

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

**HDACs: Potentielle Zielstrukturen in der Therapie  
gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Annika Michaela Klein  
2024

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Christoph Roderburg

Wer immer tut, was er schon kann,  
bleibt immer das, was er schon ist.

*Henry Ford*

## I. Zusammenfassung

Neuroendokrine Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NEN) stellen eine seltene Gruppe von Tumoren dar, die prinzipiell in zahlreichen Organen auftreten können und durch ein heterogenes klinisches und biologisches Verhalten gekennzeichnet sind. Entsprechend der WHO-Klassifikation von 2022 werden die GEP-NEN anhand eines proliferationsbasierten Gradings in gut differenzierte neuroendokrine Tumore (NET) und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC) unterteilt. Dabei zeichnen sich insbesondere NEC durch eine außerordentlich hohe Resistenz gegenüber einer konventionellen Chemotherapie aus.

Ein vielversprechender Angriffspunkt in der medikamentösen Krebs therapie ist die Hemmung von Histondeacetylasen (HDACs) durch sogenannte Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACIs). HDACs sind eine Gruppe epigenetisch modifizierender Enzyme, die eine wichtige Rolle bei der Genexpression spielen und deren Fehlregulation mit der Tumorigenese in Verbindung gebracht wird. In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise, dass zahlreiche HDACs in neuroendokrinen Tumoren aberrant exprimiert werden.

In den durchgeführten Experimenten wurde die Wirkung der nicht-selektiven Pan-HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat und Panobinostat sowie der selektiven HDAC-Inhibitoren Entinostat und Droxinostat auf die Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 untersucht.

Mittels MTS-Assays wurde die Reduktion der Zellviabilität nach der Behandlung mit HDAC-Inhibitoren bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität vor allem der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE3 durch die HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Entinostat, Belinostat und Panobinostat.

In den anschließend durchgeführten Zellzyklus-FACS- und Western-Blot-Analysen wurde die Apoptoseinduktion sowie der Einfluss der HDAC-Inhibition auf die Expression antiapoptotischer Proteine der *Inhibitor-of-Apoptosis-Protein-Familie* (IAP) untersucht. Es konnte eine dosisabhängige Reduktion der IAPs in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE3 durch Vorinostat, Entinostat, Belinostat und Panobinostat festgestellt werden.

Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise von HDACIs und bieten einen möglichen neuen zielgerichteten Therapieansatz für NEC.

## II. Summary

Neuroendocrine neoplasms of the gastroenteropancreatic system (GEP NEN) represent a rare entity of tumors that can occur in numerous organs and are characterized by heterogeneous clinical and biological behavior. According to the WHO classification of 2022, GEP NEN are divided into well differentiated neuroendocrine tumors (NET) and poorly differentiated neuroendocrine carcinomas (NEC) using proliferation-based grading. NEC in particular are characterized by an extraordinarily high resistance to conventional chemotherapy.

A promising target in drug cancer therapy is the inhibition of histone deacetylases (HDACs) using histone deacetylase inhibitors (HDACIs). HDACs are a group of epigenetic modifying enzymes that play an important role in gene expression and whose dysregulation has been linked to tumorigenesis. In this context, there is evidence that numerous HDACs are aberrantly expressed in neuroendocrine tumors. In the experiments carried out, the effect of the non-selective pan HDAC inhibitors vorinostat, belinostat and panobinostat as well as the selective HDAC inhibitors entinostat and droxinostat on the cell lines NEC DUE1, NEC DUE2 and NEC DUE3 was examined.

The reduction in cell viability after treatment with HDAC inhibitors was determined using MTS assays. This showed a significant reduction in cell viability, especially in the cell lines NEC DUE1 and NEC DUE3, due to the HDAC inhibitors vorinostat, entinostat, belinostat and panobinostat.

In the subsequent cell cycle FACS and Western blot analyses, the induction of apoptosis and the influence of HDAC inhibition on the expression of antiapoptotic proteins of the inhibitor of apoptosis protein family (IAP) were examined. A dose-dependent reduction of IAPs in the cell lines NEC DUE1 and NEC DUE3 was determined by vorinostat, entinostat, belinostat and panobinostat.

These findings provide the basis for further investigations into the mode of action of HDACIs and offer a potential new targeted therapeutic approach for NEC.

### III. Abkürzungsverzeichnis

<b>BIR</b>	Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CAD</b>	Caspase-Activated DNase
<b>cIAP</b>	cellular Inhibitor of Apoptosis Protein
<b>CPC</b>	Chromosomal Passenger Complex
<b>DISC</b>	Death-Inducing Signaling Complex
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DR</b>	Death Receptor
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>ENETS</b>	European Neuroendocrine Tumor Society
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
<b>FADD</b>	Fas-Associated Death Domain Protein
<b>Fas-L</b>	Fas-Ligand
<b>FBS</b>	fetal bovine serum, Kälberserum
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration
<b>FDG-PET/CTs</b>	Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie/ -Computertomographie
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GEP-NEC</b>	Gastroenteropankreatisches neuroendokrines Karzinom
<b>GEP-NEN</b>	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasie
<b>HAT</b>	Histonacetylasen
<b>HDAC</b>	Histon-Deacetylasen
<b>HDACI</b>	Histon-Deacetylase-Inhibitor
<b>IAP</b>	Inhibitor of Apoptosis Protein
<b>IC50</b>	Mittlere Hemmkonzentration
<b>INCENP</b>	Inner Centromere Protein
<b>LBH589</b>	Panobinostat
<b>LC-NEC</b>	Large Cell Neuroendocrine Carcinoma, großzelliges neuroendokrines Karzinom
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>MPTP</b>	Mitochondrial Permeability Transition Pore
<b>MS-275</b>	Entinostat

<b>mTOR</b>	mammalian Target of Rapamycin
<b>n</b>	Stichprobengröße
<b>NAD</b>	Nicotinamidadenindinukleotid
<b>NEC</b>	Neuroendocrine Carcinoma, neuroendokrines Karzinom
<b>NET</b>	Neuroendocrine Tumor, neuroendokriner Tumor
<b>NFκB</b>	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells
<b>NS 41080</b>	Droxinostat
<b>p</b>	Signifikanzniveau, p-Wert
<b>PARP</b>	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>PXD101</b>	Belinostat
<b>RING</b>	Really Interesting New Gene
<b>RIPA</b>	Radioimmunpräzipitations-Assay
<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>SAHA</b>	Suberoylanilid-Hydroxamsäure, Vorinostat
<b>SC-NEC</b>	Small Cell Neuroendocrine Carcinoma kleinzelliges neuroendokrines Karzinom
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SEER</b>	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
<b>TAD</b>	Topologically Associating Domains
<b>TBS</b>	Tris-Buffered Saline
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TRAIL</b>	TNF-Relates Apoptosis-Inducing Ligand
<b>UBA</b>	Ubiquitin-assoziierten Domäne
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VEGFR</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptors
<b>vs.</b>	versus
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>XIAP</b>	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>Zn</b>	Zink

## IV. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung</b> .....	<b>IV</b>
<b>II. Summary</b> .....	<b>V</b>
<b>III. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>IV. Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>V. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>VI. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Neuroendokrine Neoplasien</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Inzidenz und Prognose.....	2
1.1.2 Diagnostik .....	3
1.1.3 Histopathologische Besonderheiten.....	3
1.1.4 Therapie.....	4
1.1.5 Neue Therapieansätze .....	5
<b>1.2 Apoptose</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Intrinsischer (mitochondrialer) Signalweg.....	7
1.2.2 Extrinsischer (rezeptorabhängiger) Signalweg .....	7
1.2.3 Exekutionsphase .....	8
1.2.4 Inhibitor of Apoptosis Proteine .....	8
1.2.5 Survivin .....	9
1.2.6 X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) .....	10
1.2.7 Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) und 2 (cIAP2) .....	11
1.2.8 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) .....	11
<b>1.3 HDAC-Inhibitoren</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Epigenetik und Histonmodifikation .....	12
1.3.2 Klassifikation der HDACs.....	14
1.3.3 Wirkweise der HDAC-Inhibitoren.....	15
1.3.4 Klassifikation der HDAC-Inhibitoren .....	17
<b>1.4 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 Laborgeräte.....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.3 Chemikalien .....	23
2.1.4 Zytostatika .....	24
2.1.5 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen .....	24
2.1.6 Antikörper .....	25
2.1.7 Software.....	26
2.1.8 Zelllinien.....	26
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.2.1 Zellkultivierung .....	27
2.2.2 Kryokonservierung der Zellen.....	28
2.2.3 Lebendzellzahlbestimmung .....	28
2.2.4 Behandlung der Zellen mit Compounds .....	29
2.2.5 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay.....	29
2.2.6 Proteinisolation und Proteinmengenbestimmung .....	29
2.2.6 Gelelektrophorese .....	30
2.2.7 Western Blot und Detektion.....	31

2.2.8	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) .....	33
2.2.9	Statistische Auswertung .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Reduktion der Zellviabilität und Acetylierung von Histon H3 und $\alpha$ -Tubulin durch die HDAC-Inhibitoren .....	35
3.2	Apoptoseinduktion und Expression der IAP nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren....	42
3.2.1	Apoptoseinduktion und Expression der IAP nach Behandlung mit Pan-HDAC-Inhibitoren.....	43
3.2.2	Apoptoseinduktion und Expression der IAP nach Behandlung mit selektiven HDAC-Inhibitoren	48
3.2.3	Zusammenfassung der veränderten IAP-Expression nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren....	52
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1	Chemosensitivität der GEP-NEC gegenüber HDAC-Inhibitoren.....	54
4.1.1	HDAC-Inhibitoren reduzieren Zellviabilität von GEP-NEC.....	55
4.1.2	HDAC-Inhibitoren führen zur Proteinacetylierung in GEP-NEC .....	55
4.2	HDAC-Inhibitoren induzieren Apoptose in GEP-NEC-Zellen in vitro .....	56
4.3	Bedeutung der IAP in der Therapie der GEP-NEC .....	57
4.3.1	Survivin als therapeutisches Ziel in GEP-NEC.....	58
4.3.2	XIAP als therapeutisches Ziel in GEP-NEC .....	59
4.3.3	Einfluss von Pan-HDAC-Inhibitoren auf IAP in GEP-NEC in vitro.....	60
4.3.4	Einfluss von selektiven HDAC-Inhibitoren auf IAP in GEP-NEC in vitro.....	61
4.4	Schlussfolgerung .....	62
<b>VII.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>

## V. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Therapieoptionen gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome abhängig vom Befund .....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung der Histonacetylierung mit Entfaltung des Chromatins ...	13
Abb. 3: Zellviabilität und Proteinacetylierung der Zellreihe NEC-DUE1 nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren .....	37
Abb. 4: Zellviabilität und Proteinacetylierung der Zellreihe NEC-DUE2 Behandlung mit HDAC-Inhibitoren .....	39
Abb. 5: Zellviabilität und Proteinacetylierung der Zellreihe NEC-DUE3 nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren .....	41
Abb. 6: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Vorinostat .....	43
Abb. 7: Expression der IAPs nach Behandlung mit Vorinostat .....	44
Abb. 8: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Belinostat .....	45
Abb. 9: Expression der IAPs nach Behandlung mit Belinostat.....	46
Abb. 10: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Panobinostat .....	47
Abb. 11: Expression der IAPs nach Behandlung mit Panobinostat .....	48
Abb. 12: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Entinostat.....	49
Abb. 13: Expression der IAPs nach Behandlung mit Entinostat .....	50
Abb. 14: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Droxinostat .....	51
Abb. 15: Expression der IAPs nach Behandlung mit Droxinostat .....	51

## VI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien nach der WHO-Klassifikation von 2022.....	1
Tabelle 2: Klassifikation der HDACs.....	14
Tabelle 3: Klassifikation der HDAC-Inhibitoren .....	17
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Laborgeräte.....	22
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chemikalien .....	24
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Zytostatika .....	24
Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen .....	25
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	26
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software.....	26
Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Zelllinien mit Angabe der Entnahmestelle, des Ki67-Index und des Tumorstadiums.....	27
Tabelle 12: Konzentrationen der Compounds für die Inkubation der Zellen zur Proteinanalyse .....	30
Tabelle 13: Zusammensetzung der Elektrophoresegele .....	31
Tabelle 14: Übersicht über die Antikörper mit Angabe der verwendeten Verdünnung, Blockierlösung, SDS-Gel und Sekundärantikörper sowie Größe des Proteins .....	33
Tabelle 15: Konzentrationen der Compounds für die Inkubation der Zellen zur FACS-Analyse .....	33
Tabelle 16: Statistische Auswertung der Viabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Compound-Konzentrationen nach Behandlung der Zellreihe NEC-DUE1 .....	38
Tabelle 17: Statistische Auswertung der Viabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Compound-Konzentrationen nach Behandlung der Zellreihe NEC-DUE2 .....	40
Tabelle 18: Statistische Auswertung der Viabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Compound-Konzentrationen nach Behandlung der Zellreihe NEC-DUE3 .....	42
Tabelle 19: Übersicht über veränderte Expression der IAPs nach Behandlung mit den einzelnen HDAC-Inhibitoren.....	52

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroendokrine Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien haben ihren Ursprung im Neuroektoderm. Sie entstehen aus neuroendokrinen Zellen, die dem diffusen neuroendokrinen System angehören und im Oberflächenepithel verschiedener Organe lokalisiert sind. Sie produzieren und sezernieren Botenstoffe, die z.B. Einfluss auf Verdauungs- und Stoffwechselprozesse nehmen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die gastroenteropankreatischen Neoplasien (GEP-NEN).

Die Gruppe der GEP-NEN ist äußerst heterogen und umfasst sowohl die gut differenzierten neuroendokrinen Tumore (NET) als auch die hochgradigen, schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinome (NEC) (Milione et al., 2017), wobei die Einteilung nach den Kriterien der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2022 erfolgt. NETs werden abhängig von der Mitoserate bzw. dem Ki-67/MIB-1-Index in drei verschiedene Differenzierungsgrade eingeteilt. NEC hingegen sind per definitionem hochgradige Neoplasien mit  $> 20$  Mitosen/2 mm<sup>2</sup> bzw. einem Ki-67/MIB-1-Index  $> 20$  % und unterscheiden sich des Weiteren in einer groß- oder kleinzelligen Zytomorphologie (Rindi et al., 2022).

Neuroendokrine Neoplasie (NEN)		
	Neuroendokriner Tumor (NET)	Neuroendokrines Karzinom (NEC)
Differenzierung	Gut differenziert	Schlecht differenziert
Graduierung/Klassifizierung	G1 ( $< 2$ Mitosen/2 mm <sup>2</sup> bzw. Ki67 $< 3\%$ ) G2 (2–20 Mitosen/2 mm <sup>2</sup> bzw. Ki67 3–20%) G3 ( $> 20$ Mitosen/2 mm <sup>2</sup> bzw. Ki67 $> 20\%$ )	per definitionem G3  Großzelliges NEC Kleinzelliges NEC

**Tabelle 1: Einteilung der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien nach der WHO-Klassifikation von 2022**

Alle neuroendokrinen Neoplasien sind potenziell maligne, unterscheiden sich jedoch in ihrer Proliferationsrate und in ihrer Wahrscheinlichkeit zu metastasieren (Bosman, Carneiro, Hruban, & N.D., 2010; Rindi et al., 2022).

### 1.1.1 Inzidenz und Prognose

Nach Auswertungen der Daten des Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER) der Vereinigten Staaten von Amerika treten GEP-NEN bei 5,25/100.000 Personen pro Jahr auf (Yao et al., 2008). Die Inzidenz von GEP-NEC liegt bei 0,5-0,8/100.000 Personen (Dasari, Mehta, Byers, Sorbye, & Yao, 2018). Insgesamt ist in den letzten Jahren ein Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen, der in erster Linie auf die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten zurückgeführt wird (Korse, Taal, van Velthuysen, & Visser, 2013). Die höchste Auftretenswahrscheinlichkeit wird zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr beobachtet (Niederle, Hackl, Kaserer, & Niederle, 2010). Da die meisten NEC anders als die gut differenzierten NEN nicht durch hormonelle Dysfunktionen in Erscheinung treten, präsentieren sich die Patienten mit Beschwerden, die von der Lokalisation des Tumors abhängig sind und mit allgemeinen Symptomen einer fortgeschrittenen Krebserkrankung wie Gewichtsverlust und Fatigue (Garcia-Carbonero et al., 2016). Zwei Drittel der Patient:innen mit einem GEP-NEC haben daher zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon eine fortgeschrittene Tumorausdehnung und je nach Ursprungsgewebe findet man in 62-67 % der Fälle bereits eine Fernmetastasierung, wobei Lebermetastasen mit einem Anteil von 70 % am häufigsten sind (Kang et al., 2007; Sorbye et al., 2013).

