAT3 zum einen durch Chemokine aktiviert wird und zum anderen seine Wirkung hauptsächlich über die Aktivierung von Chemokinen ausübt (Siveen et al., 2014, Wake and Watson, 2015). Somit stimuliert es in einem kreislaufartigen Prozess seine Aktivität: STAT3 führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Chemokinen, wodurch Immun- und Entzündungszellen stimuliert werden. Diese produzieren IL-6 und IL-1 $\beta$  und fördern dadurch die Aktivität von STAT3 (Cigrovski Berkovic et al., 2014). In übermäßigem und dauerhaftem Maße werden Zellproliferation und Angiogenese stimuliert. Gleichzeitig wird die Apoptose gehemmt, was Tumorwachstum begünstigt und STAT3 zu einem bedeutsamen Faktor in der Tumorgenese macht (Subramaniam et al., 2013, Wake and Watson, 2015).

Es wird postuliert, dass nicht genetische Veränderungen von STAT3 selbst für das onkogene Potential von STAT3 ursächlich sind. Genetische Unterschiede in Zytokinen und inflammatorische Reize werden als Auslöser vermutet (Wake and Watson, 2015). Man unterscheidet den physiologischen kurzzeitigen inflammatorischen Reiz von einer dauerhaften Inflammation: Während STAT3 unter physiologischen Bedingungen nur kurz aktiviert ist, ist es in Tumoren meist konstitutiv aktiviert (Bromberg, 2001, Kanda et al., 2004). Eine chronische Entzündung führt zu dauerhafter Aktivierung von Zytokinen und diese zur dauerhaften Aktivierung von STAT3 (Siveen et al., 2014).

STAT3 ist aufgrund seiner Rolle bei der Vermittlung von Inflamationsreaktionen ein wichtiger Faktor in der Tumorgenese. Wir konnten zeigen, dass das aktive STAT3 in Tumorzellen höher exprimiert ist als in Normalgewebe. Dies zeigt die wichtige Bedeutung von STAT3 in der Entstehung von GEP-NEN, insbesondere bei chronisch bestehender Wirkung von Umwelttoxinen auf enteroendokrine Zellen (Siveen et al., 2014).

#### **4.2.3.3 Die Bedeutung von STAT3 in anderen Tumorentitäten**

Zahlreiche Arbeiten behandeln die onkogene Bedeutung von STAT3 in anderen Tumorentitäten. Konsens in den meisten Arbeiten ist, dass STAT3 in Tumorgewebe exprimiert und konstitutiv aktiviert ist, während die Aktivierung von STAT3 in Normalgewebe nicht oder nur schwach stattfindet. Yin et al. konnten in Westernblot Analysen feststellen, dass STAT3 sowohl in epidermalen Keratinozyten als auch in Plattenepithelzellkarzinomzellen exprimiert wird. Die Phosphorylierung, also Aktivierung von STAT3, korreliert mit der Malignität. Phosphoryliertes STAT3 konnte nur in den Karzinomzellen nachgewiesen werden (Yin et al., 2006). In immunzytologischen Untersuchungen an CD138+ Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom konnten Bharti et al. die aktivierte, nukleäre Form von STAT3 in allen Patientenproben nachweisen, wohingegen in Proben von gesunden Patienten kein nukleäres STAT3 detektiert werden konnte (Bharti et al., 2004). Eine pharmakologische Inhibition von STAT3 führte zudem zu einem Vitalitätsverlust der Zellen. Auch in Tumoren des Gastrointestinaltrakts konnte eine dauerhafte Aktivierung von STAT3 nachgewiesen werden: Corvinus et al. wiesen mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* nach, dass die konstitutive STAT3-Aktivität in kolorektalen Krebszellen erhöht ist. In immunhistochemischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass pSTAT3 in den Nuklei von entdifferenzierten Epithelzellen exprimiert wird, während pSTAT3 in nicht-neoplastischen Zellen kaum vorhanden war (Corvinus et al., 2005). Wei et al. stellten fest, dass die STAT3 Aktivität in Gewebeproben humaner Pankreas-Karzinome signifikant höher ist als in gesunden Pankreas-Gewebeproben (Wei et al., 2003).

Diese Arbeiten zeigen alle, dass die aktive phosphorylierte Form von STAT3 in Tumorzellen von Bedeutung ist. In unseren immunhistologischen Untersuchungen konnte kein Antikörper spezifisch die phosphorylierte Form nachweisen. Wir haben gesehen, dass in unseren Patientenproben nur die nukleäre Form vermehrt in GEP-NEN exprimiert wird. Da aktiviertes STAT3 in den Zellkern transportiert wird, ist anzunehmen, dass es sich bei nukleärem STAT3 um aktiviertes STAT3 handelt. In unseren Untersuchungen zeigte sich keine Alteration der zytoplasmatischen STAT3 Expression im Tumorgewebe. Ausschließlich nukleäres STAT3 zeigt einen Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe. Unsere Untersuchungen zeigen, dass auch in GEP-NEN die aktive Form von STAT3 von Bedeutung ist.

#### **4.2.4 IHC und Untersuchung der Relevanz der STAT3 Expression in der Progression von GEP-NEN**

In einem nächsten Schritt analysierten wir mittels immunhistochemischer Untersuchungen von GEP-NEN-TMAs die nukleäre und zytoplasmatische Expression von STAT3. Wir stellten die Expression in G1- und G2-Tumoren der Expression in G3-Tumoren gegenüber: STAT3 wies eine signifikant höhere nukleäre Expression in G1/2-Tumoren auf als in G3-Neoplasien. Die Aktivität in gut differenzierten, niedrigproliferativen Tumoren war höher als in niedrig differenzierten, hochproliferativen Tumoren. Anders formuliert: Eine hohe nukleäre STAT3 Expression und damit hohe STAT3 Aktivität geht mit einer niedrigeren Proliferation einher. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass eine hohe STAT3 Aktivität im Rahmen der Entstehung von GEP-NEN von Belang ist (siehe Abschnitt 4.2.3). Im Rahmen der Progression sind zunehmend andere Onkogene wichtig, während die Bedeutung von STAT3 abnimmt.

Lopez et al. lieferten 2020 gegenläufige Ergebnisse zu unseren: Ihre Arbeit zeigt, dass eine hohe STAT3 Expression mit einer hohen Proliferation verbunden war (Lopez-Aguilar et al., 2020). Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine hohe nukleäre STAT3 Expression mit einer niedrigen Proliferation einhergeht. Ähnlich unserem methodischen Ansatz führten Lopez et al. immunhistochemische Versuche durch. Es wurden die kategorischen Variablen STAT3 Expression und Ki67-Wert miteinander verglichen. Wie in unserem Ansatz wurden Chi Quadrat Analysen und exakte Tests nach Fisher verwendet (Lopez-Aguilar et al., 2020). Wir verglichen die STAT3 Expression und das *Grading*, wobei sich das *Grading* ebenfalls auf die Bestimmung des Ki67-Wertes stützte. Lopez et al. untersuchten ein anderes Patientenkollektiv. Patienten mit Fernmetastasen wurden ausgeschlossen, während in unserem Patientenkollektiv 35 % der Patienten Fernmetastasen aufwiesen. Bei Lopez waren zudem Patienten mit R2-Resektionen ausgeschlossen, während in unserem Patientenkollektiv bei 14 % der Patienten eine R1 oder R2 Resektion vorlag (Lopez-Aguilar et al., 2020). Es ist zu vermuten, dass in unseren Untersuchungen eher fortgeschrittene, aggressivere Tumoren untersucht wurden. Die nukleäre STAT3 Expression und die STAT3 Aktivität scheint in diesen fortgeschrittenen Tumoren in Bezug auf die Tumorphiliferation an Bedeutung zu verlieren. Dies unterstützt die These, dass im Rahmen der Progression andere Onkogene gegenüber STAT3 an Bedeutung gewinnen.

#### **4.2.5 IHC und Untersuchung der prognostischen Relevanz der STAT3 Expression**

Zur Beurteilung der prognostischen Relevanz von STAT3 führten wir Überlebensanalysen durch. Wir konnten in unseren Analysen keine prognostische Bedeutung der STAT3 Expression feststellen.

Die Assoziation der nukleären STAT3 Expression mit G1 und G2 Tumoren erweckt die Erwartung, eine hohe STAT3 Expression sei prognostisch günstig. In der statistischen Analyse zeigte sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang.

Lopez et al. führten mit den immunhistochemischen Färbungen der GEP-NEN ebenfalls Überlebensanalysen durch. Sie untersuchten das rezidivfreie 3-Jahres-Überleben. In ihrem Patientenkollektiv war die STAT3 Expression mit einem hohen Proliferationsindex und

schlechter Prognose verbunden (Lopez-Aguilar et al., 2020). Lopez et al. ordneten STAT3 eine prognostische Relevanz zu. Ähnliche Zuordnungen trafen Arbeiten, welche die prognostische Relevanz von STAT3 in anderen Tumorentitäten untersuchten: Die STAT3 Aktivierung gilt in anderen Krebsarten als Faktor für eine schlechte Prognose (Corvinus et al., 2005). Masuda et al. führten eine immunhistochemische Anfärbung von pSTAT3 an Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses durch. In den Überlebensanalysen stellten sie fest, dass Patienten mit einer erhöhten pSTAT3-Färbung eine signifikant niedrigere krankheitsspezifische Überlebensrate hatten (Masuda et al., 2002). Benekli et al. führten Westernblot Versuche mittels pSTAT3 durch. Die Patienten mit erhöhten pSTAT3 Werten hatten ein medianes krankheitsfreies Überleben von 8,7 Monaten, die Patienten mit erniedrigten pSTAT3 Werten ein medianes krankheitsfreies Überleben von 20,6 Monaten. Das Gesamtüberleben unterschied sich aber nicht signifikant (Benekli et al., 2002).