Patient:innen, bei denen ein NEC diagnostiziert wurde, haben eine mittlere Überlebensrate von nur 4-16 Monaten (Ilett et al., 2015), unter anderem, weil die Karzinome und Metastasen vieler Patient:innen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits nicht mehr kurativ resezierbar sind (Modlin et al., 2008). Bei multipel metastasierten GEP-NEC beträgt die mittlere Überlebenszeit unter *best supportive care* ca. einen Monat und unter der besten verfügbaren Therapie bis zu 12-19 Monate (Garcia-Carbonero et al., 2016). Insgesamt scheint die Überlebensprognose bei großzelligen NEC besser zu sein als bei kleinzelligen NEC (Sorbye et al., 2023).

Bei Vorliegen eines metastasierten NEC haben Patient:innen mit einem Primarius im Ösophagus oder Kolon statistisch gesehen eine schlechtere Prognose als Patient:innen mit einem Primarius an einer anderen Lokalisation (Sorbye et al., 2023).

### 1.1.2 Diagnostik

Im Plasma lassen sich bei Patient:innen mit NEC neuroendokrine Marker wie Chromogranin A und die neuronenspezifische Enolase messen. Bisher ist die Aussagekraft dieser zirkulierenden Tumormarker für NEC jedoch nicht ausreichend untersucht und nachgewiesen worden (Garcia-Carbonero et al., 2016). Das aktuelle *guidance paper* der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) von 2023 fasst zusammen, dass aktuell keine im Blut messbaren Biomarker für die Routinediagnostik eines NEC etabliert sind (Sorbye et al., 2023).

Bei GEP-NEC wird eine entsprechende endoskopische oder endosonographische Untersuchung mit einer Biopsie zur histopathologischen Untersuchung empfohlen. Obligat ist außerdem die Durchführung einer Computertomographie des Thorax und des Abdomens zur Evaluation der Tumorausdehnung und der Detektion von Metastasen (Breitling, Rinke, & Gress, 2019; Garcia-Carbonero et al., 2016; Sorbye et al., 2023).

Das aktuelle *guidance paper* der ENETS empfiehlt aufgrund des hohen Metastasierungsrisikos außerdem die Durchführung eines FDG-PET/CTs bei einem örtlich begrenzten Befund vor einer Operation oder einer adjuvanten Chemotherapie (V. Ambrosini et al., 2021; Sorbye et al., 2023).

### 1.1.3 Histopathologische Besonderheiten

Bei der histopathologischen und der immunhistochemischen Untersuchung von GEP-NEC sind die neuroendokrinen Marker und der Proliferationsindex Ki-67/MIB-1-Index obligat (Garcia-Carbonero et al., 2016). Anhand der Zytomorphologie lassen sich die GEP-NEC in *small cell* NEC (SC-NEC) und *large cell* NEC (LC-NEC) unterscheiden (Sorbye et al., 2023).

Neuroendokrine Zellen zeichnen sich unter anderem durch die Expression neuroendokriner Marker wie Chromogranin A, Synaptophysin und neuronenspezifische Enolase aus. Insbesondere bei SC-NEC können in seltenen Fällen (< 5 %) weder Synaptophysin noch Chromogranin A detektiert werden (Sorbye et al., 2013). Hier kann der Transkriptionsfaktor INSM1 mit einer Sensitivität von 85% bei der Diagnose eines NEC hilfreich sein (McHugh, Mukhopadhyay, Doxtader, Lanigan, & Allende, 2020). Bei schlecht differenzierten Karzinomen korreliert der

immunohistochemische Nachweis mehrerer neuroendokriner Marker mit einer höheren 5-Jahres-Überlebensrate (Faggiano et al., 2007).

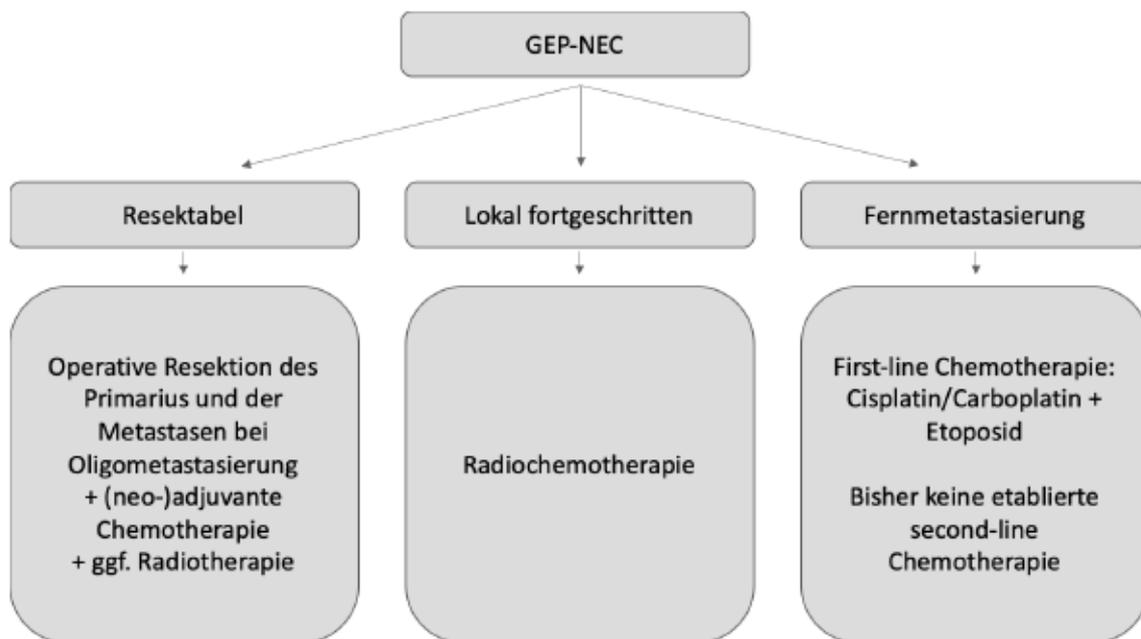
#### 1.1.4 Therapie

Die Europäische Gesellschaft für Neuroendokrine Tumoren (ENETS) wurde 2004 gegründet und hat sich zum Ziel gesetzt, die Diagnostik und Therapie von NET voranzutreiben. Zu diesem Zweck werden unter anderem regelmäßig aktualisierte Leitlinien zur standardisierten Therapie von NEN herausgegeben. Gemäß der ENETS-Leitlinie von 2016 wird die höchste Überlebensrate bei einer lokal begrenzten Tumorausdehnung durch eine Kombination aus einer adjuvanten, Platin-basierten Chemotherapie mit einer Operation oder Radiotherapie oder einer Kombination aus allen drei Therapieoptionen erzielt (Garcia-Carbonero et al., 2016). Insbesondere bei ösophagealen und analen NEC wird im aktuellen *guidance paper* der ENETS eine initiale Radiochemotherapie empfohlen (Sorbye et al., 2023).

Bezüglich der Wirksamkeit einer neoadjuvanten Chemotherapie ist die Datenlage unzureichend. Die ENETS befürwortet eine neoadjuvante Chemotherapie, wenn die Rezidivwahrscheinlichkeit als sehr hoch eingeschätzt wird oder eine Beobachtungsperiode vor einer Operation gewünscht wird, um zu sehen, ob unter Chemotherapie ein Tumorprogress stattfindet (Sorbye et al., 2023).

Abb. 1 zeigt die verschiedenen Therapiearme entsprechend der Tumorausdehnung. Beim lokal fortgeschrittenen Primärtumor oder, wenn eine Operation aufgrund des Allgemeinzustands und der Komorbiditäten der Patient:innen ausgeschlossen ist, wird eine Bestrahlung des Tumors in Kombination mit einer Chemotherapie empfohlen (Garcia-Carbonero et al., 2016; Strosberg et al., 2010).

Bei multipel metastasierten GEP-NEC wird die palliative Erstlinien-Chemotherapie mit Cisplatin oder Carboplatin in Kombination mit Etoposid durchgeführt. Die Ansprechraten betragen jedoch nur ca. 30 % und in ca. 40 % kann ein *stable disease* erreicht werden (Garcia-Carbonero et al., 2016; Sorbye et al., 2013). Vergleichbare Ansprechraten erzielt die kombinierte Gabe von Irinotecan und Cisplatin, sodass dieses Regimen eine alternative, aber bisher nicht etablierte Erstlinientherapie darstellt (Morizane et al., 2022; Sorbye et al., 2023; P. Zhang et al., 2020).



**Abb. 1: Therapieoptionen gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome abhängig vom Befund**

Eine standardisierte Zweitlinientherapie existiert derzeit nicht (Garcia-Carbonero et al., 2016; Okuyama et al., 2020; Sorbye et al., 2023). Die höchste Evidenz besteht laut ENETS *guidance paper* für die Kombination aus Flouropyrimidinen mit Irinotecan (Sorbye et al., 2023).

Von einem Debulking bzw. zytoreduktiver Chirurgie wird abgeraten (Garcia-Carbonero et al., 2016; Sorbye et al., 2023).

### 1.1.5 Neue Therapieansätze

Da Schlüsselmutationen bei NEC vorkommen, sollte eine frühzeitige Panel-Sequenzierung erfolgen und abhängig davon eine Therapie mit BRAF-Inhibitoren in Betracht gezogen werden (Klempner et al., 2016; Sorbye et al., 2023).

Bei NEN ist der Phosphatidylinositol-3-Kinase-AKT-mTOR-Signalweg, der in der Angiogenese und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle spielt, häufig dysreguliert. Vor allem bei schlecht differenzierten NEC konnte eine deutlich erhöhte Expression des mTOR festgestellt werden (Auernhammer & Goke, 2011; Catena et al., 2011). Das Immunsuppressivum Everolimus inhibiert mTOR spezifisch und führte in der RADIANT-3-Studie bei Patient:innen mit inoperablem niedrig bis mittelgradigem NET des Pankreas zu einem mittleren progressionsfreien Überleben

von 11 Monaten im Vergleich zu 4,6 Monaten in der Placebogruppe (Yao et al., 2011). Im NECTOR-Trial konnte allerdings gezeigt werden, dass die Wirksamkeit der Everolimus-Monotherapie bei schlecht differenzierten NEC mit einem mittleren progressionsfreien Überleben von 1,2 Monaten gering war (Okuyama et al., 2020).

Sunitinib, ein Multityrosinkinaseinhibitor, hemmt die Rezeptoren des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGFR) und greift damit ebenfalls in die Angiogenese und die Wirkung von Wachstumsfaktoren ein. Obwohl die Studienergebnisse unterschiedlich sind, scheinen Patient:innen unter der Einnahme von Sunitinib vor allem von einer Stabilisierung der Erkrankung zu profitieren (Auernhammer, Spitzweg, Heinemann, & Goke, 2012; Raymond et al., 2011).

Immuntherapie kann im Falle einer Mikrosatelliteninstabilität oder einer hohen Tumormutationslast sinnvoll sein (Sorbye et al., 2023).

Für zielgerichtete Therapeutika gibt es seitens der ENETS keine Empfehlung zum Einsatz in der Erstlinientherapie aufgrund einer unzureichenden Datenlage (Sorbye et al., 2023).

## **1.2 Apoptose**

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und ein wichtiger Mechanismus bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Zellpopulationen in menschlichen Geweben (Elmore, 2007). Ein weiterer für die Gesundheit essentieller Mechanismus ist die Induktion des programmierten Zelltods bei fehlerhaften oder beschädigten Zellen über verschiedene Signalwege (Elmore, 2007). Wenn die Apoptose aus bestimmten Gründen in beschädigten Zellen verhindert wird, kann dies zu einem übermäßigen und unkontrollierten Zellwachstum und damit letztendlich zu einer Krebserkrankung führen (D'Arcy, 2019).

Die Apoptose kann durch die Zelle selbst induziert werden, aber auch z.B. durch Immunzellen, die die beschädigte Zelle von außen detektieren (D'Arcy, 2019). Der intrinsische und der extrinsische Signalweg führen beide zur Initiierung der Caspase-Kaskade oder auch Ausführungsphase genannt, die dazu führt, dass die Zelle sich in kleine Apoptosevesikel fragmentiert, welche durch umgebende Zellen phagozytiert werden können (D'Arcy, 2019; Jan & Chaudhry, 2019).

### 1.2.1 Intrinsischer (mitochondrialer) Signalweg

Die intrinsische Apoptose kann entweder durch das Auftreten oder durch die Abwesenheit bestimmter Signalmoleküle ausgelöst werden (D'Arcy, 2019; Elmore, 2007).

Die Aktivierung proapoptotischer Moleküle erfolgt durch das Fehlen bestimmter Signalmoleküle wie Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren im Zytoplasma. Ein weiterer Aktivierungsweg für proapoptotische Moleküle ist die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies, Toxinen oder ein deutlich erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel (Elmore, 2007; Green & Kroemer, 2004). Durch diese positiven oder negativen Stimuli öffnet sich die *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP) und die proapoptotischen Proteine Cytochrom C und Smac/DIABLO gelangen aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma (D'Arcy, 2019). Cytochrom C führt zur Aktivierung der Caspase 9, die wiederum eine Aktivierung der Caspase 3 bewirkt. Caspase 3 kann schließlich die Caspase-Kaskade auslösen. Smac/DIABLO hemmt, wie unten beschrieben, die IAPs und unterstützt so den Ablauf der Apoptose (D'Arcy, 2019).

### 1.2.2 Extrinsischer (rezeptorabhängiger) Signalweg

Die extrinsische Apoptose wird ausgelöst durch z.B. natürliche Killerzellen oder Makrophagen, die Signalmoleküle wie Tumornekrosefaktor (TNF), *Fas Ligand* (Fas-L) und *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL) absondern. Diese Signalmoleküle binden an entsprechende Rezeptoren in der Membran der Zielzelle, wie z.B. TNF-Rezeptor 1, Fas-Rezeptor oder TRAIL-Rezeptor und aktivieren diese (D'Arcy, 2019; Jan & Chaudhry, 2019). Durch diese Aktivierung bildet sich auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors ein *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC). Dieser rekrutiert das *Fas-Associated Death Domain Protein* (FADD), das wiederum über mehrere Schritte Caspase 8 aktiviert. Die aktivierte Caspase 8 kann sich schließlich aus diesem Komplex lösen und die Caspase-Kaskade auslösen (D'Arcy, 2019; Elmore, 2007; Jan & Chaudhry, 2019).

### 1.2.3 Exekutionsphase

Die Exekutionsphase ist die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs der Apoptose. Die Initiatorcaspasen 8 und 9 spalten und aktivieren damit die Effektorcaspasen 3, 6, 7 und 10 sowie die *Caspase Activated DNase* (CAD) und *Poly(ADP-ribose)-Polymerase* (PARP). Die Caspase 3 initiiert die Abschnürung der Zelle in Apoptosevesikel durch die Zerstörung des Zytoskeletts und aktiviert die zytoplasmatische Endonuklease CAD, die dann zur Chromatinkondensation und damit DNA-Fragmentierung im Zellkern führt (Elmore, 2007). Die apoptotische Zelle exprimiert spezielle Liganden, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, wie z.B. Annexin I and Calreticulin und zu einer frühzeitigen Phagozytose durch benachbarte Zellen führen. Dieser Vorgang resultiert in einem minimalen Schaden für das gesamte umliegende Gewebe (D'Arcy, 2019; Elmore, 2007).

### 1.2.4 Inhibitor of Apoptosis Proteine

In gesunden Zellen halten sich pro- und antiapoptotische Proteine die Waage. So inhibieren die *Inhibitor-of-Apoptosis-Proteine* (IAPs) proapoptotische Proteine, indem sie diese ubiquitinylieren und damit inaktivieren. Die IAPs werden wiederum durch spezifische IAP-Antagonisten reguliert und in ihrer Funktion gehemmt (Vasudevan & Ryoo, 2015) .