Das Patientenkollektiv von Lopez et al. unterschied sich von unserem. Wir unterstellen, dass die STAT3 Aktivität in fortgeschrittenen, metastasierten Tumoren an Bedeutung verliert und andere Onkogene wichtiger werden.

Mittels unserer Überlebensanalysen konnten wir folgende klinisch-pathologische Eigenschaften als prognostisch relevante Faktoren in GEP-NEN identifizieren: das Alter bei Operation, die Primärtumorausbreitung, der Lymphknotenbefall, die Metastasierung, das *Grading* und das Resektionsausmaß. Dies wird in der Literatur für neuroendokrine Neoplasien bestätigt (Breitling et al., 2019). Einzuräumen ist, dass wir nicht die UICC Stadien, sondern die einzelnen Kriterien Primärtumorausbreitung, Lymphknotenbefall, Metastasierung, *Grading* und Resektionsausmaß getrennt voneinander untersucht haben. Wir bezogen uns nicht auf das Alter bei Diagnosestellung, sondern auf das Alter bei Operation. Wir konnten keine prognostisch signifikante Wertigkeit des Geschlechtes in unserem Patientenkollektiv feststellen. Rinke et al. beschrieben dagegen das weibliche Geschlecht als günstigen prognostischen Parameter (Rinke and Gress, 2010).

#### **4.3 Analyse der biologischen Relevanz von STAT3 in *in vitro* Experimenten mit GEP-NEC Zelllinien**

##### **4.3.1 Grundgedanken**

In anderen Entitäten wurde die Relevanz von STAT3 im Rahmen der Tumorentstehung, der Tumorprogression und Prognose bereits demonstriert (Corvinus et al., 2005, Masuda et al., 2002, Benekli et al., 2002). Die Tatsache, dass STAT3 in unseren IHC-Analysen in Tumorgewebe vermehrt exprimiert wurde, suggeriert eine Bedeutung des Proteins im Rahmen der Entstehung und Progression von GEP-NEN. Die biologische Relevanz von STAT3 wurde ergänzend mittels Durchführung von *in vitro* Experimenten untersucht.

##### **4.3.2 Analyse der Grundexpression von STAT3 in den Zelllinien**

Wir konnten zeigen, dass in unseren untersuchten GEP-NEC Zellen STAT3 konstitutiv an Tyr705 phosphoryliert und damit konstitutiv aktiviert ist.

Die *in vitro* Experimente haben wir an drei GEP-NEC Zelllinien durchgeführt. NEC-DUE1 und 2 stammen aus großzelligen neuroendokrinen Karzinomen und die NEC-DUE3 Zelllinie stammt aus einem kleinzelligen neuroendokrinen Karzinom. Mittels Westernblot wurden die STAT3 Proteine in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form nachgewiesen. STAT3 in der nicht aktivierten Form konnte in allen drei Zelllinien detektiert werden. pSTAT3, also das aktivierte STAT3, konnte in den Zelllinien NEC-DUE1 und 3 dargestellt werden, nicht jedoch in NEC-DUE2. Hieraus ist nicht zu schließen, dass pSTAT3 in dieser Zelllinie keine Bedeutung hat. Vielmehr kommt es in geringerer Menge in NEC-DUE2 vor und ist daher schwer zu detektieren. Das STAT3 in den NEC-DUE2 zeigt im Vergleich zu den anderen Zelllinien die schwächste Bande und damit die schwächste Expression.

Kanan et al. untersuchten ebenfalls mittels Westernblot die Expression von STAT3 und benutzten einen Antikörper, der spezifisch das an der Aminosäure Tyrosin an Stelle 705 phosphorylierte STAT3 detektiert. Sie konnten für verschiedene Magenkarzinomzellen zeigen, dass STAT3 konstitutiv an Tyr705 phosphoryliert und damit konstitutiv aktiviert ist (Kanda et al., 2004).

### **4.3.3 Niclosamid als Inhibitor von STAT3**

#### **4.3.3.1 Eigenschaften von Niclosamid**

Um die Funktion von STAT3 in den Zelllinien zu untersuchen, haben wir die Zelllinien mit Niclosamid behandelt. Niclosamid gilt als Inhibitor von STAT3. Der genaue Angriffspunkt von Niclosamid ist noch unklar. Ren et al. vermuten, dass Niclosamid die Phosphorylierung von STAT3 an der Aminosäure Tyrosin an Stelle 705 verhindert und die Translokation von STAT3 in den Zellkern verhindert (Ren et al., 2010). In vielen *in vitro* Studien wird Niclosamid als spezifischer Inhibitor angewendet, um die Bedeutung von STAT3 zu erforschen (Ren et al., 2010, Li et al., 2013b, Li et al., 2015, You et al., 2014). In Brustkrebszellen inhibierten Kim et al. den IL-6/JAK1/STAT3-Signalweg durch Niclosamid, was die OCT-4 (*octamer binding transcription factor 3/4*) Genexpression verhinderte. OCT-4 ist für die Umwandlung von Nicht-Onkogenen in tumorauslösende Stammzellen zuständig (Kim et al., 2013).

Mittels *in vivo* Studien wird das Potential von Niclosamid als Krebsmedikament erforscht: Im US-nationalen Krebsregister sind zurzeit acht klinische Studien verzeichnet, in denen Patienten mit kolorektalen Karzinomen und Prostata Karzinomen mit Niclosamid behandelt werden (U. S. National Library of Medicine, o. J.).

Niclosamid ist ein bereits seit 1982 zur Therapie von Bandwürmern zugelassenes Medikament. Vorteilhaft ist, dass die pharmakologischen Eigenschaften von Niclosamid bekannt sind. In der Bandwurmbehandlung wird es oral appliziert. Niclosamid hat eine orale Bioverfügbarkeit von 10 % und ist schlecht wasserlöslich. Mit der bei der Therapie von Bandwurminfektionen üblichen Dosierung von 2g werden Serumkonzentrationen von 0,25 bis 6,0 µg/ml erreicht. Durch seine schlechte Absorption im Magendarmtrakt ist es gut verträglich. Studienergebnisse lassen vermuten, dass Niclosamid keine mutagenen, onkogenen oder embryotoxischen Nebenwirkungen hat (Chen et al., 2018). Die systematische intravenöse Anwendung von Niclosamid muss jedoch noch weiter genau erforscht werden (Li et al., 2014).



Wir haben Niclosamid als Inhibitor von STAT3 in unseren *in vitro* Versuchen verwendet. Wir untersuchten, ob es durch Wirkung auf STAT3 zur Behandlung von GEP-NEN angewendet werden kann.

#### **4.3.3.2 Auswirkung der STAT3 Inhibition auf die Expression und Phosphorylierung von STAT3**

Wir konnten zeigen, dass Niclosamid in allen drei Zelllinien zur Reduktion des pSTAT3 und damit zur Reduktion der STAT3 Aktivität führte.

In den Westernblot-Untersuchungen wurden die STAT3 Proteine detektiert, nachdem sie mit Niclosamid behandelt wurden. Es zeigte sich in allen drei Zelllinien NEC-DUE1-3 eine dosis- und konzentrationsabhängige Reduktion der Expression von STAT3 auf Proteinebene. Zudem konnte eine dosis- und konzentrationsabhängige Reduktion der Expression von an Tyrosin 705 phosphoryliertem STAT3 in NEC-DUE1 und 3 gezeigt werden. Wie auch schon bei Untersuchung der Grundexpression konnte das pSTAT3 in NEC-DUE2 nicht detektiert werden. Es liegt nahe, dass Niclosamid auch in NEC-DEU2 zu einer Reduktion des pSTAT3 führt. Aufgrund der geringen Konzentration der pSTAT3-Proteine, konnte die Wirkung in der NEC-DUE2 Reihe mit unserer Methode nicht detektiert werden. Die Konzentration von STAT3 wurde in NEC-DUE2 genau wie in den anderen Zelllinien durch Niclosamid reduziert.

Die verringerte Konzentration von STAT3 und pSTAT3 legt nahe, dass der Angriffspunkt von Niclosamid in unseren Zelllinien sowohl STAT3 als auch pSTAT3 ist. Es verhindert nicht nur die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von STAT3, sondern supprimiert auch die Bildung von STAT3 selbst. In den Untersuchungen zu anderen Tumorentitäten war lediglich das aktivierte pSTAT3 nach Behandlung von Niclosamid supprimiert: Ren et al. identifizierten Niclosamid mittels STAT3 abhängigem dualem Luciferase Reporter Assay als STAT3 Inhibitor. Sie untersuchten an Du145-ProstataCa-Zellen, welchen direkten Effekt Niclosamid auf STAT3 hat. Mittels Westernblot konnte in Abhängigkeit der Niclosamiddosierung eine Konzentrationsverminderung des an Tyrosin705 phosphorylierten STAT3 gezeigt werden. Nach 24 Stunden Inkubation war bei einer Konzentration von 2  $\mu$ M Niclosamid pSTAT3 fast vollständig supprimiert. In einem weiteren Versuch zeigte sich zudem eine zeitabhängige Reduktion nach bereits 2 Stunden bei einer Inkubation mit 2  $\mu$ M Niclosamid (Ren et al., 2010). Eine gleichbleibende Expression von STAT3 und von an Serin727 phosphoryliertem STAT3 nach einer Behandlung mit Niclosamid. Auch hatte es keinen Einfluss auf die vorgeschalteten Kinasen JAK1, JAK2 und Src. Ren et al. schließen daraus, dass Niclosamid wirkt, indem es die Phosphorylierung von Tyrosin an Stelle 705 in STAT3 inhibiert. In dem durchgeführten Floreszenz-basierten Bindungsassay konnte herausgestellt werden, dass Niclosamid nicht über die Bindung an der SH2 Domäne agiert. Zudem konnten sie mittels Immunfluoreszenz Assay herausfinden, dass Niclosamid die Translokation von STAT3 in den Zellkern verhindert (Ren et al., 2010). Auch in den von Li et al. durchgeführten Westernblot-Versuchen bei Zellen von nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom war die STAT3 Expression durch Niclosamid nicht beeinflusst (Li et al., 2013a). In unseren Versuchen zeigte sich durchgängig eine konzentrationsabhängige Wirkung von Niclosamid nicht nur auf die pSTAT3 Expression, sondern auch auf die STAT3 Expression in allen Zelllinien.