Allen IAPs ist gemeinsam, dass sie mindestens eine *Baculoviral-IAP-Repeat-Domäne* (BIR) und mit Ausnahme von Survivin eine *Carboxy-Terminal-RING-Domäne* besitzen (Lalaoui & Vaux, 2018).

Bei der Apoptose einer gesunden Zelle setzen die Mitochondrien unter anderem die proapoptotischen Proteine Smac/DIABLO und HtrA2/omi frei, welche wiederum an IAPs binden und diese inhibieren. Zu den IAPs gehören unter anderem *cellular IAP 1* (cIAP1), *cellular IAP 2* (cIAP2), *X-linked IAP* (XIAP) und Survivin. Durch die Inhibition der IAPs werden Caspasen aktiviert und der programmierte Zelltod durchgeführt (Lalaoui & Vaux, 2018; Michie, Kearney, Hawkins, Silke, & Oliaro, 2020). XIAP ist in der Lage, direkt an Caspase 3 und 9 zu binden und diese zu inaktivieren. cIAP1 und 2 führen zu einer Inhibition des extrinsischen, TNF-induzierten, Zelltods (Lalaoui & Vaux, 2018; Silke & Vucic, 2014).

XIAP und Survivin tragen in einem gemeinsamen Signalweg zur Metastasierung maligner Zellen unabhängig von ihrer Wirkung auf die Apoptoseinduktion bei (Mehrotra et al., 2010).

Bei etwa 3 % der Krebserkrankungen ist die Expression von IAPs erhöht, was zu einer verminderten Empfindlichkeit der Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika führt (Chesi et al., 2016; Rathore, McCallum, Varghese, Florea, & Busselberg, 2017). Daher ist die Beeinflussung der IAPs ein interessanter Therapieansatz, um Krebszellen für Chemotherapeutika zu resensibilisieren (Rathore et al., 2017).

Nach neueren Erkenntnissen scheinen IAPs auch eine Rolle bei der Regulierung des *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells* (NFκB) zu spielen und somit die Reaktionen des angeborenen Immunsystems beeinflussen zu können (Lalaoui & Vaux, 2018). IAP-Inhibitoren befinden sich in der klinischen Erprobung und sind vielversprechende Kandidaten für eine zielgerichtete Krebstherapie (Dougan & Dougan, 2018).

### **1.2.5 Survivin**

1997 entdeckte Ambrosini et al. das antiapoptotische Molekül Survivin mit der BIR-Domäne, die die IAPs charakterisiert. Survivin besteht anders als die anderen IAPs aus nur einer einzigen BIR-Domäne. In adulten, gesunden Zellen lässt sich kein Survivin nachweisen. Man findet es lediglich in fetalem Gewebe, im Thymus in der Plazenta und in den meisten neoplastischen Zellen, wodurch die Inhibition von Survivin zu einem wichtigen Forschungsansatz in der Krebstherapie geworden ist (G. Ambrosini, Adida, & Altieri, 1997; Wheatley & Altieri, 2019).

Survivin spielt eine entscheidende Rolle in der Mitose, indem es zusammen mit der Aurora-B-Kinase, Borealin und *Inner Centromere Protein* (INCENP) den *Chromosomal Passenger Complex* (CPC) bildet (Wheatley & Altieri, 2019).

Survivin befindet sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern und in den Mitochondrien. Bei Stress kann das mitochondriale Survivin ins Zytoplasma ausgeschüttet werden und die antiapoptotische Reaktion verstärken (Dohi et al., 2004; Wheatley & Altieri, 2019).

Dieser Stress, der z.B. während einer Chemotherapie auf die maligne Zelle ausgeübt wird, führt auch insgesamt zu einer verstärkten Expression von Survivin. Außerdem

werden vermehrt Exosomen mit Survivin gebildet, die in die extrazelluläre Matrix entsendet werden. Dieses extrazelluläre Survivin kann von den umgebenden neoplastischen Zellen aufgenommen werden und verstärkt die antiapoptotische Aktivität der Tumormasse (S. Khan et al., 2009).

Survivin interagiert in besonderer Weise mit XIAP, indem ein Heterokomplex gebildet wird. Das Survivin führt dazu, dass das XIAP stabilisiert wird und schützt es vor Polyubiquitinierung und proteasomalem Abbau. Dieser Heterocomplex inhibiert die Aktivität der Caspase 9 und kann damit die Caspasenkaskade hemmen (Dohi et al., 2004).

Grabowski et al. wies in einer Studie mit Patient:innen, bei denen eine GEP-NEN diagnostiziert wurde, nach, dass das Vorhandensein von nukleärem Survivin mit einer signifikant verkürzten Überlebensdauer assoziiert ist (Grabowski et al., 2005). Survivin ist somit sowohl als prognostischer Marker als auch als potentielle Zielstruktur für eine *targeted therapy* von Bedeutung.

### **1.2.6 X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)**

*X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) besteht aus drei BIR am Amino-Terminus sowie einer Ubiquitin-assoziierten Domäne (UBA) vor der *Really Interesting New Gene* (RING)-Domäne (Takahashi et al., 1998).

XIAP verhindert die Apoptose vor allem durch die Inhibition der Initiatorcaspase-9 und der Effektorcaspasen 3 und 7 (Deveraux, Takahashi, Salvesen, & Reed, 1997; Silke & Vucic, 2014; Tu & Costa, 2020). BIR2 und die Verbindungsregion zwischen BIR1 und BIR2 sind für die Interaktion mit den Effektorcaspasen 3 und 7 zuständig (Y. Huang et al., 2001; Takahashi et al., 1998). BIR3 bindet die Caspase 9, verhindert die Dimerisation und damit die Aktivierung der Initiatorcaspase (Jost & Vucic, 2020). Außerdem interagiert BIR3 mit Smac/DIABLO und führt zu einer Inhibition von XIAP (Z. Liu et al., 2000).

Tu et al. bezeichnet XIAP als das wirksamste antiapoptotische Protein, das existiert (Tu & Costa, 2020). XIAP und Survivin können durch eine intermolekulare Verbindung eine Metastasierung von Tumorzellen fördern (Mehrotra et al., 2010).

In mehreren Krebsarten ist die Überexpression von XIAP mit einer schlechteren Prognose verbunden (Fulda & Vucic, 2012). Da XIAP das einzige IAP ist, das

Caspasen direkt inhibieren kann, ist es eine interessante Zielstruktur für neuartige Therapeutika (Eckelman, Salvesen, & Scott, 2006).

### **1.2.7 Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) und 2 (cIAP2)**

*Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (cIAP1) und 2 (cIAP2)* bestehen beide analog zu XIAP aus drei BIR- sowie einer RING-Domäne (Eckelman et al., 2006). Trotz der strukturellen Ähnlichkeit können cIAP1 und cIAP2 die Caspasen lediglich binden, jedoch anders als XIAP nicht direkt inhibieren. Eine Überexpression von cIAP1 und cIAP2 inhibiert die Apoptose (Eckelman et al., 2006).

Die inhibitorische Wirkung von cIAP1 und cIAP2 auf die Apoptose wird durch eine Ubiquitylierung von Caspase 3 und 7 mit nachfolgender proteasomaler Degradation (Choi et al., 2009) sowie von RIPK1 und RIPK3 erzielt. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung von NFκB und ausbleibenden Aktivierung von Caspase 8 (Moulin et al., 2012).

Ndubaku et al. untersuchten die Wirkung von spezifischen cIAP-Antagonisten auf Tumorzellen. Obwohl diese selektiven Antagonisten in der Lage sind, Apoptose zu induzieren, waren diese Antagonisten deutlich weniger wirksam als Pan-IAP-Antagonisten. Für eine effiziente Krebstherapie ist somit der kombinierte Antagonismus von cIAP und XIAP notwendig (Ndubaku et al., 2009).

### **1.2.8 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)**

Wenn im Rahmen der Apoptose Caspase 3 aktiviert wird, spaltet es diverse intrazelluläre Proteine, wie z.B. Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) (Elmore, 2007). Aus der 116 kDa-Form entstehen ein 85 kDa- und ein 24 kDa-Fragment, wodurch PARP seine Fähigkeit verliert, DNA-Strangbrüche zu erkennen und zu reparieren (Kaufmann, Desnoyers, Ottaviano, Davidson, & Poirier, 1993; Soldani et al., 2001). Die Spaltung von PARP gilt prinzipiell als Nachweis der Apoptose in allen menschlichen Zellen mit Ausnahme der Hepatozyten (Decker & Muller, 2002; Lazebnik, Kaufmann, Desnoyers, Poirier, & Earnshaw, 1994; Soldani et al., 2001).

## 1.3 HDAC-Inhibitoren

### 1.3.1 Epigenetik und Histonmodifikation

Die Epigenetik ist nach einer Definition von Deans und Magerl „das Studium der Phänomene und Mechanismen, die zu chromosomal gebundenen, vererbaren Veränderungen der Genexpression führen, die nicht von Veränderungen der DNA-Sequenz abhängen“ („*the study of phenomena and mechanisms that cause chromosome-bound, heritable changes to gene expression that are not dependent on changes to DNA sequence*“ (Deans & Magerl, 2015). Zu den epigenetischen Modifikationen gehört auch die Histonacetylierung, die durch die Histonacetylasen (HAT) und -deacetylasen (HDAC) gesteuert wird und über eine Modifikation der Chromatinstruktur zu einer veränderten Genexpression führt (Bolden, Peart, & Johnstone, 2006).

Histone sind basische Proteine, die an der Bildung der Nucleosomen maßgeblich beteiligt sind. Ein Nucleosom besteht aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4, die zusammen ein Oktamer bilden, um das die Desoxyribonukleinsäure (DNA) auf einer Länge von ca. 146 Basenpaaren gewickelt ist (Thomas, 1984).

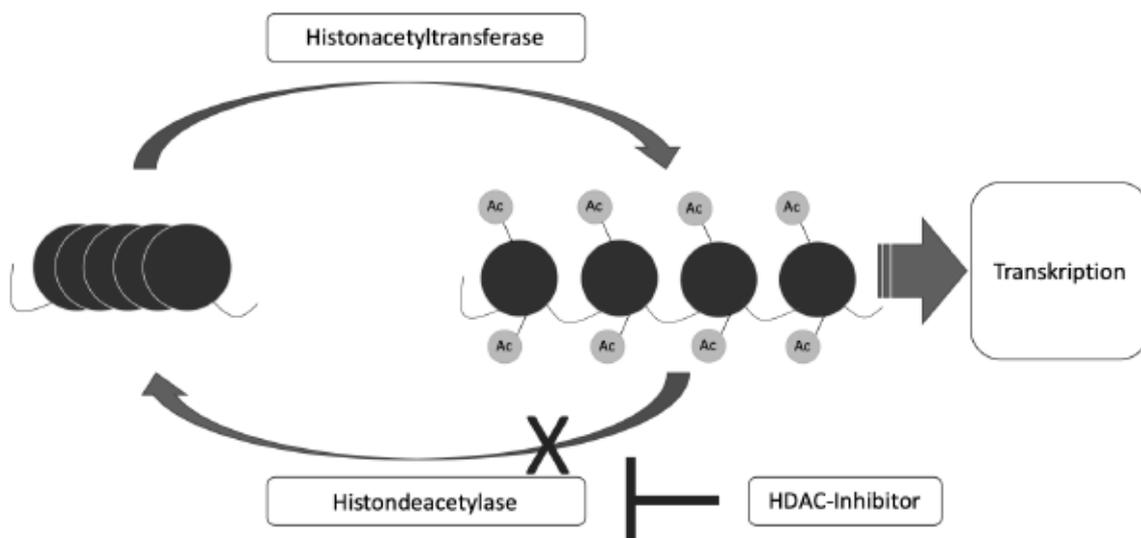
Das *Linker*-Histon H1 bindet an die Eintritts- und Austrittsstelle der DNA ins Nucleosom. Dieser Komplex aus Nucleosom und *Linker*-Histon wird Chromatosom genannt. Die *Linker*-Histone sind dafür zuständig, die Nucleosomen zu einer 30 nm-Chromatinfaser zu formatieren (Thomas, 1984; Zhou & Bai, 2019). Es wird vermutet, dass die 30 nm-Chromatinfaser *loops* und *topologically associating domains* (TADs) formen. Die Nucleosomen innerhalb einer TAD interagieren miteinander und haben mehr Kontakt als die Nucleosomen unterschiedlicher TADs (Zhou & Bai, 2019).

Histone besitzen viele positiv geladene Seitenketten, die mit der negativ geladenen DNA interagieren. HATs führen dazu, dass die Acetylgruppe eines Acetyl-Coenzyms A an das Lysin eines Histons transferiert wird. Dieser Vorgang hat zur Folge, dass die positive Ladung des Lysins aufgehoben wird und die elektrostatische Bindung zwischen der DNA und dem Histon gelöst wird. Dies bewirkt wie in Abbildung 2

dargestellt, dass sich der entsprechende Bereich des Chromatins entfaltet und transkribiert werden kann (Sanaei & Kavooosi, 2019).

HDACs können die Acetylgruppen von Proteinen - insbesondere von Lysin-Seitenketten am N-Terminus - wieder entfernen, was zu einer verdichteten Chromatinstruktur und einer verminderten Transkription des entsprechenden DNA-Abschnitts führt (Hassell, 2019; Sanaei & Kavooosi, 2019).

Die Überexpression von HDACs und die damit verbundenen epigenetischen Veränderungen scheinen eine wichtige Rolle bei der Proliferation maligner Zellen zu spielen, indem sie z.B. den Eintritt in die Mitose beeinflussen (Bolden et al., 2006; Senese et al., 2007). Ihnen wurde bereits eine Bedeutung bei verschiedenen Tumorentitäten wie z.B. Ovarialkarzinom, akute Promyelozytenleukämie, akute myeloische Leukämie, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, Prostatakarzinom, Magen- und Kolonkarzinom und Brustkrebs zugeschrieben (Bolden et al., 2006).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Histonacetylierung mit Entfaltung des Chromatins**

Histonacetyltransferasen fügen an die positiv geladenen Seitenketten der Histone, die für die Verdichtung der negativ geladenen DNA verantwortlich sind, eine Acetylgruppe an, sodass die positive Ladung aufgehoben wird. Die DNA entfaltet sich nun und kann transkribiert werden. Histondeacetylase entfernen diese Acetylgruppen und führen zu einer Verdichtung der DNA. HDAC-Inhibitoren inhibieren diesen Prozess und führen somit zu einer vermehrten Transkription der betroffenen DNA-Bereiche.

### 1.3.2 Klassifikation der HDACs

Die 18 bisher identifizierten HDACs werden – wie in Tabelle 2 dargestellt – nach ihrer Ähnlichkeit zu Hefeproteinen im molekularen Aufbau, nach ihrer enzymatischen Aktivität und nach ihrer zellulären Lokalisation in vier Klassen unterteilt (Hassell, 2019; Sanaei & Kavooosi, 2019; Zagni, Floresta, Monciino, & Rescifina, 2017).

Klasse	Lokalisation	HDAC
I	Nukleus	HDAC 1
		HDAC 2
		HDAC 3
		HDAC 8
IIa	Zytoplasma & Nukleus	HDAC 4
		HDAC 5
		HDAC 7
		HDAC 9
IIb	Zytoplasma & Nukleus	HDAC 6
	Zytoplasma	HDAC 10
III	Nukleus	SIRT 1
		SIRT 6
		SIRT 7
	Zytoplasma	SIRT 2
		SIRT 3
	Mitochondrien	SIRT 4
		SIRT 5
IV	Nukleus	HDAC 11

**Tabelle 2: Klassifikation der HDACs**

Klasse I HDACs haben einen analogen Aufbau zum Rpd3-Hefeprotein und befinden sich ausschließlich im Nukleus (Zagni et al., 2017). HDACs der Klasse II haben die Möglichkeit zwischen Nukleus und Zytoplasma zu wechseln. Die HDACs, die im Gegensatz zu den anderen nicht  $Zn^{2+}$ -abhängig sind, arbeiten Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>)-abhängig und werden der Klasse III zugeordnet. Sie werden auch als Sirtuine bezeichnet. HDAC 11 besitzt Merkmale der Klasse I und II (Hassell, 2019).