#### **4.3.3.3 Auswirkung der STAT3 Inhibition auf die Zellviabilität und Proliferation**

Wir konnten zeigen, dass Niclosamid in allen drei Zelllinien durch die Reduktion der STAT3 Konzentration zur Reduktion der Zellviabilität und Zellproliferation führte.

Der Zellviabilitätsassay MTS zeigte in allen drei Zelllinien NEC-DUE1-3 eine konzentrationsabhängige Reduktion der lebenden Zellen durch die Behandlung mit Niclosamid. Die Inhibition von STAT3 führte zur Reduktion der Zellviabilität. Gründe hierfür könnten zum Beispiel eine reduzierte Proliferation oder eine erhöhte Apoptose oder Nekrose sein.

Erwähnenswert ist, dass für NEC-DUE2 der niedrigste IC<sub>50</sub>-Wert von 191 nM im MTS-Assay gemessen wurde. Die Zellen von NEC-DUE2 zeigen die höchste Sensitivität gegenüber Niclosamid. Dies könnte damit begründet werden, dass NEC-DUE2 die Zelllinie mit der geringsten STAT3 Expression in der Westernblot Analyse war.

Zudem gelang es, den Einfluss von Niclosamid auf die Zellproliferation von GEP-NEC darzustellen. Die Analysen mittels BrdU Assay zeigen, dass Niclosamid eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Proliferation in allen drei GEP-NEC-Zelllinien bewirkte. Für NEC-DUE3, die Zelllinie mit der stärksten Expression von STAT3, wurde schon bei geringen Niclosamidkonzentration eine signifikante Reduktion der Zellproliferation festgestellt. NEC-DUE3 zeigt bezüglich der Proliferationsinhibition die höchste Empfindlichkeit gegenüber Niclosamid. Die Inhibition von STAT3 führte zur Reduktion der Zellproliferation.

Es gibt verschiedene Studien an anderen Tumorerkrankungen, die für Niclosamid eine Wirkung auf Zellproliferation und Apoptose nachweisen. Ren et al. zeigten mittels Zellproliferationsassay MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyl tetrasodium bromide) die Inhibition der Zellproliferation durch Niclosamid in Tumorzellen, die konstitutiv aktiviertes STAT3 vorweisen. Für Zelllinien ohne konstitutiv aktiviertes STAT3 konnte dieser Effekt von Niclosamid nicht nachgewiesen werden. Mittels Durchflusszytometrie konnten Ren et al. nachweisen, dass Niclosamid in Du145-ProstataCa-Zellen dosisabhängig sowohl den G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Zyklusarrest verursacht als auch Apoptose induziert (Ren et al., 2010).

Zusammenfassend können wir schussfolgern, dass Niclosamid in allen drei Zelllinien zu einer Reduktion des pSTAT3 und damit zu einer Reduktion der Aktivität von STAT3 führte. Die Reduktion der STAT3 Aktivität verursachte eine Reduktion der Zellviabilität und einer Reduktion der Proliferation.

#### **4.3.4 Auswirkung der STAT3 Inhibition mit Niclosamid auf nachgeschaltete Zielgene**

##### **4.3.4.1 Grund für die Wahl der Zielgene Cyclin D1, c-Myc, Survivin, Cateninb1 und Bcl2**

STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der Einfluss auf diverse Zellmechanismen wie Zellwachstum, Zellinvasion, Angiogenese und Zellüberleben hat. Dies geschieht durch Aktivierung der Transkription von Genen. Somit entstehen vermehrt Proteine, die eine Funktion in den jeweiligen Zellmechanismen ausüben (Siveen et al., 2014). Um zu untersuchen, über welche Mechanismen STAT3 seine kanzerogene Rolle in GEP-NEN

ausübt, haben wir die Expression von Genen untersucht, für die bekannt ist, welche Rolle sie in den Zellmechanismen spielen und die bereits in anderen Tumorentitäten in Zusammenhang mit STAT3 gebracht wurden. Wir haben durch Behandlung mit Niclosamid getestet, welchen Einfluss die STAT3 Inhibition auf sie hat. Einerseits, um die Bedeutung von STAT3 in GEP-NEN zu untermauern und andererseits, um Rückschlüsse auf die Wirkweise von STAT3 zu ziehen. Die Erkenntnis der vorwiegenden Wirkweise könnte dann Ansatzpunkte für weitere Therapieansätze bieten.

Als Vertreter der Proliferation haben wir c-Myc, Cateninb1 und Cyclin D1 gewählt. Cyclin D1 aktiviert Kinasen, die den Übergang von der G1- zur S-Phase vermitteln und somit den Zellzyklus vorantreiben (Siveen et al., 2014). Cateninb1 und c-Myc steuern wiederum die Expression von Cyclin D1 (Netzker, 2012e, Valenta et al., 2012, Shang et al., 2017). Als Vertreter für die Apoptosehemmung haben wir Bcl2 gewählt. Dies ist ein Protein, das die Zellmembran stabilisiert und damit antiapoptotisch wirkt (Horn, 2012b). Survivin ist ein Vertreter sowohl für die Proliferation als auch für die Apoptosehemmung. Es kontrolliert die Mitosespindelstabilität und fördert damit die Zellproliferation (Bollrath et al., 2009, Giodini et al., 2002, Siveen et al., 2014). Zudem kommt es durch Komplexbildung mit XIAP zur Hemmung von Caspasen, die wiederum Apoptose auslösen (Dohi et al., 2004, Lu et al., 2007, Mehrotra et al., 2010).

#### **4.3.4.2 Kernaussagen der Untersuchung der nachgeschalteten Gene**

Mittels PCR haben wir die Expression der oben genannten Gene untersucht und sie in Bezug zur einer aus verschiedenen Tumorentitäten bestehenden Referenz-RNA gestellt. Um zu untersuchen, ob sie tatsächlich von STAT3 beeinflusst werden, haben wir die Zelllinien mit dem STAT3 Inhibitor Niclosamid behandelt und die Genexpression mittels PCR gemessen. Für Survivin haben wir zusätzlich die Proteinexpression mittels Westernblot untersucht.

Folgende Ergebnisse können wir festhalten:

- a) Survivin war in allen drei NEC-DUE Zelllinien exprimiert. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten zeigte es eine erhöhte Grundexpression in NEC-DUE1 und 3 und eine erniedrigte Grundexpression in NEC-DUE2.  
Niclosamid führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Genexpression von Survivin in NEC-DUE1 und 2. Bei NEC-DUE3 war eine Reduktion lediglich bei einer Konzentration von 0,3  $\mu$ M zu sehen. Niclosamid führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der Proteinkonzentration von Survivin in allen drei Zelllinien.
- b) C-Myc und Cateninb1 sind in allen drei NEC-DUE Zelllinien exprimiert, Cyclin D1 lediglich in NEC-DUE2. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten war c-Myc in der Zelllinie NEC-DUE1 signifikant erhöht exprimiert und von besonderer Bedeutung. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten ist Cateninb1 in der Zelllinie NEC-DUE1 signifikant erniedrigt exprimiert.  
Niclosamid führte zu einer dosisabhängigen Reduktion von c-Myc und Cateninb1 in NEC-DUE1 und 2 und zu einer dosisabhängigen Reduktion von Cyclin D1 in NEC-DUE2. Lediglich in NEC-DUE3 zeigt sich ein gegenteiliger Effekt: Niclosamid führt hier

zu einer Erhöhung der Expression von c-Myc bei der Konzentration von 1  $\mu$ M und zu einer Erhöhung der Expression von Cateninb1 bei der Konzentration von 0,1  $\mu$ M.

- c) Bcl2 ist in allen drei NEC-DUE Zelllinien exprimiert. In der Zelllinie NEC-DUE1 ist die Grundexpression von Bcl2 4,6-fach im Vergleich zur Referenz-RNA erhöht. Niclosamid scheint keine inhibitorische Wirkung auf Bcl2 zu haben. Bei NEC-DUE2 schwanken die Expressionswerte ohne erkennbare Tendenz, bei NEC-DUE1 und 3 zeigen sie eine steigende Tendenz.

#### **4.3.4.3 Wirkungsweise von STAT3 in GEP-NEC**

Außer für Cyclin D1 in NEC-DUE1 und 3 waren alle gewählten Gene in den Zelllinien exprimiert. Aus den Untersuchungen der Auswirkung einer pharmakologischen Inhibition von STAT3 mit Niclosamid in unseren Zelllinien NEC-DUE1-3, lässt sich für die Bedeutung von STAT3 in GEP-NEC folgendes schlussfolgern:

- a) STAT3 bewirkt in den untersuchten Zelllinien NEC-DUE1 - 3 eine Stimulation der Expression des Proteins Survivin, welches die Tumorzellproliferation stimuliert und antiapoptotische Funktionen ausübt.
- b) Niclosamid beeinflusst die Zielgene c-Myc und Cateninb1 in NEC-DUE1 und 2 sowie Cyclin D1 in NEC-DUE2. STAT3 übt auch über diese Gene Einfluss auf die Tumorzellproliferation aus.
- c) Die Wirkung von STAT3 auf Bcl2 scheint in GEP-NEC eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die von Niclosamid hervorgerufene pharmakologische Inhibition von STAT3 bewirkt eine Reduktion der Expression proliferationsfördernder sowie antiapoptotisch wirkender Proteine. Durch die Anwendung von Niclosamid könnte demnach das Wachstum GEP-NEC gehemmt werden. Die pharmakologische Inhibition von STAT3 mittels Niclosamid könnte somit einen neuen therapeutischen Ansatz für die Behandlung gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien darstellen.