### 1.3.3 Wirkweise der HDAC-Inhibitoren

HDAC-Inhibitoren sind zu vielversprechenden Therapeutika in der Krebsforschung geworden, in der Hoffnung, dass sie den pathogenen epigenetischen Status von Krebszellen reversieren können (Bolden et al., 2006).

- DNA-Schäden  
HDAC-Inhibitoren können die DNA über strukturelle Veränderungen des Chromatins anfälliger für UV-Strahlung, Bestrahlung und zytotoxische Medikamente machen (Marks, 2010).
- Apoptoseinduktion  
Potentiell sind HDAC-Inhibitoren dazu in der Lage, eine Zelle mittels Apoptose, Autophagie oder Nekrose zu zerstören. Die meisten Studien haben allerdings gezeigt, dass die behandelten Zellen vor allem Apoptose-spezifische Veränderungen aufweisen (Bolden et al., 2006). In mehreren Versuchsreihen konnte beobachtet werden, dass die HDAC-Inhibitoren ihre apoptotische Wirkung vor allem in malignen Zellen entfalten und in gesunden Zellen keinen programmierten Zelltod induzieren. Molekularbiologisch lässt sich nach einer Behandlung mit HDAC-Inhibitoren eine gesteigerte Expression von TRAIL, *death receptor* (DR)5 und FasL in malignen Zellen, jedoch nicht in gesunden Zellen, nachweisen (Insinga et al., 2005; Nebbioso et al., 2005; Wiley et al., 1995).
- Zellzyklusarrest  
Viele HDAC-Inhibitoren induzieren einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Johnstone, 2002; Richon, Sandhoff, Rifkind, & Marks, 2000).

Auch der G2/M-Phase-Arrest kann durch HDAC-Inhibitoren ausgelöst werden. Dies erfolgt, wie Studien zeigen, durch die Aktivierung eines G2-Phase-Checkpoints. Es konnte nachgewiesen werden, dass Tumorzellen, die mit HDAC-Inhibitoren behandelt werden, zunächst in der G2/M-Phase akkumulieren und anschließend über den G2-Checkpoint in die Apoptose übergehen (Qiu et al., 2000).

- Tumorangiogenese

Viele HDAC-Inhibitoren führen dazu, dass neben anderen proangiogenetischer Faktoren weniger *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und Angiopoietin exprimiert wird, sodass die Neoangiogenese reprimiert wird (Deroanne et al., 2002; Ellis, Hammers, & Pili, 2009; Qian et al., 2006).

- Metastasierung

In hepatozellulären Karzinomzellen konnte ein antimetastatischer Effekt der HDAC-Inhibitoren nachgewiesen werden (Coradini et al., 2004).

- Immunmodulatorische Effekte

Verstärkte Präsentation von *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse I und II-Proteinen an der Zelloberfläche und verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen (Maeda, Towatari, Kosugi, & Saito, 2000; Magner et al., 2000).

Ein Teil der Wirkung von HDAC-Inhibitoren ist auf eine veränderte Expressionsrate bestimmter Gene zurückzuführen. Peart und Smyth zeigten 2005, dass > 40 % der Gene des gesamten Genoms von der Wirkung von Vorinostat oder Depsipeptid betroffen sind. Zusammenfassend werden proapoptotische Gene vermehrt transkribiert und antiapoptotische Gene herunterreguliert (Peart et al., 2005). Viele Mechanismen der HDAC-Inhibitoren scheinen auch auf Wirkungen auf andere Zielproteine als Histone zurückzuführen zu sein. (O. Khan & La Thangue, 2012). So konnte z.B. nachgewiesen werden, dass Transkriptionsfaktoren wie p53 und NF-κB durch eine Hyperacetylierung in Folge einer Behandlung der Zellen mit einem HDAC-Inhibitor in ihrer Aktivität reguliert werden (Bolden et al., 2006).

### 1.3.4 Klassifikation der HDAC-Inhibitoren

Klasse	HDAC-Inhibitor	Charakteristik
I Hydroxamate	Vorinostat	Inhibition der HDAC-Klassen I, II, IV
	Panobinostat	
	Belinostat	
Alipathische Säuren	Valproat	
	Butyrat	
II Benzamide	Entinostat	Inhibition von HDAC 1, 9, 11
III	Apicidin	Benzamid-Gruppe, Inhibition der HDAC-Klassen I und II
IV	Romidepsin	Bizyklische Peptide, Inhibition der HDAC-Klassen I und II
V Sirtuin-Inhibitoren	Cambinol Nicotinamid	Inhibition von SIRT 1 und SIRT 2

**Tabelle 3: Klassifikation der HDAC-Inhibitoren**

Vorinostat ist eine Hydroxamsäure und war der erste HDAC-Inhibitor, der durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) 2006 zur Therapie des refraktären kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen wurde (Duvic et al., 2007). Das Medikament befindet sich außerdem in mehreren Phase III-Studien zur Mono- oder Kombinations-Therapie des Multiplen Myeloms, der akuten myeloischen Leukämie, des Pleuramesotheliom, des hochgradigen Glioms und des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC von *Non-Small Cell Lung Cancer*) (clinicaltrials.gov, 2023d)

Neben einem Zellzyklusarrest bewirkt Vorinostat die Induktion der Apoptose (C. Zhang, Richon, Ni, Talpur, & Duvic, 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass Vorinostat eine erhöhte Expression von DR5 bewirkt und damit die extrinsische Apoptose fördert (Nakata et al., 2004). Außerdem sensitiviert Vorinostat maligne entartete Zellen für die Apoptoseinduktion durch rekombinantes TRAIL (Nakata et al., 2004).

Der parenteral applizierbare HDAC-Inhibitor Belinostat wurde 2014 durch die FDA zur Therapie des refraktären oder rezidierten peripheren T-Zell-Lymphoms zugelassen (Lee et al., 2015) und gehört – wie in Tabelle 3 gezeigt – ebenfalls zur Gruppe der Hydroxamate. Belinostat ist ein Pan-HDAC-Inhibitor (N. Khan et al., 2008).

Es befindet sich aktuell in mehreren Phase II-Studien zu adulter T-Zell-Leukämie, akute myeloische Leukämie, multiples Myelom, Non-Hodgkin-Lymphom, fortgeschrittene Thymustumore, Chondrosarkom, Glioblastom, Ovarialkarzinom, myelodysplastisches Syndrom, primäres Peritonealkarzinom, Lymphom, NSCLC, Peripheres T-Zell-Lymphom, hepatozelluläres Karzinom und Weichteilsarkom (clinicaltrials.gov, 2023a).

Der oral verfügbare Pan-HDAC-Inhibitor Panobinostat wurde 2015 durch die FDA zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen (Raedler, 2016). Die Zulassung basierte auf den Daten zum progressionsfreien Überleben und war an die Bedingung geknüpft, dass weitere klinische Studien zur Bestätigung des klinischen Nutzens des Medikaments durchgeführt werden. Da der Hersteller diese Studienergebnisse nicht hinreichend vorlegen konnte, verlor Panobinostat im März 2022 seine Zulassung der FDA (U.S. Food and Drug Administration, 2022). Die European Medicines Agency (EMA)-Zulassung ist jedoch gültig (European Medicines Agency, 2023).

Aktuell befindet sich Panobinostat in Phase III-Studien zu akuter myeloischer Leukämie, myelodysplastisches Syndrom und Hodgkin-Lymphom (clinicaltrials.gov, 2023c).

Entinostat ist ein synthetischer HDAC-Inhibitor, der eine Benzamid-Struktur aufweist. Im Gegensatz zu den Pan-HDAC-Inhibitoren inhibiert Entinostat selektiv HDAC1 und in höherer Konzentration HDAC3 (Hu et al., 2003; N. Khan et al., 2008). In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Entinostat bei diversen Krebserkrankungen, unter anderem Kolonkarzinom (Hu et al., 2003), myeloische und lymphatische Leukämie (Maggio et al., 2004; Tsapis et al., 2007) und Brustkrebs (X. Huang et al., 2009) Apoptose induziert. Lucas et al. wiesen 2004 nach, dass Entinostat dazu Caspase 3, 8 und 9 aktiviert (Lucas et al., 2004). Außerdem führt Entinostat zu erhöhten Leveln von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie einer verminderten Expression von XIAP und somit zu einer Apoptose über den intrinsischen Signalweg. Auch die extrinsische Apoptose wird durch eine erhöhte Sensitivität für TRAIL durch

Entinostat gefördert (Inoue, Mai, Dyer, & Cohen, 2006; Singh, Shankar, & Srivastava, 2005). Dabei stellten Inoue et al. durch ein *Knockdown* mehrerer HDACs fest, dass vor allem die Inhibition von HDAC1 und HDAC2 Tumorzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert (Inoue et al., 2006).

Aktuell befindet sich Entinostat in einer Phase III-Studie zur Kombinationstherapie mit einem Aromatasehemmer des fortgeschrittenen Mammakarzinoms (Yeruva et al., 2018)

Droxinostat ist ein selektiver Inhibitor hauptsächlich von HDAC6 und HDAC8 und in höheren Konzentrationen auch von HDAC3. Droxinostat induzierte bei der Brustkrebszelllinie MCF-7 (Bijangi-Vishehsaraei, Huang, Safa, Saadatzadeh, & Murphy, 2010) in Zellen eines hepatozellulären Karzinoms (J. Liu et al., 2016) sowie in der Kolonkarzinom-Zelllinie HAT-29 Apoptose. In der Prostatakarzinom-Zelllinie PPC 1 führte die Inkubation mit Droxinostat zu einer Sensitivierung für FAS- und TRAIL-induzierte Apoptose (Schimmer et al., 2006), wohingegen in der ebenfalls aus einem Prostatakarzinom stammenden Zelllinie DU145 z.B. keine Sensitivierung für FAS erreicht wurde (Wood et al., 2010). Droxinostat ist nach derzeitigem Wissensstand nicht Gegenstand klinischer Studien (clinicaltrials.gov, 2023b).

#### **1.4 Ziele der Arbeit**

In den meisten Fällen ist ein NEC zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits weit fortgeschritten, so dass die bisher einzige erfolgversprechende Option einer R0-Resektion oder definitiven Radiochemotherapie nicht mehr zur Verfügung steht. Die verbleibenden Therapieoptionen sind mit einer äußerst schlechten Prognose und einer kurzen Überlebenszeit verbunden.

HDAC-Inhibitoren erzielen nachweislich vergleichsweise hohe Remissionsraten bei vergleichsweise geringer Toxizität in Einzel- oder Kombinationstherapie bei hämatoonkologischen Erkrankungen und werden für die Therapie solider Tumoren intensiv erforscht. Insbesondere bei Tumorerkrankungen mit ausgeprägten epigenetischen Veränderungen werden große Hoffnungen in die zielgerichtete Therapie mit HDAC-Inhibitoren gesetzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung von Pan-HDAC-Inhibitoren und selektiven HDAC-Inhibitoren auf verschiedene NEC-Zelllinien hinsichtlich Zellproliferation und die Apoptoseinduktion zu prüfen. Darüber hinaus wird der Einfluss von HDAC-Inhibitoren insbesondere auf die Expression nachgeschalteter antiapoptotischer Proteine untersucht.

Damit soll eine Grundlage für die weitere Erforschung des Einsatzes von HDAC-Inhibitoren in der Therapie von NEC geschaffen werden, um eine klinische Anwendung zu ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Analog Vortex Mixer	VWR™
BD FACSCanto™	BD Biosciences
Bio-Photometer®	Eppendorf
BIOSAFE® MD	Cryotherm
Criterion™ Blotter	Bio-Rad
Eppendorf™ Pipette	Thermo Fisher
Fresco™ 17 Microcentrifuge	Heraeus™
Gefrierschrank Komfort	Liebherr
Heiz-ThermoMixer MHR23	Science Services
Heizblock	HLC
HI208 Mini "all in one" pH/°C Meter mit Rührer	Hanna
IKAMAG® RCT Magnetrührer mit Heizung	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Infinite® M200	Tecan Group AG
KS 250 Schüttler	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Kühlzentrifuge Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Mikroskop Wilovert A	Helmut Hund GmbH
Mikrozentrifuge Galaxy	VWR™
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® Comb, 10-well	Bio-Rad
Neubauer Zählkammer	Brand
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad
Premium NoFrost -20 °C	Liebherr
Quick-Pak Mikrozentrifuge	Labnet Int.
Rollenmischer RM5	Hecht Assistent
Spark Free Laboratory Freezer	Thermo Electron
Sterilbank Hersafe KS	Heraeus™
Sunlab® Rollenmischer SU 1400	Sunlab

Taumel-Rollenmischer TRM-50	IDL GmbH & Co KG
Tetra Blotting Module	Bio-Rad
Thermo Heraeus HeraCell Inkubator	Heraeus™
Thermostatic Wasserbad - WBS	Fried Electric
Versadoc 4000 Molecular Imager	Bio-Rad

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Laborgeräte**

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon™ Polystyrene Round-Bottom Tube 5 ml	BD Biosciences
Cellstar® Cell Culture Flasks with Filter Cap, Sterile (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One
CELLSTAR® Polypropylene Tube 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One,
Costar® 3506 6 Well Cell Culture Plate	Corning Incorporated
Costar® 3596 96 Well Cell Culture Cluster	Corning Incorporated
Cryo.s™ Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One
Cuvettes	Sarstedt
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Nitrocellulose Membrane	ThermoFisher Scientific
Objekträger und Deckgläser	Engelbrecht GmbH
Pasteurpipetten	Brand
Safe-Lock Eppendorf Tubes® (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 5 mL)	Eppendorf AG
Stripette® Disposable Serological Pipettes (25 mL, 10 mL, 5 mL)	Corning Incorporated
Tip One® Filter Tip, Sterile 1-1000 µl	STARLAB GmbH
Whatman™ Chromatography Paper	GE Healthcare

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

### 2.1.3 Chemikalien

100 % Magermilchpulver	Nestle
2-Mercaptoethanol	Sigma
30 % Acrylamid Mix	Biorad
Agarose	Sigma
Ammoniumpersulfate for electrophoresis $\geq 98$ %	Sigma
Beta-Mercaptoethanol	Merck
Bromphenolblau	Sigma
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates	Bio-Rad
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail tablets	Roche
Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI, for flow cytometry	ThermoFisher Scientific
Destilled Water DNase/RNase Free	Gibco
DMSO	Sigma
DPBS (1x) Dublbeccos's Phosphate Buffered Saline	Gibco
Ethanol absolut	VWR Chemicals
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Glycerol for molecular biology, $\geq 99$ %	Sigma
Glycin	Merck
Mayers Hämalaunlösung	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid	VWR Chemicals
PBS Tabletten	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Ponceau S	Sigma
Precision Plus Protein Western C Standard Marker	BioRad
Precision Strep Tactin-HRP Conjugate	BioRad
Propidium Iodide 1,0 mg/ml solution in water	Invitrogen
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Biorad
Radioimmunpräzipitations-Assay (RIPA)-Puffer	Sigma
RNase A	Qiagen
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX	Gibco
Sodium dodecyl sulfate $\geq 98,5$ %	Sigma

Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) for electrophoresis ~99 %	Sigma
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris-Borate-EDTA Puffer	Merck
Trizma® base	Sigma
Trypanblau 0,4 %	Gibco
Trypsin 0,05 % + 0,02 % EDTA	Gibco
Tween® 20	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck
Xylol	VWR Chemicals

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chemikalien**

#### 2.1.4 Zytostatika

Vorinostat (SAHA)	Cell Signaling
Panobinostat (LBH589)	Selleck Chemicals
Droxinostat (NS 41080)	Selleck Chemicals
Entinostat (MS-275)	Selleck Chemicals
Belinostat (PXD101)	Selleck Chemicals

**Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Zytostatika**

#### 2.1.5 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Zellkulturmedium	RPMI 1640 Glutamax + 10 % FBS + 1 % Penicillin&Streptomycin
1,5 M Tris pH 8,8	81,65 g Tris auf 1 l Aqua dest.
1 M Tris pH 6,8	60,55 g Tris auf 1 l Aqua dest.
6x Laemmli-Puffer	3,75 ml 1 M Tris pH 6,8 + 1 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) + 3 ml Glycerol + 3 ml $\beta$ -Mercaptoethanol + Spatelspitze Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer	10 g SDS + 30 g Tris + 144 g Glycin auf 1 l Aqua dest
10x Transferpuffer	30,2 g Tris + 144 g Glycine auf 900 ml Aqua dest.
Blocking-Puffer	2,5 g Magermilchpulver + 50 ml Waschpuffer
Ponceau-Rot	0,5 g Ponceau S Pulver + 1 ml Eisessig auf 100 ml Aqua dest., filtrieren
10x Tris buffered saline (TBS)- Waschpuffer	87,6 g NaCl + 12,1 g Tris Auf 1 l Aqua dest. pH 7,5
1x TBS-T-Waschpuffer	100 ml 10x Waschpuffer + 900 ml Aqua dest. + 1 ml Tween 20
PBS-1 % FCS	2,673 ml PBS + 27 $\mu$ l FCS
80 %-iges Ethanol	40 ml Ethanol absolut + 10 ml Aqua dest.

**Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen**

### 2.1.6 Antikörper

Histone H3 (D1H2) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling
Acetyl-Histon H3 (Lys27) (D5E4) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling
Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin Clone DM1A	Sigma Aldrich
Acetyl- $\alpha$ -Tubulin (Lys40) (D20G3) XP™ Rabbit mAb	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling
Anti Mouse IgG (Fc Specific) Peroxidase	Sigma Aldrich

Purified Mouse Anti-XIAP Clone 28	BD Transduction Laboratories
Survivin Antibody	Novus Bio
Human cIAP-1/HAIP-2 Antibody	Bio-Techne Ltd.
Human/Mouse cIAP-2/HAIP-1 Antibody	Bio-Techne Ltd.
Anti-FLIP (human), mAb (NF6)	Adipogen AG
PARP Antibody	Cell Signaling
Anti-GAPDH antibody [6C5]	abcam

**Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper**

### 2.1.7 Software

Quantity One Basic Version 4.6	Bio-Rad
GraphPad Prism 5	Graph Pad
FACS Diva Version 8.01	BD
SPSS-Statistics Version 26	IBM
Microsoft Excel Version 16	Microsoft
i-control <sup>TM</sup> Microplate Reader	Tecan

**Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software**

### 2.1.8 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden in unserer Arbeitsgruppe als Primärzelllinien etabliert. Die Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 entstammen großzelligen NEC und die Zelllinie NEC-DUE3 einem kleinzelligen NEC.

Die Zellen der Zelllinie NEC-DUE1 wurden aus einer atypisch resezierten Lebermetastase eines NEC des gastroösophagealen Übergangs im Stadium pT3 N1 L1 V1 G3 (Ki67-Index: 80 %) gewonnen. Der 71-jährige männliche Patient kaukasischer Abstammung wurde zuvor chemotherapeutisch behandelt und der Primärtumor wurde mittels erweiterter Gastrektomie entfernt (Krieg et al., 2014).

Für die Zelllinie NEC-DUE2 wurden Zellen einer Lymphknotenmetastase eines großzelligen NEC der rechten Kolonflexur im Stadium pT4a N2b M1a L1 V1 Pn1 G3 (Ki67-Index: 80 %) verwendet. Der Patient war

ebenfalls 71 Jahre alt, männlich und Kaukasier. Vor der ausgedehnten operativen Resektion des Primarius sowie der multiplen Metastasen erhielt der Patient eine neoadjuvante Chemotherapie (Krieg et al., 2014).

NEC-DUE3 wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines NEC des Analkanals im Stadium pT2 pN0 pM1 L0 V1 PN0 R1 G3 (Ki67-Index: 90 %) isoliert. Die 55-jährige kaukasische Patientin wies bei Diagnosestellung keine Fernmetastasen auf und erhielt nach der erweiterten Rektumresektion mit Lymphadenektomie der Leiste eine adjuvante Chemotherapie (Dizdar et al., 2018).

Bezeichnung	Lokalisation des Primärtumors	Entnahmestelle	Ki67-Index	Tumor-stadium	Referenz
NEC-DUE1	Gastro-ösophagealer Übergang	Lebermetastase	80 %	pT3 N1 L1 V1 G3	(Krieg et al., 2014)
NEC-DUE2	Rechte Kolonflexur	Lymphknotenmetastase	80 %	pT4a N2b M1a L1 V1 Pn1 G3	(Krieg et al., 2014)
NEC-DUE3	Analkanal	Lymphknotenmetastase	90 %	pT2 pN0 pM1 L0 V1 PN0 R1 G3	(Dizdar et al., 2018)

**Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Zelllinien mit Angabe der Entnahmestelle, des Ki67-Index und des Tumorstadiums**

Die Patient:innen haben der Verwendung des Materials zu Studienzwecken schriftlich zugestimmt und es liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studennummer 3457) vor.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

Die Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt. Das Kulturmedium für alle drei Zelllinien wurde alle drei Tage gewechselt und bestand aus RPMI 1640 Glutamax, 10 % Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Vor der Verwendung wurde das Kulturmedium ca. 20 min erwärmt. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Beimischung im Brutschrank

kultiviert. Wenn eine Zelldichte von ungefähr 80 % erreicht wurde, wurden die Zellen zunächst mit 1x phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen. Anschließend wurden sie mit Trypsin/EDTA gelöst. Nach einer Inkubationszeit von ca. 2-3 min bei 37 °C wurden die abgelösten Zellen im Kulturmedium aufgenommen und jeweils ein Sechstel der Zellen in eine neue Kulturflasche ausgesät.

### **2.2.2 Kryokonservierung der Zellen**

Zellen aus frühen Zellkulturpassagen wurden regelmäßig eingefroren. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben mit Trypsin/EDTA gelöst und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen in ein Gefriermedium aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90 % FBS in Cryoröhrchen gegeben. Die beschrifteten Röhrchen wurden zunächst für zwei Stunden bei -20 °C und anschließend über Nacht bei -80 °C gelagert. Danach wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in den Cryoröhrchen ins Wasserbad gegeben. Im nächsten Schritt wurden sie zu 9 ml Zellkulturmedium hinzugefügt und 10 min bei 15000 *rounds per minute* (rpm) unter Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Zellkulturflaschen kultiviert.

### **2.2.3 Lebendzellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen wie oben beschrieben aus den Kulturflaschen gelöst und mit 0,4 %-Trypanblau im Verhältnis 1:4 angefärbt. Die Zellsuspension wurde anschließend in die Neubauer-Zählkammer gegeben, bei der jedes Eckquadrat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und eine Höhe von 0,1 mm besitzt. Durch Auszählen der Eckquadrate wurde die Zelldichte folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Anzahl der Quadrate}) \times 4 \times 10^4$$

#### **2.2.4 Behandlung der Zellen mit Compounds**

Nach der Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine definierte Zellzahl in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank bebrütet. Die entsprechenden Compounds wurden mit einer entsprechenden Menge Zellkulturmedium gemischt, um eine bestimmte Zielkonzentration zu erreichen. Anschließend wurde das Zellkulturmedium einschließlich Compound nach Entfernung des alten Kulturmediums in die jeweiligen Zellkulturflaschen gegeben.

Für die Negativkontrollen wurde eine entsprechende Menge des für die Compounds verwendeten Lösungsmittels DMSO in das Zellkulturmedium eingebracht.

#### **2.2.5 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay**

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und der in Zellkulturmedium verdünnte HDAC-Inhibitor in den Endkonzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,03  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle diente DMSO in den gleichen Endkonzentrationen. Nach 72 Stunden Inkubation wurden in jedes Well 20  $\mu\text{L}$  CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay dem Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden für 1,5 bis 2,5 Stunden inkubiert. Halbstündlich wurde die Absorption bei 490 nm Wellenlänge mit dem Infinite M200 (Tecan) gemessen, welche sich proportional zur Zellviabilität verhält.

#### **2.2.6 Proteinisolation und Proteinmengenbestimmung**

Für die Isolierung der zu untersuchenden Proteine wurden die Zellen in Kulturflaschen der Größe von 25 cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt und der in Zellkulturmedium verdünnte HDAC-Inhibitor in den entsprechenden Endkonzentrationen hinzugegeben. Nach 72 Stunden Inkubation wurde der Überstand entnommen, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin gelöst und gemeinsam mit dem Überstand in einem Falcon bei 800 rpm und Raumtemperatur 4 min zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen, unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das PBS wurde abgeschüttet. Dieser

Waschvorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Anschließend wurde das überstehende PBS abgeschüttet und abpipettiert. Die Falcons mit den Zellpellets wurden für den weiteren Vorgang auf Eis gelagert.

Die Zellen wurden dann mit 200  $\mu$ l eines 1:25-Gemischs aus RIPA-Puffer und Protease-Inhibitor aufgenommen und in Eppendorf-Tubes gegeben, die für 15 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt, das Zellpellet wurde verworfen. Die Proteinmengenbestimmung erfolgte mittels Photometrie als Bradford-Assay durch Hinzugabe von Bio-Rad Dye Reagent Concentrate. Entsprechend der Messdaten wurde den jeweiligen Proben Aqua dest. und Laemmli-Puffer in der Menge hinzugefügt, sodass 20  $\mu$ g Protein in 20  $\mu$ l gelöst waren. Der fertige Proteinmix wurde anschließend 5 min bei 95 °C gekocht und wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

Compound	Konzentrationen	Lösungsmittel
Vorinostat	0,3 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	DMSO
Entinostat	0,3 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	DMSO
Droxinostat	0,3 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	DMSO
Belinostat	0,3 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	DMSO
Panobinostat	3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM	DMSO

**Tabelle 12: Konzentrationen der Compounds für die Inkubation der Zellen zur Proteinanalyse**

### 2.2.6 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe für das anschließende Wet-Blot-Verfahren erfolgte mittels Gelelektrophorese.

Die SDS-haltigen Polyacrylamidgele wurden aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammengesetzt. Die Trenngele wurden in Abhängigkeit von der Größe des zu detektierenden Proteins mit unterschiedlichen Acrylamidmengen hergestellt.

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

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Elektrophoresegele**

6 ml der jeweiligen Trenngel-Mischung wurden zwischen die beiden Glasplatten der Gelgießvorrichtung gegossen und bis zur vollständigen Aushärtung mit Isopropanolol abgedeckt. Anschließend wurde das Isopropanolol abgegossen und 3 ml der Sammelgel-Mischung über das Trenngel gegeben. Durch Einsetzen eines Kamms von oben in das Sammelgel wurden zehn Kammern für die Proteinproben gebildet.

Nach Fertigstellung des Gels wurde es in die Gellaufkammer gegeben, die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Im Anschluss wurden 20 µl der vorbereiteten Proteinproben in die Kammern des Sammelgels übertragen. Außerdem wurde als Laufmarker 3 µl *Precision Plus Protein Western C Standard* in eine äußere Kammer hinzugefügt.

Die Elektrophorese wurde bei 4 °C mit einer Spannung von 90 V für 30 min und danach mit 115 V für 45-60 min, bis sich der Marker *Precision Plus Protein Western C Standard* bis an das untere Ende des Gels verteilt hatte.

### **2.2.7 Western Blot und Detektion**

Zum Nachweis der Proteine erfolgte die Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran mittels Nass-Blot-Verfahren. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese aus den Gießplatten entnommen und zusammen mit der Nitrocellulosemembran, Filterpapieren und Schwämmen in folgender Reihenfolge als Bloteinheit angeordnet:

## **Anode**

- Schwamm
- 2x Filterpapier (Whatman)
- Nitrocellulosemembran
- SDS-Gel
- 2x Filterpapier (Whatman)
- Schwamm

## **Kathode**

Die zusammengesetzte Bloteinheit wurde anschließend in die Blotkammer eingesetzt, die mit Transferpuffer gefüllt wurde. Zur Verhinderung einer Überwärmung wurde die gesamte Blotkammer von außen mit Eis gekühlt. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran fand bei 90 V für 90 min und einer Außentemperatur von 4 °C statt. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Proteintransfers erfolgte die unspezifische Anfärbung der Proteine mit Panceau-S-Lösung, die im Anschluss mittels Waschpuffer wieder entfernt wurde.

Die Nitrocellulosemembran wurde in einem 50 ml-Falcon mit 5 %-Milchlösung für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Rollmischer abgeblockt. Darauf folgte die Inkubation über 16 Stunden bei 4 °C auf dem Rollmischer mit dem jeweiligen Primärantikörper, der in einer entsprechenden Konzentration in 3 ml der 5 %-Milchlösung auf die Membranen gegeben wurde. Nach dem zweimaligen Waschen der Membranen mit 1x TBS-T wurden sie mit 3 ml 5 %-Milchlösung mit dem entsprechenden Sekundärantikörper und 1,3 µl Precision Protein™ StrepTactin-HRP für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut zweimal mit TBS-T gewaschen.

Für die Auswertung mit dem VersaDoc wurde die Membran mit 1 ml einer 1:1-Lösung aus *Luminol/Enhancer Solution* und *Peroxide Solution* (Immun-Star WesternC Kit) für 3-5 min im Dunkeln inkubiert.

Die *Housekeeping*-Kontrolle erfolgte mit dem Nachweis von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Primär- und Sekundärantikörper wurden dafür im Verhältnis 1:5000 in der 5 %-Milchlösung verdünnt.

Antikörper	Molekulargewicht (kDa)	Verdünnung	Milchlösung	SDS-Gel	Sekundär-Antikörper
Histon H3	17	1:1000	5 %	15 %	Rabbit IgG HRP
Acety-Histon H3	17	1:1000	5 %	15 %	Rabbit IgG HRP
$\alpha$ -Tubulin	52	1:5000	5 %	15 %	Mouse IgG-Peroxidase
Acetyl- $\alpha$ -Tubulin	52	1:1000	5 %	15 %	Rabbit IgG HRP
Survivin	16	1:1000	5 %	15 %	Rabbit IgG HRP
XIAP	53	1:1000	2,50 %	15 %	Mouse IgG-Peroxidase
cIAP1	67	1:1000	5 %	10 %	Rabbit IgG HRP
cIAP2	68	1:1000	5 %	10 %	Rabbit IgG HRP
PARP	89	1:1000	5 %	15 %	Rabbit IgG HRP

**Tabelle 14: Übersicht über die Antikörper mit Angabe der verwendeten Verdünnung, Blockierlösung, SDS-Gel und Sekundärantikörper sowie Größe des Proteins**

## 2.2.8 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten mit  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium ausgetauscht mit Medium, das in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen einen HDAC-Inhibitor oder zur Kontrolle nur das Lösungsmittel DMSO in denselben Konzentrationen enthielt.

Vorinostat	0,3 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	0,03 $\mu$ M
Entinostat	3 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M
Droxinostat	10 $\mu$ M	3 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Belinostat	3 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M
Panobinostat	30 nM	10 nM	3 nM

**Tabelle 15: Konzentrationen der Compounds für die Inkubation der Zellen zur FACS-Analyse**

Nach 24 Stunden wurden die Zellen pro Well mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin gelöst. Nach dem Resuspendieren der Zellen mit 1 ml Medium wurde das Gemisch in 5 ml-Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden bei 800 rpm und Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen

und die Zellen wurden mit jeweils 4 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Tubes erneut zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Anschließend wurde das Tube auf den Vortex-Schüttler gehalten und 1 ml 80 %-iges Ethanol wurde auf das Zellpellet getropft. Die Tubes wurden für 1 Stunde gestellt. Dann wurden die Tubes zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und die Zellen wurden mit je 4 ml PBS gewaschen. Für 20 min wurden die Tubes bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sie erneut zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde erneut abgegossen, die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstands wurden die Zellen mit je 87,5  $\mu$ l PBS-1 %FCS, 10  $\mu$ l Rnase (1 mg/ml) und 2,5  $\mu$ l Propidiumiodid (PI) (1 mg/ml) resuspendiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Tubes mit Alufolie umwickelt, um sie vor Licht zu schützen. Anschließend wurden die Tubes bei 37 °C 30 min inkubiert. Daraufhin wurden 200  $\mu$ L PBS pro Tube hinzugefügt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihres Zellzyklus analysiert. Das Propidiumiodid färbt spezifisch die DNA der Zellen an. Die Fluoreszenz einer Zelle ist dabei proportional zu ihrem DNA-Gehalt, sodass mittels Durchflusszytometrie die Zellen nach ihrem DNA-Gehalt sortiert werden können. Über den DNA-Gehalt lassen sich die Zellen wiederum den jeweiligen Zellzyklusphasen zuordnen.