##### **4.3.4.3.1 Wirkung von STAT3 über Survivin**

Dizdar et al. untersuchten die Bedeutung von Survivin in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (Dizdar et al., 2017). Sie führten die Untersuchungen an denselben Zelllinien NEC-DUE1 und 2 durch. Es wurde die Grundexpression von Survivin untersucht. Während sich in unseren Untersuchungen eine im Vergleich zur Referenz-RNA signifikant erhöhte RNA Expression von Survivin in den Zelllinien NEC-DUE1 und 3 zeigte, war die Survivin Expression in der Zelllinie NEC-DUE2 signifikant erniedrigt. Die Expression von Survivin in NEC-DUE1 war sowohl auf RNA- als auch Proteinebene signifikant höher exprimiert als in NEC-DUE2. Dementsprechend zeigte sich bei der erfolgreichen dosisabhängigen Reduktion der Zellviabilität durch die Survivin Antagonisten YM155 und M4N, gemessen im MTS-Assay, ein höherer IC50 Wert für NEC-DUE1 (Dizdar et al., 2017). In unserem MTS-Assay wurde der STAT3 Inhibitor Niclosamid angewandt. Auch hier zeigte

sich ein höherer IC50 Wert für NEC-DUE1 als für NEC-DUE2. In Bezug auf die Survivinexpression zeigen sich die Expressionsanalysen also deckungsgleich. Interessant ist, dass nicht nur die Expression von Survivin, sondern auch von STAT3 in unseren Untersuchungen in der Zelllinie NEC-DUE2 die niedrigste Expression zeigte. Hier erhärtet sich die These, dass STAT3 seine Wirkung über Survivin ausübt.

Dizdar et al. konnten zudem demonstrieren, dass Survivin zum einen biologisch relevant ist und zum anderen als ein potenzieller Angriffspunkt in der Therapie von GEP-NEC dienen kann. Dabei wiesen sie durch Array-CGH (*Array-based Comparative Genomic Hybridization*) einen Zugewinn von Gen-Kopienzahlen für Survivin bei 60 % ihres Patientenkollektivs nach. In immunhistochemischen Untersuchungen war die nukleäre und zytoplasmatische Survivin Expression in der Gruppe der hoch proliferativen G3 Tumoren signifikant erhöht. Dies legt nahe, dass Survivin eine wichtige Rolle bei der gesteigerten unkontrollierten Proliferation der G3 Tumore spielt. Zudem zeigte sich die Survivin Färbung in den univariaten Überlebensanalysen als prognostisch relevanter Faktor für ein schlechtes Outcome (Dizdar et al., 2017).

Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchten wir den Effekt von STAT3 auf Survivin mit der Hypothese, dass STAT3 über eine gesteigerte Expression von Survivin seine proliferativen und antiapoptotischen Eigenschaften ausübt.

In den von uns durchgeführten in vitro Experimenten konnten wir zeigen, dass die pharmakologische Inhibition von STAT3 in unseren GEP-NEC Zelllinien auf RNA- und Proteinebene zu einer Reduktion der Expression von Survivin führt. Entsprechend zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität und Proliferation durch die Inhibition von STAT3.

In anderen Tumorentitäten wurde dieser Zusammenhang ebenfalls gesehen. Kanda et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen STAT3 und Survivin in Magenkarzinomen. Sie fanden ähnliche Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen STAT3 und Survivin. Sie konnten darstellen, dass STAT3 in verschiedenen Magenkarzinomzellen konstitutiv aktiviert ist und die STAT3 Inhibition in Verbindung mit verringerter Survivin-Expression Apoptose auslöst (Kanda et al., 2004). Gritsko et al. zeigten, dass STAT3 an den Survivin-Promotor bindet. Eine erhöhte Survivin-Expression ging mit einer erhöhten STAT3 Aktivität einher. Durch Hemmung von STAT3 wurde die Expression von Survivin gehemmt und Apoptose ausgelöst (Gritsko et al., 2006).

#### **4.3.4.3.2 Wirkung von STAT3 über c-Myc, Cyclin D1 und Cateninb1**

Die Gene c-Myc, Cyclin D1 und Cateninb1, die wir zur Untersuchung der Proliferation ausgewählt haben, wurden in allen drei Zelllinien exprimiert. Eine Ausnahme bildete Cyclin D1, welches bei NEC-DUE1 und 3 nicht nachgewiesen werden konnte.

Für die Zelllinien NEC-DUE1 und 2, also die Zelllinien, die aus großzelligen neuroendokrinen Karzinomen isoliert wurden, konnten wir einen Zusammenhang zwischen c-Myc, Cateninb1 und Cyclin D1 zu STAT3 nachweisen. Die Inhibition von STAT3 führte zur dosisabhängigen Reduktion von c-Myc und Cateninb1 in NEC-DUE1 und 2 und zur dosisabhängigen Reduktion von Cyclin D1 in NEC-DUE2. STAT3 beeinflusst die Proliferation von großzelligen GEP-NEC über Regulierung von c-Myc, Cyclin D1 und Cateninb1. In der kleinzelligen GEP-NEC Zelllinie

NEC-DUE3 konnten wir hingegen keine Reduktion der Expression der Gene c-Myc, Cyclin D1 und Cateninb1 feststellen.

Weich et al. veröffentlichten eine Studie, in der ähnliche Ergebnisse präsentiert wurden. Es wurde Niclosamid bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren angewandt und dargestellt, dass die STAT3 Hemmung zu einer Reduktion der Expression von c-Myc, Cateninb1 und Cyclin D1 führt. Weich et al. führten dies auf den Einfluss von Niclosamid auf den Wnt/beta-Catenin-Signalweg zurück. Hintergrund hierfür war die Beobachtung, dass bei dedifferenzierten NEN die Expression von SSTR2 erniedrigt und die Expression von CXCR4 und Ki-67 erhöht ist. Es wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Niclosamid führte in den GEP-NEN-Zelllinien zu einer Herunterregulierung der Gene des Wnt-Signalweges (beta-Catenin, TCF7, c-Myc und Cyclin D1) (Weich et al., 2021).

Es ist bekannt, dass Niclosamid über verschiedene Signalwege seine Wirkung entfaltet. Darunter fallen der JAK/STAT3-Signalweg, der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, der NF- $\kappa$ B-Signalweg, der mTORC1-Signalweg und der Notch-Signalweg (Li et al., 2014). Jin et al. untersuchten die Wirkung von Niclosamid im NF- $\kappa$ B-Signalweg: In Zellen akuter myeloischer Leukämie (AML) identifizierten sie die Rolle von Niclosamid. Nach Stimulation mit TNF  $\alpha$  wurde die Expression von Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*), c-Myc, Survivin, Bcl2 und Cyclin D1 ohne und mit Behandlung von Niclosamid mittels Westernblot untersucht. TNF  $\alpha$  erhöhte die Proteinexpression. Niclosamid entfaltete die gegenteilige Wirkung (Jin et al., 2010). Wieland et al. untersuchten die Wirkung von Niclosamid auf Glioblastomzellen. Sie stellten fest, dass es zu einer Hemmung von WNT/CTNNB1-, NOTCH-, mTOR- und NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden kam (Wieland et al., 2013). In den verschiedenen Signalwegen spielen teilweise die gleichen Gene eine Rolle. Somit kann die Inhibition eines Gens in verschiedene Signalwege einwirken. Die Bedeutung der Gene muss häufig mehreren Signalwegen zugeordnet werden. Auch für gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien ist zu vermuten, dass Niclosamid auf verschiedene Signalwege wirkt.

#### **4.3.4.3.3 Wirkung von STAT3 über Bcl2**

Wir konnten in unseren Untersuchungen die Expression von Bcl2 in unseren GEP-NEC Zelllinien nachweisen. In der Zelllinie NEC-DUE1 ist die Grundexpression von Bcl2 4,6 -fach im Vergleich zur Referenz-RNA erhöht. Jedoch zeigte die STAT3 Inhibition keine eindeutige Wirkung. In der Literaturrecherche mittels der Meta-Datenbank PubMed® konnte keine Studie über den Zusammenhang von STAT3 und NEN sowie die Wirkung von Niclosamid auf die Expression von Bcl2 gefunden werden. Eine Studie von Li et al. bezieht sich auf den STAT3-Signalweg in nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen. Sie thematisiert die Wirkung des EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib auf nicht-kleinzellige Lungentumore über die Inhibition der physiologischen STAT3-Phosphatase PTPMeg2. Im Westernblot zeigten Li et al., dass Niclosamid in Kombination mit Erlotinib die Expression von pSTAT3, Bcl2 und Bcl-XL in Lungenadenokarzinom-Zelllinien reduziert (Li et al., 2013a). Sie postulieren, dass STAT3 einen Einfluss auf die Expression von Bcl2 hat. Unsere Untersuchungen ergaben hierzu keine Übereinstimmungen.

#### 4.4 Schlussfolgerungen

Aufgrund des aggressiven biologischen Verhaltens von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Karzinomen werden dringend neue Therapieansätze zur Behandlung dieser Neoplasien benötigt.

STAT3 scheint eine vielversprechende Zielstruktur zu sein. In vielen Tumorentitäten wurde nachgewiesen, dass STAT3 konstitutiv aktiviert ist. STAT3 hat vor allem im Rahmen inflammatorischer Prozesse eine große Bedeutung. Als Transkriptionsfaktor reguliert es Zellmechanismen wie Proliferation und Apoptose. Die konstitutive Aktivierung von STAT3 führt zu Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung, weshalb STAT3 kanzerogene Eigenschaften zugesprochen werden.

In unseren immunhistochemischen Untersuchungen stellten wir fest, dass STAT3 in Tumorgewebe gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien signifikant vermehrt in der aktiven Form exprimiert wird. Dies spricht für die große Bedeutung von aktiviertem STAT3 in GEP-NEN. Die signifikant höhere Expression von nukleärem STAT3 in G1- und G2-Tumoren im Vergleich zu G3-Neoplasien weist darauf hin, dass STAT3 insbesondere an der Entstehung von GEP-NEN beteiligt ist. In der weiteren Tumorprogression gewinnen andere Onkogene an Bedeutung. Wir konnten in den Überlebensanalysen keine prognostische Relevanz von STAT3 identifizieren.

In den Untersuchungen der drei NEC-DUE Zelllinien führte die Inhibition von STAT3 mittels Niclosamid in allen Zelllinien zu einer Reduktion von pSTAT3. Dies führte zu einer Reduktion der STAT3 Aktivität und dadurch zu einer Reduktion der Zellviabilität und Proliferation. Niclosamid bewirkte eine verminderte Expression von STAT3 und pSTAT3 sowie Survivin in allen drei Zelllinien. Survivin scheint wesentlich am Wirkmechanismus von Niclosamid beteiligt zu sein. Die proliferativ wirkenden Gene c-Myc und Cateninb1 in den Zelllinien NEC-DUE1 und 2 sowie Cyclin D1 in NEC-DUE2 wurden durch die pharmakologische STAT3 Inhibition mit Niclosamid ebenfalls herunterreguliert. Wir konnten somit demonstrieren, dass Niclosamid über die Reduktion der STAT3 Aktivität Einfluss auf mehrere Zielgene nimmt.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Wirkung von STAT3 ein bedeutender Faktor im Rahmen der Entwicklung von GEP-NEN zu sein scheint. STAT3 ist in GEP-NEN konstitutiv aktiviert. Es führt vorwiegend über die Hochregulierung von Survivin aber auch über die Stimulation der Expression von anderen Genen wie c-Myc, Cateninb1 und Cyclin D1 zu einer pathologisch gesteigerten Zellproliferation sowie Apoptosehemmung und ist hierdurch als Onkogen an der Entstehung von GEP-NEN beteiligt. STAT3 ist damit ein potenzieller Angriffspunkt in der Therapie von GEP-NEN.

Wir konnten Niclosamid als potenzielle neue Substanz in der GEP-NEC Therapie identifizieren. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung von Niclosamid in der Therapie von GEP-NEN abschätzen zu können. Zukünftige Studien könnten zum Beispiel die Wirksamkeit von Niclosamid in präklinischen Tiermodellen und die Analyse der Wirksamkeit in klinischen Studien sein.

## VII. Literaturverzeichnis

- AGGARWAL, B. B., KUNNUMAKKARA, A. B., HARIKUMAR, K. B., GUPTA, S. R., THARAKAN, S. T., KOCA, C., DEY, S. & SUNG, B. 2009. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci*, 1171, 59-76.
- AGGARWAL, B. B., SETHI, G., AHN, K. S., SANDUR, S. K., PANDEY, M. K., KUNNUMAKKARA, A. B., SUNG, B. & ICHIKAWA, H. 2006. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci*, 1091, 151-69.
- AGILENT. o. J. . *Total RNA for qPCR - Human Reference RNA* [Online]. Available: <https://www.agilent.com/en/product/real-time-pcr-%28qpcr%29/real-time-pcr-%28qpcr%29-total-rna-references-controls/total-rna-for-qpcr-general-applications/human-reference-rna-232755> [Accessed 23.10.2022].
- ALONZI, T., MARITANO, D., GORGONI, B., RIZZUTO, G., LIBERT, C. & POLI, V. 2001. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol*, 21, 1621-32.
- ALTIERI, D. C. 2008. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*, 8, 61-70.
- AMBOSS GMBH. o. J.-a. *Multiple Endokrine Neoplasie* [Online]. [Accessed 26.07.2021].
- AMBOSS GMBH. o. J.-b. *Neurokutane Syndrome (Phakomatosen)* [Online]. [Accessed 28.07.2021].
- AMBOSS GMBH. o. J.-c. *Signaltransduktion* [Online]. Available: <https://next.amboss.com/de/article/Qp0u6S?q=signaltransduktion#Z5ce550f89848674df715554f4eb78ed7> [Accessed 24.08.2021].
- AMBOSS GMBH. o. J.-d. *Zellzyklus und Tumorentstehung* [Online]. Available: <https://next.amboss.com/de/article/2p0TKS?q=apoptose#Za04f774101a4795b3cece92d46a56276> [Accessed 06.09.2021].
- AMBOSS GMBH. o. J.-e. *Zellzyklus und Tumorentstehung* [Online]. Available: <https://next.amboss.com/de/article/2p0TKS?q=cyclin%20d1#Z3273b51f6d318b6498a4a6251b639f7c> [Accessed 27.08.2021].
- ANLAUF, M., SCHMITT, A., HEIKAUS, S., SCHOTT, M., WILLENBERG, H. S., RAFFEL, A., KRAUSCH, M., CUPISTI, K., STOECKLEIN, N., BAUERSFELD, J., KNOEFEL, W. T., KOMMINOTH, P., PERREN, A. & KLÖPPEL, G. 2010. Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren: Molekulargenetische Charakteristika. *Viszeralmedizin*, 26, 283-288.
- BENEKLI, M., XIA, Z., DONOHUE, K. A., FORD, L. A., PIXLEY, L. A., BAER, M. R., BAUMANN, H. & WETZLER, M. 2002. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood*, 99, 252-7.
- BHARTI, A. C., SHISHODIA, S., REUBEN, J. M., WEBER, D., ALEXANIAN, R., RAJ-VADHAN, S., ESTROV, Z., TALPAZ, M. & AGGARWAL, B. B. 2004. Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood*, 103, 3175-84.
- BISHOP, A. E., POLAK, J. M., FACER, P., FERRI, G. L., MARANGOS, P. J. & PEARSE, A. G. E. 1982. Neuron Specific Enolase: A Common Marker for the Endocrine Cells and Innervation of the Gut and Pancreas. *Gastroenterology*, 83, 902-915.
- BOLLRATH, J., PHESSE, T. J., VON BURSTIN, V. A., PUTOCZKI, T., BENNECKE, M., BATEMAN, T., NEBELSIEK, T., LUNDGREN-MAY, T., CANLI, O., SCHWITALLA, S., MATTHEWS, V., SCHMID, R. M., KIRCHNER, T., ARKAN, M. C., ERNST, M. & GRETEN, F. R. 2009. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell



- survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*, 15, 91-102.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BREITLING, L. P., RINKE, A. & GRESS, T. M. 2019. Neuroendokrine Tumoren im Gastrointestinaltrakt. *Dtsch Med Wochenschr*, 144, 1509-1521.
- BROMBERG, J. 2002. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*, 109, 1139-42.
- BROMBERG, J. F. 2001. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23, 161-9.
- BUFFA, R., RINDI, G., SESSA, F., GINI, A. & CAPELLA, C. 1987. Synaptophysin immunoreactivity and small clear vesicles in neuroendocrine cells and related tumours. *Mol Cell Probes*, 367-381.
- CALDENHOVEN, E., VAN DIJK, T. B., SOLARI, R., ARMSTRONG, J., RAAIJMAKERS, J. A., LAMMERS, J. W., KOENDERMAN, L. & DE GROOT, R. P. 1996. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271, 13221-7.
- CHAPMAN, R. S., LOURENCO, P. C., TONNER, E., FLINT, D. J., SELBERT, S., TAKEDA, K., AKIRA, S., CLARKE, A. R. & WATSON, C. J. 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, 13, 2604-16.
- CHEN, M., WANG, J., LU, J., BOND, M. C., REN, X. R., LYERLY, H. K., BARAK, L. S. & CHEN, W. 2009. The anti-helminthic niclosamide inhibits Wnt/Frizzled1 signaling. *Biochemistry*, 48, 10267-74.
- CHEN, W., MOOK, R. A., JR., PREMONT, R. T. & WANG, J. 2018. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cell Signal*, 41, 89-96.
- CHO, M. Y., KIM, J. M., SOHN, J. H., KIM, M. J., KIM, K. M., KIM, W. H., KIM, H., KOOK, M. C., PARK, D. Y., LEE, J. H., CHANG, H., JUNG, E. S., KIM, H. K., JIN, S. Y., CHOI, J. H., GU, M. J., KIM, S., KANG, M. S., CHO, C. H., PARK, M. I., KANG, Y. K., KIM, Y. W., YOON, S. O., BAE, H. I., JOO, M., MOON, W. S., KANG, D. Y. & CHANG, S. J. 2012. Current Trends of the Incidence and Pathological Diagnosis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors (GEP-NETs) in Korea 2000-2009: Multicenter Study. *Cancer Res Treat*, 44, 157-65.
- CHOI, J. Y., LI, W. L., KOURI, R. E., YU, J., KAO, F. T. & RUANO, G. 1996. Assignment of the acute phase response factor (APRF) gene to 17q21 by microdissection clone sequencing and fluorescence in situ hybridization of a P1 clone. *Genomics*, 37, 264-5.
- CIGROVSKI BERKOVIC, M., CACEV, T., CATELA IVKOVIC, T., ZJACIC-ROTKVIC, V. & KAPITANOVIC, S. 2014. New insights into the role of chronic inflammation and cytokines in the etiopathogenesis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*, 99, 75-84.
- CIVES, M. & STROSBERG, J. R. 2018. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *CA Cancer J Clin*, 68, 471-487.
- CORTHAY, A. 2009. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol*, 70, 326-36.
- CORVINUS, F. M., ORTH, C., MORIGGL, R., TSAREVA, S. A., WAGNER, S., PFITZNER, E. B., BAUS, D., KAUFMANN, R., HUBER, L. A., ZATLOUKAL, K., BEUG, H., OHLSCHLÄGER, P., SCHÜTZ, A., HALBHUBER, K. J. & FRIEDRICH, K. 2005. Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia*, 7, 545-55.
- DARNELL, J. E., JR., KERR, I. M. & STARK, G. R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264, 1415-21.
- DASARI, A., SHEN, C., HALPERIN, D., ZHAO, B., ZHOU, S., XU, Y., SHIH, T. & YAO, J. C. 2017. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*, 3, 1335-1342.
- DE MESTIER, L., CROS, J., NEUZILLET, C., HENTIC, O., EGAL, A., MULLER, N., BOUCHÉ, O., CADIOT, G., RUSZNIEWSKI, P., COUVELARD, A. & HAMMEL, P. 2017. Digestive