### **2.2.9 Statistische Auswertung**

Alle Versuche wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mittels T-Test für abhängige Stichproben und Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Die Varianzanalyse erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Der Post-hoc-Test wurde mittels Dunn-Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit GraphPadPrism und SPSS Statistics.

Die mittlere Hemmkonzentration IC<sub>50</sub> der HDAC-Inhibitoren bei den MTS-Assays wurde mittels logistischer Regressionsanalyse berechnet.

### **3 Ergebnisse**

Die drei Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 wurden jeweils mit den HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Entinostat, Droxinostat, Belinostat und Panobinostat in steigenden Konzentrationen inkubiert.

Alle Zelllinien zeigten eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Zellviabilität im MTS-Assay (n=3) nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen mit den HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Entinostat, Belinostat und Panobinostat. Lediglich bei der Inkubation mit Droxinostat konnte eine Reduktion der Zellviabilität lediglich mit einer äußerst hohen Konzentration des HDAC-Inhibitors erreicht werden.

Es folgten Western-Blot-Versuche zur Analyse der Proteinexpression der drei Zelllinien nach Inkubation mit den HDAC-Inhibitoren sowie FACS-Analysen des Zellzyklus.

#### **3.1 Reduktion der Zellviabilität und Acetylierung von Histon H3 und $\alpha$ -Tubulin durch die HDAC-Inhibitoren**

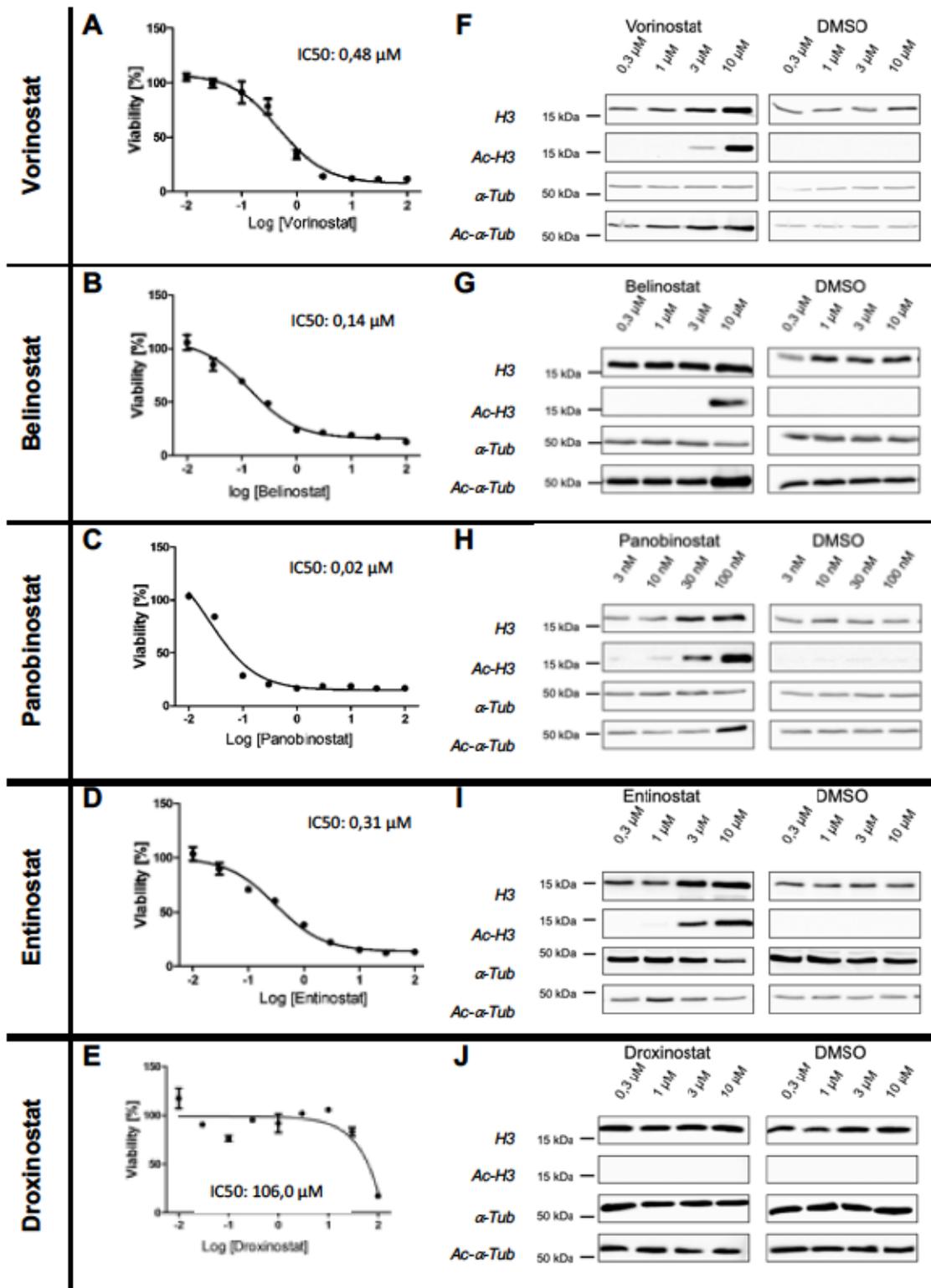
Zunächst wurde die Wirksamkeit der HDAC-Inhibitoren auf die verwendeten Zelllinien NEC-DUE1-3 in Form einer Reduktion der Zellviabilität untersucht. Dafür wurden MTS-Assays durchgeführt und die Viabilität der Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen HDAC-Inhibitors inkubiert wurden, mit der Viabilität der Zellen verglichen, die mit der äquimolaren Konzentration von DMSO zur Kontrolle inkubiert wurden. Die Ergebnisse wurden in einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve gegeneinander aufgetragen. Anschließend wurde die mittlere Hemmkonzentration berechnet.

Ein Vergleich der Mittelwerte mittels T-Test für abhängige Stichproben ergab die Signifikanzniveaus der konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellviabilität.

HDAC-Inhibitoren führen über eine Inhibition der HDACs zu einem erhöhten Vorliegen von acetylierten Proteinen, zu denen unter anderem Histon H3 und  $\alpha$ -Tubulin gehören. Zur Untersuchung, ob die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der HDAC-Inhibitoren zu einer vermehrten Acetylierung von Histon H3 und  $\alpha$ -Tubulin in den Zellen der Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 führt, wurden Analysen der Proteinexpression mittels Western-Blot-Verfahren durchgeführt.

Die Zellviabilität der Zellen der Zelllinien NEC-DUE1 nach Inkubation mit den verschiedenen HDAC-Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen ist in Abb. 3 dargestellt. Die Werte wurden logarithmisch aufgetragen und zeigen für die HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Panobinostat und Entinostat den typischen sigmoidalen Kurvenverlauf einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität durch die jeweiligen HDAC-Inhibitoren ist bei jedem der fünf HDAC-Inhibitoren signifikant. Die Potenz von Droxinostat war aufgrund des fehlenden sigmoidalen Verlaufs der Kurve und einem hohen IC50-Wert in Bezug auf die untersuchten Zelllinien jedoch niedrig.

Neben den Konzentration-Wirkungs-Kurven ist in Abb. 3 die mittels Western Blot untersuchte Acetylierung von Histon H3 und  $\alpha$ -Tubulin dargestellt. Hier zeigt sich analog zu den MTS-Assays bei den HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Panobinostat und Entinostat eine konzentrationsabhängige Acetylierung der beiden Proteine. Lediglich bei dem selektiven HDAC-Inhibitor Droxinostat konnte für die untersuchten Konzentrationen keine vermehrte Acetylierung gezeigt werden.



**Abb. 3: Zellviabilität und Proteinacetylierung der Zelllinie NEC-DUE1 nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren**

**A-E** Repräsentatives Ergebnis der MTS-Assays aus  $n=3$  in halbalgorithmischer Darstellung der am Stoffwechsel teilnehmenden Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen HDAC-Inhibitor in Prozentangabe in Bezug auf DMSO-Kontrollen. Angabe der IC50 Werte in  $\mu$ M.

**F-J** Repräsentative Western-Blot-Ergebnisse der Expression von Histon H3 und  $\alpha$ -Tubulin sowie acetyliertes Histon H3 und acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin nach 72 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen HDAC-Inhibitor sowie DMSO.

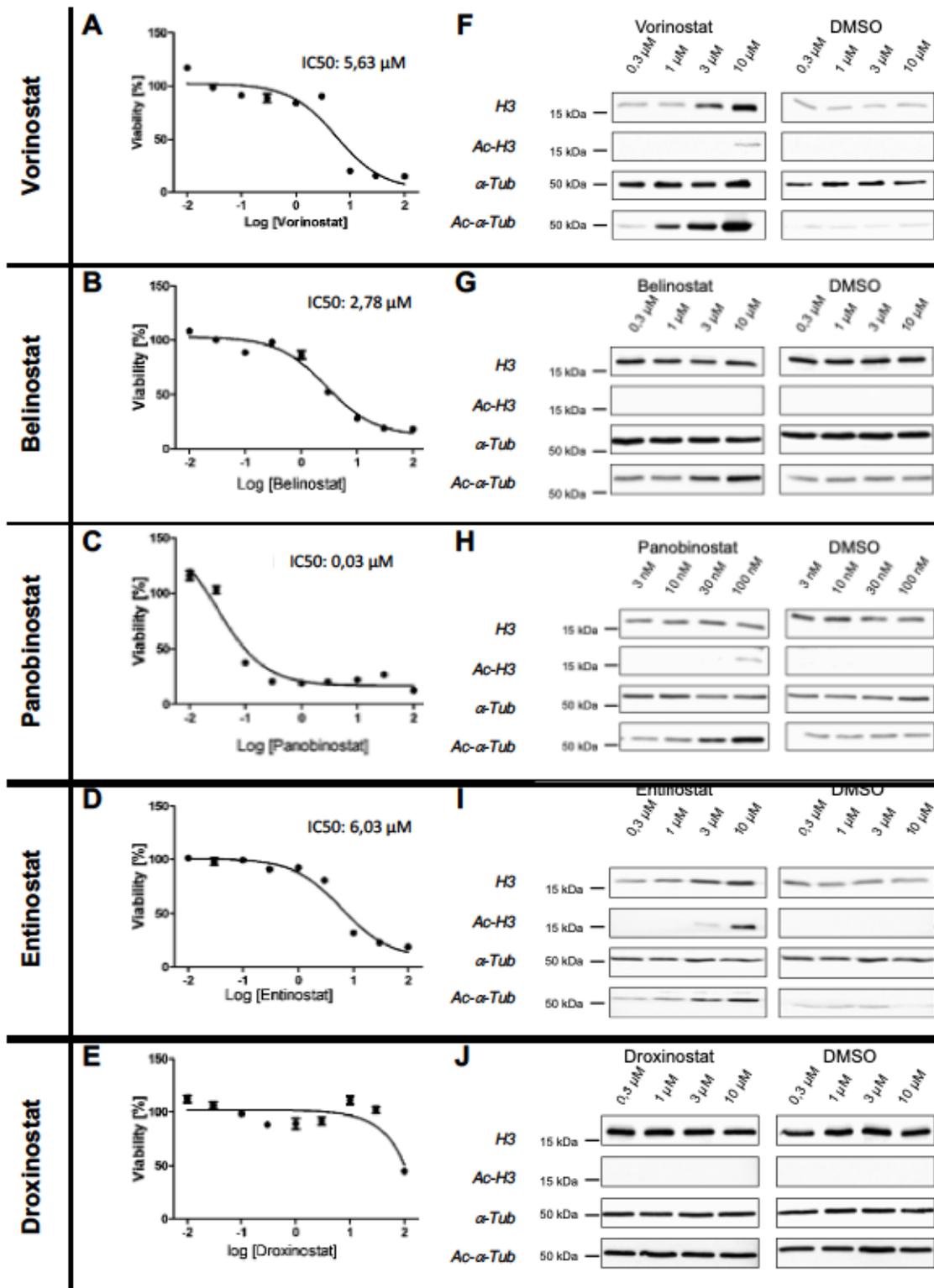
Tabelle 16 zeigt die Signifikanzniveaus der Unterschiede in der Viabilität für die einzelnen Konzentrationen mit größtenteils hochsignifikanten Ergebnissen mit einem  $p < 0,5$  und in vielen Fällen  $p < 0,01$ .

	Vorinostat	Belinostat	Panobinostat	Entinostat	Droxinostat
$\mu\text{M}$	Signifikanzniveau				
0,01 vs. 1	ns	ns	ns	ns	ns
0,01 vs. 3	$p < 0,01$	$p < 0,05$	ns	$p < 0,01$	ns
0,01 vs. 10	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	ns
0,01 vs. 30	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,05$
0,01 vs. 100	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
0,03 vs. 100	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,05$
0,1 vs. 100	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	ns
0,3 vs. 100	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	ns
1 vs. 100	ns	ns	$p < 0,01$	ns	ns
3 vs. 100	ns	ns	$p < 0,05$	ns	$p < 0,01$

**Tabelle 16: Statistische Auswertung der Viabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Compound-Konzentrationen nach Behandlung der Zelllinie NEC-DUE1**

Signifikanzniveaus der Viabilitätsunterschiede zwischen den Konzentrationen des jeweiligen HDAC-Inhibitors im Vergleich der Mittelwerte mittels Kruskal-Wallis-Test und post-hoc Dunn-Bonferroni-Korrektur

Die konzentrationsabhängige Acetylierung von Histon H3 und  $\alpha$ -Tubulin ließ sich bei der Zelllinie NEC-DUE2 nach Inkubation mit Vorinostat, Panobinostat und Entinostat mittels Western-Blot-Verfahren zeigen. Die Inkubation mit den vier unterscheidlichen Konzentrationen an Belinostat führte zu einer Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin. Die Acetylierung von Histon H3 war jedoch durch die untersuchten Konzentrationen nicht nachzuweisen.



**Abb. 4: Zellviabilität und Proteinacetylierung der Zelllinie NEC-DUE2 Behandlung mit HDAC-Inhibitoren**

**A-E** Repräsentatives Ergebnis der MTS-Assays aus  $n=3$  in halbalgorithmischer Darstellung der am Stoffwechsel teilnehmenden Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen HDAC-Inhibitor in Prozentangabe in Bezug auf DMSO-Kontrollen. Angabe der IC50 Werte in  $\mu\text{M}$ .

**F-J** Repräsentative Western-Blot-Ergebnisse der Expression von Histon H3 und  $\alpha$ -Tubulin sowie acetyliertes Histon H3 und acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin nach 72 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen HDAC-Inhibitor sowie DMSO.

Auch die Zellen der Zelllinie NEC-DUE2 wurden durch alle fünf HDAC-Inhibitoren in ihrer Viabilität deutlich reduziert. Wie in Abb.4 gezeigt, waren hierfür bei den HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Entinostat und Droxinostat jedoch höhere Konzentrationen nötig, um die halbmaximale Inhibition zu erreichen. Lediglich Panobinostat unterschied sich nur geringfügig in seiner IC50 bei den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2.

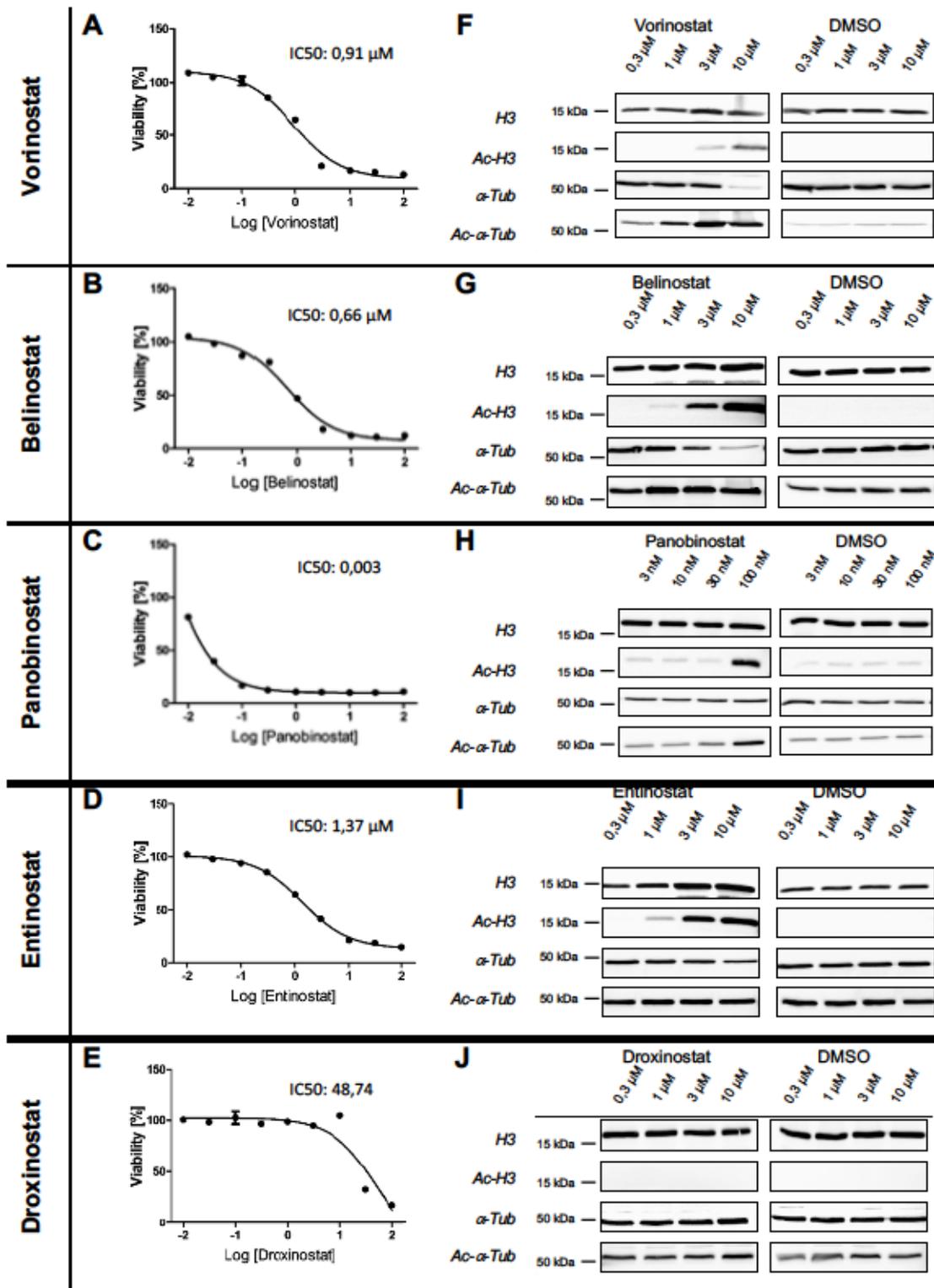
	<b>Vorinostat</b>	<b>Belinostat</b>	<b>Panobinostat</b>	<b>Entinostat</b>	<b>Droxinostat</b>
<b>µM</b>	<b>Signifikanzniveau</b>				
0,01 vs. 1	p < 0,05	ns	ns	ns	ns
0,01 vs. 3	ns	p < 0,01	ns	ns	ns
0,01 vs. 10	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	ns
0,01 vs. 30	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
0,01 vs. 100	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
0,03 vs. 100	p < 0,01	p < 0,01	ns	p < 0,01	ns
0,1 vs. 100	p < 0,01	p < 0,01	ns	ns	ns
0,3 vs. 100	ns	p < 0,01	p < 0,01	ns	ns
1 vs. 100	ns	ns	p < 0,01	ns	ns
3 vs. 100	ns	ns	p < 0,01	ns	p < 0,01

**Tabelle 17: Statistische Auswertung der Viabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Compound-Konzentrationen nach Behandlung der Zelllinie NEC-DUE2**

Signifikanzniveaus der Viabilitätsunterschiede zwischen den Konzentrationen des jeweiligen HDAC-Inhibitors im Vergleich der Mittelwerte mittels Kruskal-Wallis-Test und post-hoc Dunn-Bonferroni-Korrektur

Wie in Tabelle 17 gezeigt wurde für alle fünf HDAC-Inhibitoren eine hochsignifikante Reduktion der Zellviabilität durch eine Konzentration von 30 µM und 100 µM HDAC-Inhibitor im Vergleich zu einer Konzentration von 0,01 µM nachgewiesen.

Für die Zelllinie NEC-DUE3 konnten sowohl eine hochsignifikante Reduktion der Zellviabilität durch ansteigende Konzentrationen des HDAC-Inhibitors im MTS-Assay als auch eine Acetylierung der Proteine Histon H3 und  $\alpha$ -Tubulin durch die Pan-HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Panobinostat und den selektiven HDAC-Inhibitor Entinostat im Western Blot gezeigt werden. Abb. 5 veranschaulicht, dass insgesamt die mittlere Hemmkonzentration der HDAC-Inhibitoren unter den Werten der Inkubation der beiden anderen Zelllinien liegt.



**Abb. 5: Zellviabilität und Proteinacetylierung der Zelllinie NEC-DUE3 nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren**

**A-E** Repräsentatives Ergebnis der MTS-Assays aus  $n=3$  in halbalgorithmischer Darstellung der am Stoffwechsel teilnehmenden Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen HDAC-Inhibitor in Prozentangabe in Bezug auf DMSO-Kontrollen. Angabe der IC50 Werte in  $\mu$ M.

**F-J** Western-Blot-Ergebnisse der Expression von Histon H3 und  $\alpha$ -Tubulin sowie acetyliertes Histon H3 und acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin nach 72 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen HDAC-Inhibitor sowie DMSO.

Wie in Tabelle 18 zu sehen, wurde auch bei dieser Zelllinie mittels Kruskal-Wallis-Test und post-hoc Dunn-Bonferroni-Korrektur eine signifikante Reduktion der Zellviabilität abhängig von der Konzentration des HDAC-Inhibitors festgestellt.

	Vorinostat	Belinostat	Panobinostat	Entinostat	Droxinostat
$\mu\text{M}$	Signifikanzniveau				
0,01 vs. 1	ns	ns	ns	ns	p < 0,01
0,01 vs. 3	p < 0,05	p < 0,05	ns	p < 0,01	ns
0,01 vs. 10	p < 0,01	p < 0,01	ns	p < 0,01	p < 0,05
0,01 vs. 30	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,01
0,01 vs. 100	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
0,03 vs. 100	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
0,1 vs. 100	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	ns
0,3 vs. 100	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05	ns
1 vs. 100	ns	ns	p < 0,01	ns	ns
3 vs. 100	ns	ns	p < 0,05	ns	ns

**Tabelle 18: Statistische Auswertung der Viabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Compound-Konzentrationen nach Behandlung der Zelllinie NEC-DUE3**

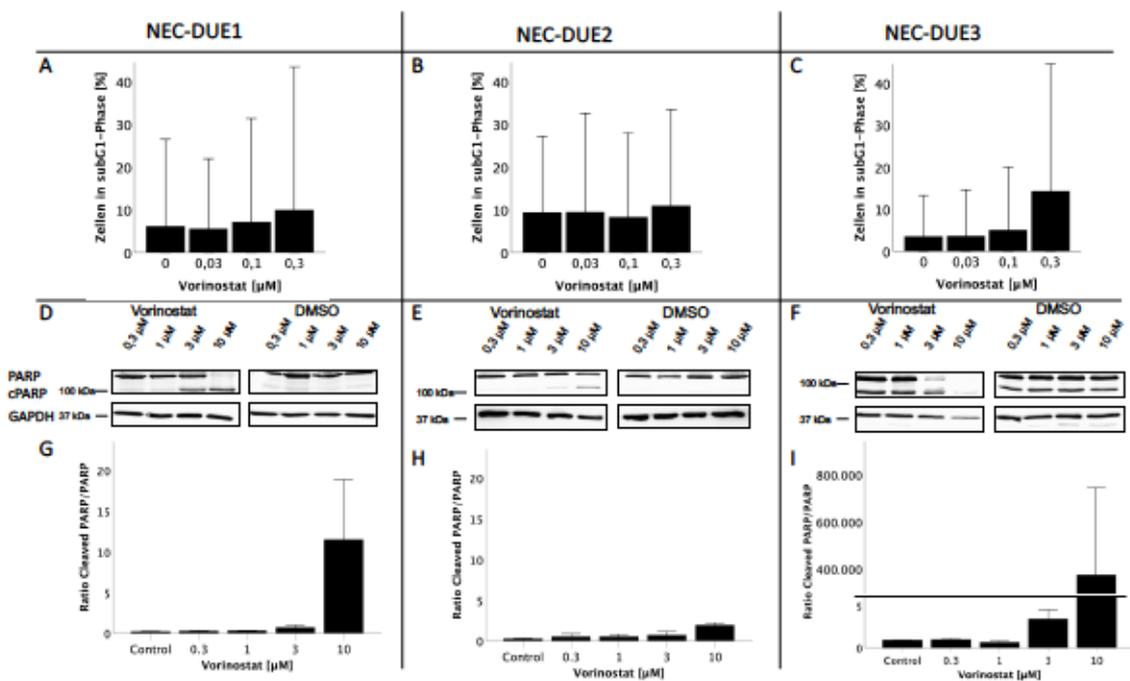
Signifikanzniveaus der Viabilitätsunterschiede zwischen den Konzentrationen des jeweiligen HDAC-Inhibitors im Vergleich der Mittelwerte mittels Kruskal-Wallis-Test und post-hoc Dunn-Bonferroni-Korrektur

### 3.2 Apoptoseinduktion und Expression der IAP nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren

Um zu untersuchen, ob die HDAC-Inhibitoren bei den Zellen der Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 Apoptose auslösen, wurde durch eine FACS-Untersuchung der Anteil der Zellen in der subG1-Phase an der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit dem jeweiligen HDAC-Inhibitor untersucht. Des Weiteren wurde mittels Western-Blot-Techniken überprüft, ob eine PARP-Spaltung stattgefunden hat, die im letzten Schritt der Apoptose durch die Caspasenkaskade induziert wird. Nachfolgend wurden Western-Blot-Analysen zu den IAPs cIAP1, cIAP2, XIAP und Survivin nach Inkubation mit den jeweiligen HDAC-Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, um festzustellen, ob die Apoptoseinduktion der HDAC-Inhibitoren auf einer veränderten Expression der IAPs beruht.

### 3.2.1 Apoptoseinduktion und Expression der IAP nach Behandlung mit Pan-HDAC-Inhibitoren

Zur Überprüfung, ob die von Vorinostat bedingte Abnahme der Zellviabilität auf der Induktion von Apoptose beruht, wurde durch Western-Blot-Verfahren die PARP-Spaltung detektiert sowie durch eine Durchflusszytometrie eine Zellzyklusanalyse durchgeführt, die den Anteil der Zellen in der subG1-Phase und damit den Anteil an apoptotischen Zellen bestimmt. Abb. 6 zeigt, dass Vorinostat bei den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 eine PARP-Spaltung, die durch die Caspasenkaskade im Signalweg der Apoptose ausgelöst wird, bewirkte. Die PARP-Spaltung ließ sich bei der Zelllinien NEC-DUE3 durch die Immunbanden nicht eindeutig erkennen, allerdings wies das Verhältnis von gespaltenem PARP (*cleaved* PARP) zu PARP in voller Länge (*full length* PARP), das sich durch eine Densitometrie der Immunbanden darstellen ließ, auf eine vermehrte PARP-Spaltung hin.



**Abb. 6: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Vorinostat**

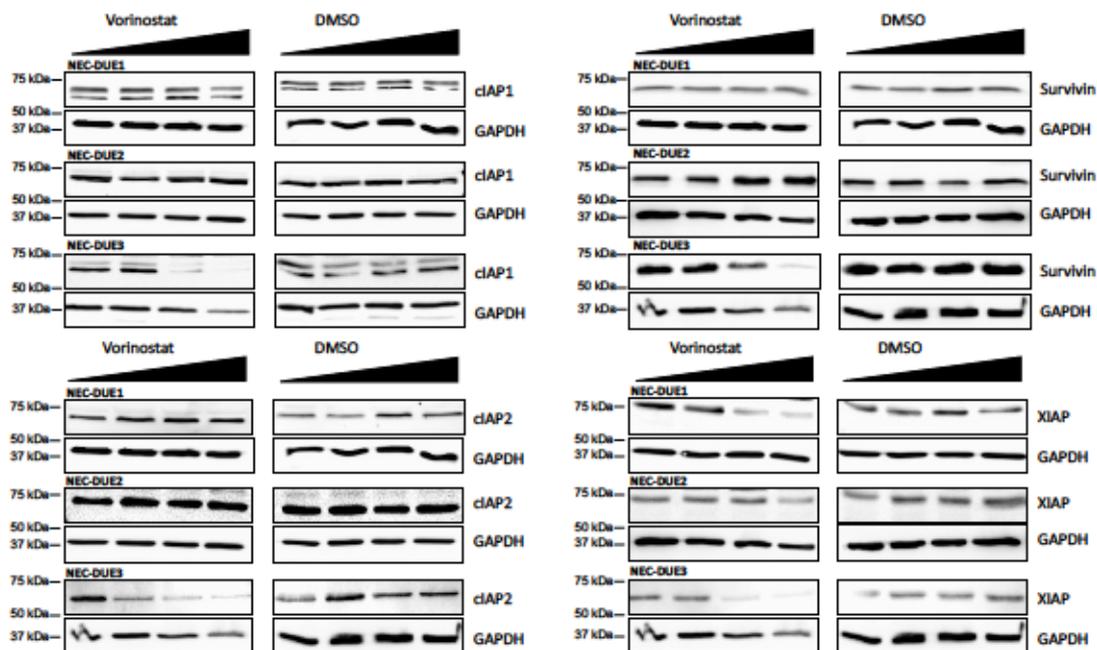
**A-C** FACS-Analyse nach Behandlung mit Vorinostat über 24 h. Mittelwerte und Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

**D-F** Repräsentatives Western-Blot-Ergebnis der Expression von PARP und *cleaved* PARP sowie GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Vorinostat über 72 h

**G-I** Verhältnis der Densitometrie von *cleaved*/PARP zu PARP mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

In weiteren Western-Blot-Verfahren wurde anschließend die Expression mehrerer IAPs in den mit Vorinostat behandelten Zellen untersucht, um genauer zu beurteilen, auf welche Weise der HDAC-Inhibitor zu einer Apoptose in den untersuchten Zelllinien

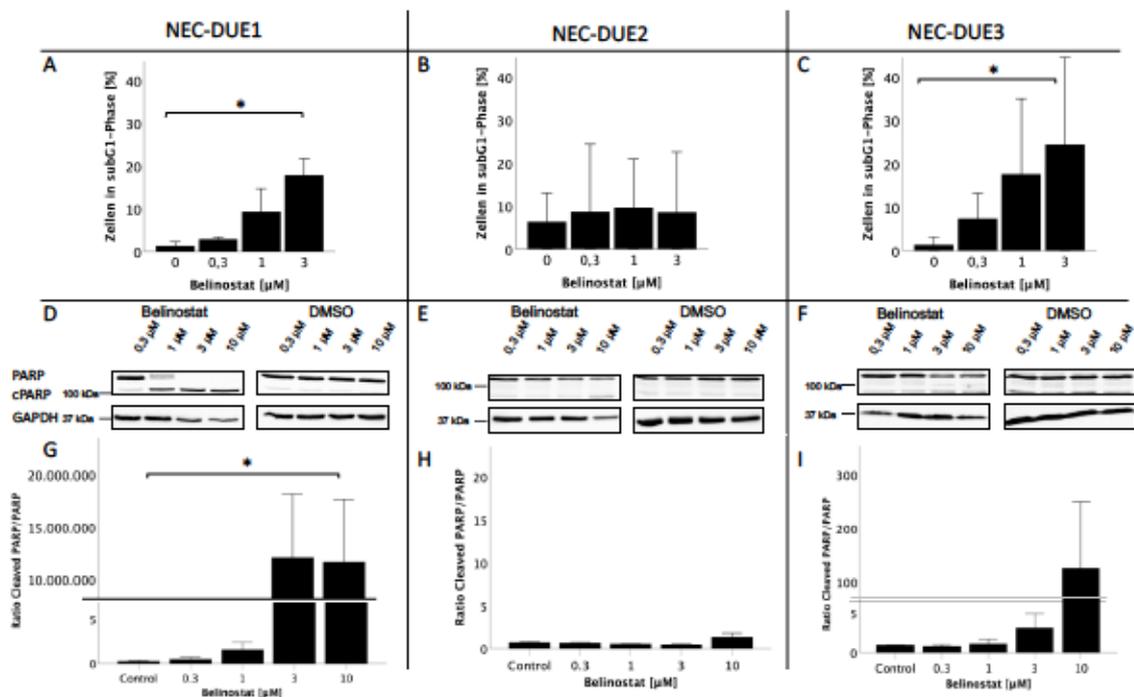
fürte. In Abb. 7 ist dargestellt, dass Vorinostat in allen drei Zelllinien eine Reduktion von XIAP erzielte. Analog dazu wurde in der Zelllinie NEC-DUE3 eine Reduktion von Survivin, cIAP1 und cIAP2 nach der Inkubation mit Vorinostat festgestellt. cIAP1 wurde auch bei der Zelllinie NEC-DUE1 nach Inkubation mit 10  $\mu$ M Vorinostat vermindert exprimiert.