- System            Mixed            Neuroendocrine-Non-Neuroendocrine            Neoplasms.  
*Neuroendocrinology*, 105, 412-425.
- DE VISSER, K. E., EICHTEN, A. & COUSSENS, L. M. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 6, 24-37.
- DEUTZMANN, R. 2012a. Zelluläre Kommunikation - Mechanismen der Signaltransduktion. In: RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. (eds.) *Duale Reihe - Biochemie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- DEUTZMANN, R. 2012b. Zelluläre Kommunikation - Zytokine. In: RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. (eds.) *Duale Reihe - Biochemie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- DIZDAR, L., DRUSENHEIMER, J., WERNER, T. A., MOHLENDICK, B., SCHUTTE, S. C., ESPOSITO, I., FILLER, T. J., KNOEFEL, W. T. & KRIEG, A. 2018. Establishment and Characterization of a Novel Cell Line Derived from a Small Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Anal Canal. *Neuroendocrinology*, 107, 246-256.
- DIZDAR, L., OESTERWIND, K. A., RIEMER, J. C., WERNER, T. A., MERSCH, S., MOHLENDICK, B., SCHUTTE, S. C., VERDE, P. E., RABA, K., TOPP, S. A., STOECKLEIN, N. H., ESPOSITO, I., KNOEFEL, W. T. & KRIEG, A. 2017. Preclinical assesement of survivin and XIAP as prognostic biomarkers and therapeutic targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia. *Oncotarget*, 8, 8369-8382.
- DOCHECK, o. J.-a. *Niclosamid* [Online]. [Accessed 03.09.2021].
- DOCHECK, o. J.-b. *Tyrosinkinase src* [Online]. Available: [https://flexikon.doccheck.com/de/Tyrosinkinase\\_Src](https://flexikon.doccheck.com/de/Tyrosinkinase_Src) [Accessed 07.09.2021].
- DOHI, T., OKADA, K., XIA, F., WILFORD, C. E., SAMUEL, T., WELSH, K., MARUSAWA, H., ZOU, H., ARMSTRONG, R., MATSUZAWA, S., SALVESEN, G. S., REED, J. C. & ALTIERI, D. C. 2004. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 34087-90.
- DWORAKOWSKA, D. & GROSSMAN, A. B. 2009. Are neuroendocrine tumours a feature of tuberous sclerosis? A systematic review. *Endocr Relat Cancer*, 16, 45-58.
- FUKUDA, A., WANG, S. C., MORRIS, J. P. T., FOLIAS, A. E., LIOU, A., KIM, G. E., AKIRA, S., BOUCHER, K. M., FIRPO, M. A., MULVIHILL, S. J. & HEBROK, M. 2011. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer Cell*, 19, 441-55.
- GARCIA-CARBONERO, R., SORBYE, H., BAUDIN, E., RAYMOND, E., WIEDENMANN, B., NIEDERLE, B., SEDLACKOVA, E., TOUMPANAKIS, C., ANLAUF, M., CWIKLA, J. B., CAPLIN, M., O'TOOLE, D. & PERREN, A. 2016. ENETS Consensus Guidelines for High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Neuroendocrine Carcinomas. *Neuroendocrinology*, 103, 186-94.
- GERMAIN, D. & FRANK, D. A. 2007. Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 13, 5665-9.
- GIODINI, A., KALLIO, M. J., WALL, N. R., GORBSKY, G. J., TOGNIN, S., MARCHISIO, P. C., SYMONS, M. & ALTIERI, D. C. 2002. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res*, 62, 2462-7.
- GRITSKO, T., WILLIAMS, A., TURKSON, J., KANEKO, S., BOWMAN, T., HUANG, M., NAM, S., EWEIS, I., DIAZ, N., SULLIVAN, D., YODER, S., ENKEMANN, S., ESCHRICH, S., LEE, J. H., BEAM, C. A., CHENG, J., MINTON, S., MURO-CACHO, C. A. & JOVE, R. 2006. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*, 12, 11-9.
- GRIVENNIKOV, S. I., GRETEN, F. R. & KARIN, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140, 883-99.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANTSCHKE, M. & PALMEDO, G. 2015. Immunhistologische Techniken. *Histopathologie der Haut*. Berlin: Springer.
- HAUSER, P. J., AGRAWAL, D., HACKNEY, J. & PLEDGER, W. J. 1998. STAT3 activation accompanies keratinocyte differentiation. *Cell Growth Differ*, 9, 847-55.

- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., MULLER-NEWEN, G., SCHAPER, F. & GRAEVE, L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 ( Pt 2), 297-314.
- HEMMERICH, W. o. J. Available: <https://statistikguru.de/spss/mann-whitney-u-test/auswertung-und-interpretation-2.html> [Accessed 30.03.2020].
- HORN, F. 2012a. Die Grundlagen - Signaltransduktion. In: HORN, F. (ed.) *Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 5 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- HORN, F. 2012b. Zellzyklus und Apoptose. In: HORN, F. (ed.) *Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 5 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- IHLE, J. N. 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377, 591-4.
- JIN, Y., LU, Z., DING, K., LI, J., DU, X., CHEN, C., SUN, X., WU, Y., ZHOU, J. & PAN, J. 2010. Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF-kappaB pathway and generation of reactive oxygen species. *Cancer Res*, 70, 2516-27.
- KANDA, N., SENO, H., KONDA, Y., MARUSAWA, H., KANAI, M., NAKAJIMA, T., KAWASHIMA, T., NANAKIN, A., SAWABU, T., UENOYAMA, Y., SEKIKAWA, A., KAWADA, M., SUZUKI, K., KAYAHARA, T., FUKUI, H., SAWADA, M. & CHIBA, T. 2004. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene*, 23, 4921-9.
- KANG, H., O'CONNELL, J. B., LEONARDI, M. J., MAGGARD, M. A., MCGORY, M. L. & KO, C. Y. 2007. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *Int J Colorectal Dis*, 22, 183-9.
- KIM, S. Y., KANG, J. W., SONG, X., KIM, B. K., YOO, Y. D., KWON, Y. T. & LEE, Y. J. 2013. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cell Signal*, 25, 961-9.
- KISHIMOTO, T., TAGA, T. & AKIRA, S. 1994. Cytokine signal transduction. *Cell*, 76, 253-62.
- KLIMSTRA, D. S., MODLIN, I. R., COPPOLA, D., LLOYD, R. V. & SUSTER, S. 2010. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*, 39, 707-12.
- KLOPPEL, G. 2019. [Neuroendocrine neoplasms : Two families with distinct features unified in one classification (German version)]. *Pathologe*, 40, 211-219.
- KLÖPPEL, G., PERREN, A. & HEITZ, P. U. 2004. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1014, 13-27.
- KLÖPPEL, G., PERREN, A. & HEITZ, P. U. 2003. Vom Karzinoid zum neuroendokrinen Tumor - Klassifizierung im Magen-Darm-Trakt und Pankreas. *Deutsches Ärzteblatt*, 100, 28-29.
- KNIGGE, U., CAPDEVILA, J., BARTSCH, D. K., BAUDIN, E., FALKERBY, J., KIANMANESH, R., KOS-KUDLA, B., NIEDERLE, B., NIEVEEN VAN DIJKUM, E., O'TOOLE, D., PASCHER, A., REED, N., SUNDIN, A. & VULLIERME, M. P. 2017. ENETS Consensus Recommendations for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms: Follow-Up and Documentation. *Neuroendocrinology*, 105, 310-319.
- KORSE, C. M., TAAL, B. G., VAN VELTHUYSEN, M. L. & VISSER, O. 2013. Incidence and survival of neuroendocrine tumours in the Netherlands according to histological grade: experience of two decades of cancer registry. *Eur J Cancer*, 49, 1975-83.
- KORTYLEWSKI, M., KUJAWSKI, M., WANG, T., WEI, S., ZHANG, S., PILON-THOMAS, S., NIU, G., KAY, H., MULE, J., KERR, W. G., JOVE, R., PARDOLL, D. & YU, H. 2005. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 11, 1314-21.
- KRAYWINKEL, K. 2018. Epidemiologie ausgewählter endokriner Tumoren in Deutschland. *Der Onkologe*, 24, 99-106.
- KRIEG, A., MERSCH, S., BOECK, I., DIZDAR, L., WEIHE, E., HILAL, Z., KRAUSCH, M., MOHLENDICK, B., TOPP, S. A., PIEKORZ, R. P., HUCKENBECK, W., STOECKLEIN, N. H., ANLAUF, M. & KNOEFEL, W. T. 2014. New model for gastroenteropancreatic

- large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. *PLoS One*, 9, e88713.
- LEVY, D. E. & LEE, C.-K. 2002. What does Stat3 do? *Journal of Clinical Investigation*, 109, 1143-1148.
- LI, M. X., BI, X. Y., HUANG, Z., ZHAO, J. J., HAN, Y., LI, Z. Y., ZHANG, Y. F., LI, Y., CHEN, X., HU, X. H., ZHAO, H. & CAI, J. Q. 2015. Prognostic Role of Phospho-STAT3 in Patients with Cancers of the Digestive System: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 10, e0127356.
- LI, R., HU, Z., SUN, S. Y., CHEN, Z. G., OWONIKOKO, T. K., SICA, G. L., RAMALINGAM, S. S., CURRAN, W. J., KHURI, F. R. & DENG, X. 2013a. Niclosamide overcomes acquired resistance to erlotinib through suppression of STAT3 in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 12, 2200-12.
- LI, R., YOU, S., HU, Z., CHEN, Z. G., SICA, G. L., KHURI, F. R., CURRAN, W. J., SHIN, D. M. & DENG, X. 2013b. Inhibition of STAT3 by niclosamide synergizes with erlotinib against head and neck cancer. *PLoS One*, 8, e74670.
- LI, Y., LI, P. K., ROBERTS, M. J., AREND, R. C., SAMANT, R. S. & BUCHSBAUM, D. J. 2014. Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. *Cancer Lett*, 349, 8-14.
- LIU, J., LIU, W., LU, Y., TIAN, H., DUAN, C., LU, L., GAO, G., WU, X., WANG, X. & YANG, H. 2018. Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models. *Autophagy*, 14, 845-861.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOPEZ-AGUIAR, A. G., POSTLEWAIT, L. M., ETHUN, C. G., ZAIDI, M. Y., ZHELNIN, K., KRASINSKAS, A., RUSSELL, M. C., KOOBY, D. A., CARDONA, K., EL-RAYES, B. F. & MAITHEL, S. K. 2020. STAT3 Inhibition for Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: Potential for a New Therapeutic Target? *J Gastrointest Surg*, 24, 1138-1148.
- LU, M., LIN, S. C., HUANG, Y., KANG, Y. J., RICH, R., LO, Y. C., MYSZKA, D., HAN, J. & WU, H. 2007. XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell*, 26, 689-702.
- LUTTICKEN, C., WEGENKA, U. M., YUAN, J., BUSCHMANN, J., SCHINDLER, C., ZIEMIECKI, A., HARPUR, A. G., WILKS, A. F., YASUKAWA, K., TAGA, T. & ET AL. 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, 263, 89-92.
- MA, J. & CAO, X. 2006. Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements. *Cell Signal*, 18, 1117-26.
- MAASBERG, S., PAPE, U.-F., FOTTNER, C., GORETZKI, P. E. & ANLAUF, M. 2018. [Neuroendocrine Neoplasia within the German NET Registry]. *Z Gastroenterol*, 56, 1237-1246.
- MACARTHUR, M., HOLD, G. L. & EL-OMAR, E. M. 2004. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286, G515-20.
- MASUDA, M., SUZUI, M., YASUMATU, R., NAKASHIMA, T., KURATOMI, Y., AZUMA, K., TOMITA, K., KOMIYAMA, S. & WEINSTEIN, I. B. 2002. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 62, 3351-5.
- MATSUDA, T., NAKAMURA, T., NAKAO, K., ARAI, T., KATSUKI, M., HEIKE, T. & YOKOTA, T. 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo j*, 18, 4261-9.
- MCHUGH, M. L. 2013. The chi-square test of independence. *Biochem Med (Zagreb)*, 23, 143-9.
- MEHROTRA, S., LANGUINO, L. R., RASKETT, C. M., MERCURIO, A. M., DOHI, T. & ALTIERI, D. C. 2010. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell*, 17, 53-64.
- MUI, A. L. 1999. The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 55, 1547-58.

- NAGTEGAAL, I. D., ODZE, R. D., KLIMSTRA, D., PARADIS, V., RUGGE, M., SCHIRMACHER, P., WASHINGTON, K. M., CARNEIRO, F. & CREE, I. A. 2020. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, 76, 182-188.
- NEFEDOVA, Y., HUANG, M., KUSMARTSEV, S., BHATTACHARYA, R., CHENG, P., SALUP, R., JOVE, R. & GABRILOVICH, D. 2004. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol*, 172, 464-74.
- NETZKER, R. 2012a. Zellzyklus und molekulare Genetik - Der Zellzyklus. In: RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. (eds.) *Duale Reihe - Biochemie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- NETZKER, R. 2012b. Zellzyklus und molekulare Genetik - Die Apoptose. In: RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. (eds.) *Duale Reihe - Biochemie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- NETZKER, R. 2012c. Zellzyklus und molekulare Genetik - Genexpression. In: RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. (eds.) *Duale Reihe - Biochemie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- NETZKER, R. 2012d. Zellzyklus und molekulare Genetik - Gentechnik und Nachweis bzw. Analyse von Nukleinsäuren. *Biochemie - Duale Reihe*. 3 ed. Stuttgart: Thieme.
- NETZKER, R. 2012e. Zellzyklus und molekulare Genetik - Molekulare Onkologie. In: RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. (eds.) *Duale Reihe - Biochemie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- NEUMANN, J.-D. o. J.-a. *Neuroendokrine Neoplasien- Grundlagen und Therapieoptionen* [Online]. München: MedLearning AG. [Accessed 20.07.2021].
- NEUMANN, J.-D. o. J.-b. *Symptomatik und Diagnostik neuroendokriner Tumoren* [Online]. Bonn: MedLearning AG. [Accessed 25.04.2020].
- NOBELS, F. R., KWEKKEBOOM, D. J., COOPMANS, W., SCHOENMAKERS, C. H., LINDEMANS, J., DE HERDER, W. W., KRENNING, E. P., BOUILLON, R. & LAMBERTS, S. W. 1997. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 2622-8.
- ÖBERG, K. 2013. The genetics of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol*, 40, 37-44.
- OBERG, K., COUVELARD, A., DELLE FAVE, G., GROSS, D., GROSSMAN, A., JENSEN, R. T., PAPE, U. F., PERREN, A., RINDI, G., RUSZNIEWSKI, P., SCOAZEC, J. Y., WELIN, S., WIEDENMANN, B. & FERONE, D. 2017. ENETS Consensus Guidelines for Standard of Care in Neuroendocrine Tumours: Biochemical Markers. *Neuroendocrinology*, 105, 201-211.
- OKAYASU, I. 2012. Development of ulcerative colitis and its associated colorectal neoplasia as a model of the organ-specific chronic inflammation-carcinoma sequence. *Pathol Int*, 62, 368-80.
- PAPE, U. F., BÖHMIG, M., BERNDT, U., TILING, N., WIEDENMANN, B. & PLÖCKINGER, U. 2004. Survival and clinical outcome of patients with neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic tract in a german referral center. *Ann N Y Acad Sci*, 1014, 222-33.
- PARK, S. J., NAKAGAWA, T., KITAMURA, H., ATSUMI, T., KAMON, H., SAWA, S., KAMIMURA, D., UEDA, N., IWAKURA, Y., ISHIHARA, K., MURAKAMI, M. & HIRANO, T. 2004. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol*, 173, 3844-54.
- PAVEL, M., ÖBERG, K., FALCONI, M., KRENNING, E. P., SUNDIN, A., PERREN, A. & BERRUTI, A. 2020. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 31, 844-860.
- PEARSE, A. G. 1969. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem*, 17, 303-13.
- PSCHYREMBEL, o. J. *Disseminiertes neuroendokrines System* [Online]. [Accessed 23.04.2020].

- QIAGEN. o. J. *RNeasy Mini Handbook* [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en> [Accessed 27.03.2020].
- RAZ, R., LEE, C. K., CANNIZZARO, L. A., D'EUSTACHIO, P. & LEVY, D. E. 1999. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2846-51.
- REMMELE, W. & STEGNER, H. E. 1987. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*, 8, 138-40.
- REN, X., DUAN, L., HE, Q., ZHANG, Z., ZHOU, Y., WU, D., PAN, J., PEI, D. & DING, K. 2010. Identification of Niclosamide as a New Small-Molecule Inhibitor of the STAT3 Signaling Pathway. *ACS Med Chem Lett*, 1, 454-9.
- REU, S., NEUMANN, J. & KIRCHNER, T. 2012. Gastrointestinale gemischte adenoneuroendokrine Karzinome. Versuch einer Ordnung des Gemischten. *Pathologe*, 33, 31-8.
- RINDI, G., BUFFA, R., SESSA, F., TORTORA, O. & SOLCIA, E. 1986. Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules. *Histochemistry*, 85, 19-28.
- RINKE, A. & GRESS, T. M. 2010. Neuroendokrine Tumoren – Epidemiologie und Endokrinologie. *Visceral Medicine*, 26, 226-232.
- RINKE, A., WIEDENMANN, B. & AUERNHAMMER, C. 2018. S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore. AWMF-Reg. 021-27. *Z Gastroenterol*, 56, 583-681.
- ROCHE. o. J. *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetrics)* [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf> [Accessed 30.03.2020].
- ROGERS, A., WANG, L. M., KARAVITAKI, N. & GROSSMAN, A. B. 2015. Neurofibromatosis Type 1 and pancreatic islet cell tumours: an association which should be recognized. *Qjm*, 108, 573-6.
- SANO, S., CHAN, K. S., CARBAJAL, S., CLIFFORD, J., PEAVEY, M., KIGUCHI, K., ITAMI, S., NICKOLOFF, B. J. & DIGIOVANNI, J. 2005. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*, 11, 43-9.
- SANO, S., ITAMI, S., TAKEDA, K., TARUTANI, M., YAMAGUCHI, Y., MIURA, H., YOSHIKAWA, K., AKIRA, S. & TAKEDA, J. 1999. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *Embo j*, 18, 4657-68.
- SATOH, K., ZHANG, L., ZHANG, Y., CHELLURI, R., BOUFRAQECH, M., NILUBOL, N., PATEL, D., SHEN, M. & KEBEBEW, E. 2016. Identification of Niclosamide as a Novel Anticancer Agent for Adrenocortical Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 22, 3458-66.
- SCHINDLER, C. & DARNELL, J. E., JR. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*, 64, 621-51.
- SCHOTT, M., KLÖPPEL, G., RAFFEL, A., SALEH, A., KNOEFEL, W. & SCHERBAUM, W. 2011. Neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract. *Dtsch Arztebl Int*, 108(18), 305-12.
- SELLECKCHEM. o. J. *Niclosamide Datasheet* [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/datasheet/niclosamide-niclocide-S303002-DataSheet.html> [Accessed 19.03.2020].
- SHANG, S., HUA, F. & HU, Z. W. 2017. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*, 8, 33972-33989.
- SIVEEN, K. S., SIKKA, S., SURANA, R., DAI, X., ZHANG, J., KUMAR, A. P., TAN, B. K., SETHI, G. & BISHAYEE, A. 2014. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 1845, 136-54.
- SORBYE, H., STROSBURG, J., BAUDIN, E., KLIMSTRA, D. S. & YAO, J. C. 2014. Gastroenteropancreatic high-grade neuroendocrine carcinoma. *Cancer*, 120, 2814-23.
- SORBYE, H., WELIN, S., LANGER, S. W., VESTERMARK, L. W., HOLT, N., OSTERLUND, P., DUELAND, S., HOFSLI, E., GUREN, M. G., OHRLING, K., BIRKEMEYER, E.,

- THIIS-EVENSEN, E., BIAGINI, M., GRONBAEK, H., SOVERI, L. M., OLSEN, I. H., FEDERSPIEL, B., ASSMUS, J., JANSON, E. T. & KNIGGE, U. 2013. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol*, 24, 152-60.
- STROSBERG, J. R., COPPOLA, D., KLIMSTRA, D. S., PHAN, A. T., KULKE, M. H., WISEMAN, G. A. & KVOLS, L. K. 2010. The NANETS consensus guidelines for the diagnosis and management of poorly differentiated (high-grade) extrapulmonary neuroendocrine carcinomas. *Pancreas*, 39, 799-800.
- SUBRAMANIAM, A., SHANMUGAM, M. K., PERUMAL, E., LI, F., NACHIYAPPAN, A., DAI, X., SWAMY, S. N., AHN, K. S., KUMAR, A. P., TAN, B. K., HUI, K. M. & SETHI, G. 2013. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 1835, 46-60.
- SWANN, J. B. & SMYTH, M. J. 2007. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*, 117, 1137-46.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2000. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11, 199-207.
- TAKEDA, K., CLAUSEN, B. E., KAISHO, T., TSUJIMURA, T., TERADA, N., FORSTER, I. & AKIRA, S. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10, 39-49.
- TAKEDA, K., NOGUCHI, K., SHI, W., TANAKA, T., MATSUMOTO, M., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3801-4.
- TURKSON, J. & JOVE, R. 2000. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*, 19, 6613-26.
- U. S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. o. J. *clinical trials - niclosamide | cancer* [Online]. [Accessed 03.09.2021].
- VALENTA, T., HAUSMANN, G. & BASLER, K. 2012. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *Embo j*, 31, 2714-36.
- WAKE, M. S. & WATSON, C. J. 2015. STAT3 the oncogene - still eluding therapy? *FEBS J*, 282, 2600-11.
- WEGENKA, U. M., BUSCHMANN, J., LÜTTICKEN, C., HEINRICH, P. C. & HORN, F. 1993. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol*, 13, 276-88.
- WEI, D., LE, X., ZHENG, L., WANG, L., FREY, J. A., GAO, A. C., PENG, Z., HUANG, S., XIONG, H. Q., ABBRUZZESE, J. L. & XIE, K. 2003. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene*, 22, 319-29.
- WEICH, A., ROGOLL, D., GAWLAS, S., MAYER, L., WEICH, W., PONGRACZ, J., KUDLICH, T., MEINING, A. & SCHEURLEN, M. 2021. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Regulates CXCR4 Expression and [(68)Ga] Pentixafor Internalization in Neuroendocrine Tumor Cells. *Diagnostics (Basel)*, 11.
- WELIN, S., SORBYE, H., SEBJORNSSEN, S., KNAPPSKOG, S., BUSCH, C. & OBERG, K. 2011. Clinical effect of temozolomide-based chemotherapy in poorly differentiated endocrine carcinoma after progression on first-line chemotherapy. *Cancer*, 117, 4617-22.
- WELSCH, U. 2006. Die Zelle - Zellzyklus. *Lehrbuch Histologie*. 2 ed. München: Urban & Fischer Verlag
- WIEDENMANN, B., JOHN, M., AHNERT-HILGER, G. & RIECKEN, E. O. 1998. Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *J Mol Med (Berl)*, 76, 637-47.
- WIELAND, A., TRAGESER, D., GOGOLOK, S., REINARTZ, R., HOFER, H., KELLER, M., LEINHAAS, A., SCHELLE, R., NORMANN, S., KLAAS, L., WAHA, A., KOCH, P., FIMMERS, R., PIETSCH, T., YACHNIS, A. T., PINCUS, D. W., STEINDLER, D. A.,

- BRUSTLE, O., SIMON, M., GLAS, M. & SCHEFFLER, B. 2013. Anticancer effects of niclosamide in human glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19, 4124-36.
- WILLIAMS, E. D. & SANDLER, M. 1963. The classification of carcinoid tumours. *Lancet*, 1, 238-9.
- XIONG, H., ZHANG, Z. G., TIAN, X. Q., SUN, D. F., LIANG, Q. C., ZHANG, Y. J., LU, R., CHEN, Y. X. & FANG, J. Y. 2008. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells. *Neoplasia*, 10, 287-97.
- YACHIDA, S., VAKIANI, E., WHITE, C. M., ZHONG, Y., SAUNDERS, T., MORGAN, R., DE WILDE, R. F., MAITRA, A., HICKS, J., DEMARZO, A. M., SHI, C., SHARMA, R., LAHERU, D., EDIL, B. H., WOLFGANG, C. L., SCHULICK, R. D., HRUBAN, R. H., TANG, L. H., KLIMSTRA, D. S. & IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. 2012. Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol*, 36, 173-84.
- YAO, J. C., HASSAN, M., PHAN, A., DAGOHAY, C., LEARY, C., MARES, J. E., ABDALLA, E. K., FLEMING, J. B., VAUTHEY, J. N., RASHID, A. & EVANS, D. B. 2008. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol*, 26, 3063-72.
- YIN, W., CHEEPALA, S., ROBERTS, J. N., SYSON-CHAN, K., DIGIOVANNI, J. & CLIFFORD, J. L. 2006. Active Stat3 is required for survival of human squamous cell carcinoma cells in serum-free conditions. *Mol Cancer*, 5, 15.
- YOO, J. Y., HUSO, D. L., NATHANS, D. & DESIDERIO, S. 2002. Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell*, 108, 331-44.
- YOU, S., LI, R., PARK, D., XIE, M., SICA, G. L., CAO, Y., XIAO, Z. Q. & DENG, X. 2014. Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 13, 606-16.
- YU, H. & JOVE, R. 2004. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, 4, 97-105.
- ZHONG, Z., WEN, Z. & DARNELL, J. E., JR. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264, 95-8.
- ZYTOMED SYSTEMS. o. J. *ZytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spectrum* [Online]. Available: file:///C:/Users/Michael/Desktop/DISS\_DATEN\_AKTUELL/1.1.Schreiben%20und%20Vorlagen/HRPXXX.pdf [Accessed 28.03.2020].



## VIII. Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfram T. Knoefel für die Möglichkeit, die Dissertation in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie durchführen zu können.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Krieg für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe, die Vergabe des Dissertationsthemas, die ausdauernde und gute Begleitung sowie die mühevollen Hilfe während der Promotionszeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Levent Dizdar für seine große Mühe, Geduld und stetige Hilfe bei Versuchsaufbauten, -auswertungen und zahlreichen Korrekturen. Vielen Dank für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten, das Erklären der Zusammenhänge und die Beantwortung aller meiner Fragen.

Vielen Dank allen Mitarbeitern des Chirurgischen Forschungslabors für gute Ratschläge, detaillierte Einarbeitung und eine positive Atmosphäre während des Forschungsteils meiner Arbeit.

Ich bin dankbar für meine Freunde, die mir durch ihre offenen Ohren, aufbauende und ermutigende Worte und herzliche Taten ihr Verständnis gezeigt und ihre Unterstützung stets gegeben haben.

Ich danke meiner gesamten Familie, auf deren starken Rückhalt und immerwährende Motivierung ich während meines gesamten Medizinstudiums zählen konnte und die meine Ausbildung durch ihren Zuspruch, ihre Unterstützung und Liebe möglich macht.

Ich bin dankbar, solch großartige Menschen, die ich Freunde und Familie nennen darf, an meiner Seite zu wissen.

Last, but absolutely not least und von ganzem Herzen gilt mein innigster Dank meinem Ehemann Michael. Ihm widme ich diese Arbeit. Danke für Deine bedingungslose Liebe! Danke für Deine treue Unterstützung! Es fühlt sich leicht an, mit Dir auf einem Weg zu gehen. Ich bin sehr glücklich, mit Dir gemeinsam vertrauen zu dürfen, dass alles, was ist und wie es ist, gut ist. – So wie es auch in unserem Trauers aus Psalm 32, 10b heißt: „Wer dem Herrn vertraut, wird seine Güte erfahren.“