**Abb. 7: Expression der IAPs nach Behandlung mit Vorinostat**

Repräsentative Western-Blot-Ergebnisse der Expression von cIAP1, cIAP2, Survivin und XIAP sowie von GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Vorinostat über 72 h

Die Inkubation mit dem pan-HDAC-Inhibitor Belinostat führte – wie in Abb. 8 dargestellt – in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 ebenfalls zu einer PARP-Spaltung sowie zu einer Verschiebung des Verhältnisses von *cleaved* PARP zu *full length* PARP zu Gunsten des *cleaved* PARPs in der Zelllinie NEC-DUE3. Durch die Densitometrie konnte für die Zelllinie NEC-DUE1 ein signifikanter Anstieg der ratio von *cleaved* PARP zu *full length* PARP mit einem  $p < 0,5$  festgestellt werden. Die Durchflusszytometrie ergab außerdem für die Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE3 einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen in der subG1-Phase. Auch Belinostat führte somit durch die Apoptose zu einer Reduktion der Zellviabilität.



**Abb. 8: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Belinostat**

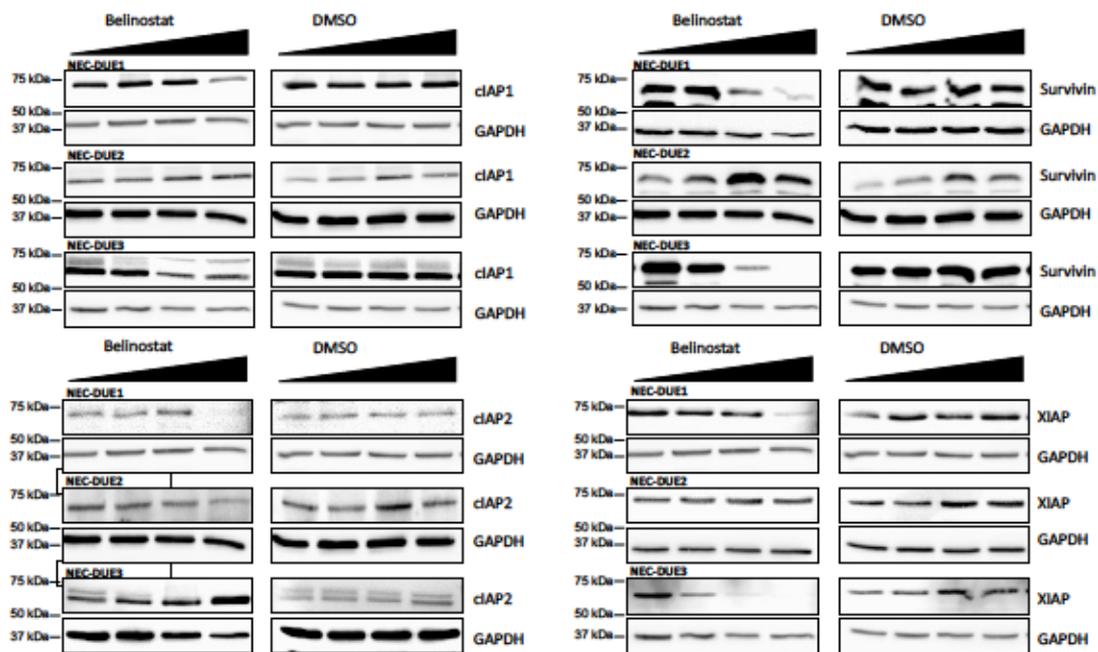
**A-C** FACS-Analyse nach Behandlung mit Belinostat über 24 h. Mittelwerte und

Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

**D-F** Repräsentatives Western-Blot-Ergebnis der Expression von PARP und cleaved PARP sowie GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Belinostat über 72 h

**G-I** Verhältnis der Densitometrie von cleaved/PARP zu PARP mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

Dies spiegelte sich ebenfalls in einer Reduktion mehrerer IAPs nach Inkubation mit Belinostat wider. Abb. 9 stellt die Western-Blot-Ergebnisse bezüglich der IAP-Expression nach Behandlung der Zellen mit Belinostat dar. Belinostat führte in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE3 zu einer dosisabhängigen verminderten Expression von XIAP. In der Zelllinie NEC-DUE2, deren Zellen lediglich nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Belinostat eine PARP-Spaltung aufwiesen, wurde keine Reduktion von XIAP oder cIAP1 nachgewiesen. Allerdings war cIAP2 nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Belinostat verringert. Im Gegensatz dazu war Survivin nach Inkubation der Zellen der Zelllinie NEC-DUE2 mit 10  $\mu\text{M}$  Belinostat vermehrt exprimiert.

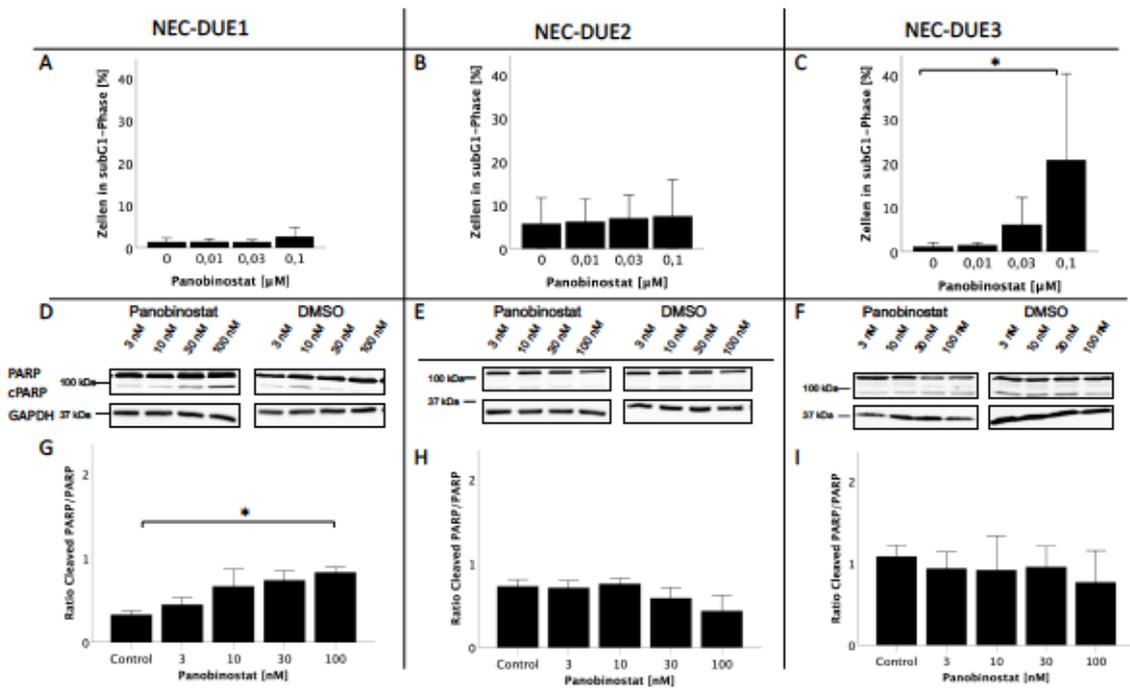


**Abb. 9: Expression der IAPs nach Behandlung mit Belinostat**

Repräsentative Western-Blot-Ergebnisse der Expression von cIAP1, cIAP2, Survivin und XIAP sowie von GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Belinostat über 72 h

In den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE3 wurde hingegen eine Reduktion von Survivin festgestellt. In beiden Zelllinien wurden auch cIAP1 und cIAP2 durch die Inkubation mit Belinostat konzentrationsabhängig vermindert exprimiert.

Die Inkubation mit Panobinostat führte in der Zelllinie NEC-DUE1 zu einer PARP-Spaltung, die einen signifikanten Anstieg von *cleaved* PARP im Verhältnis zu *full length* PARP in der Densitometrie ergab. Bei der Zelllinie NEC-DUE3 wurde ein signifikanter Anstieg der Zellen in der subG1-Phase festgestellt, wie in Abb.10 dargestellt. In beiden Zelllinien konnte somit eine Induktion der Apoptose durch Panobinostat nachgewiesen werden. Die Zelllinie NEC-DUE2 wies weder eine PARP-Spaltung noch einen Anstieg der apoptotischen Zellen auf. Da Panobinostat in den MTS-Assays eine verhältnismäßig niedrige IC50 hatte, wurden die Zellen aller drei Zelllinien für die Western-Blot-Analysen der IAPs mit niedrigeren Konzentrationen von Panobinostat (3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM) inkubiert.



**Abb. 10: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Panobinostat**

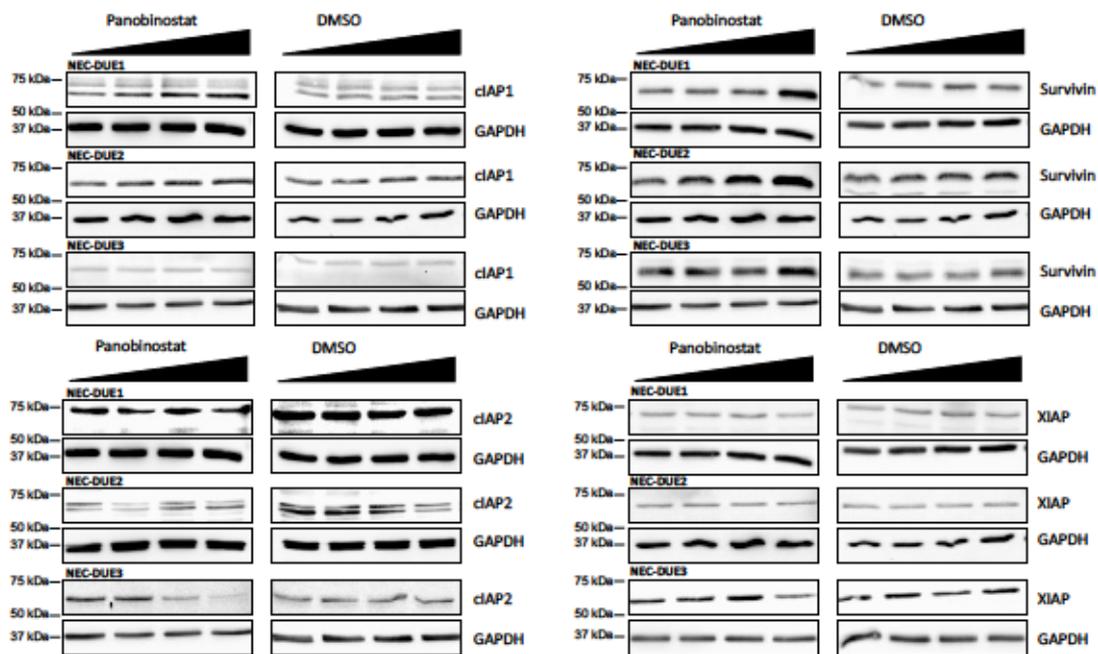
**A-C** FACS-Analyse nach Behandlung mit Panobinostat über 24 h. Mittelwerte und

Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

**D-F** Repräsentatives Western-Blot-Ergebnis der Expression von PARP und cleaved PARP sowie GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Panobinostat über 72 h

**G-I** Verhältnis der Densitometrie von cleaved/PARP zu PARP mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

Aus Abb. 11 ist ersichtlich, dass nur in der Zelllinie NEC DUE3 eine Verminderung der Expression von XIAP vorlag. Panobinostat führte zu keiner nachgewiesenen veränderten Expression von cIAP1. Allerdings wurde cIAP2 konzentrationsabhängig in allen drei Zelllinien reduziert exprimiert. Bei Survivin kam es durch die Inkubation mit dem Pan-HDAC-Inhibitor in allen drei Zelllinien zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg.

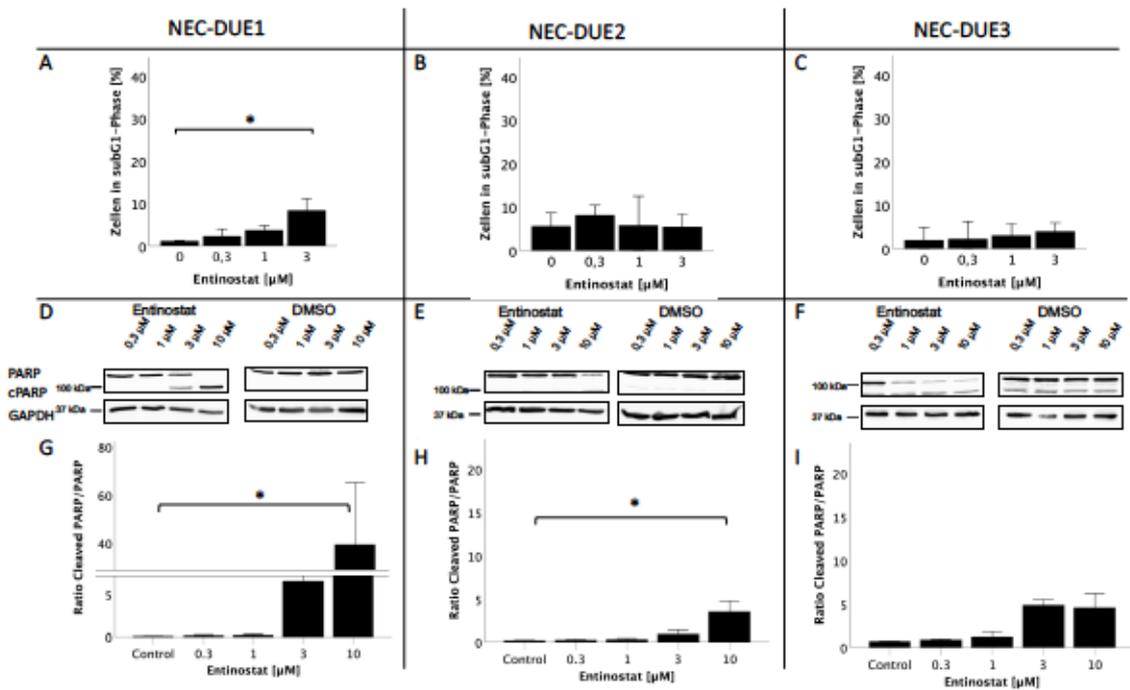


**Abb. 11: Expression der IAPs nach Behandlung mit Panobinostat**

Repräsentative Western-Blot-Ergebnisse der Expression von cIAP1, cIAP2, Survivin und XIAP sowie von GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Panobinostat über 72 h

### 3.2.2 Apoptoseinduktion und Expression der IAP nach Behandlung mit selektiven HDAC-Inhibitoren

Entinostat führte in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 zu einem signifikanten Anstieg von *cleaved* PARP im Verhältnis zu *full length* PARP in der Densitometrie sowie zu einer sichtbaren Bande von *cleaved* PARP im Western Blot, wie in Abb. 12 dargestellt. Auch in den Zelllinien NEC-DUE3 kam es zu einem Anstieg der ratio von *cleaved* PARP zu PARP. Die Zelllinie NEC-DUE1 wies außerdem einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen in der subG1-Phase in der Durchflusszytometrie auf. Folglich führte auch der selektive HDAC-Inhibitor zu einer Apoptoseinduktion bei den Zelllinien NEC-DUE1 und 2 und vermutlich NEC-DUE3.



**Abb. 12: Apoptoseren und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Entinostat**

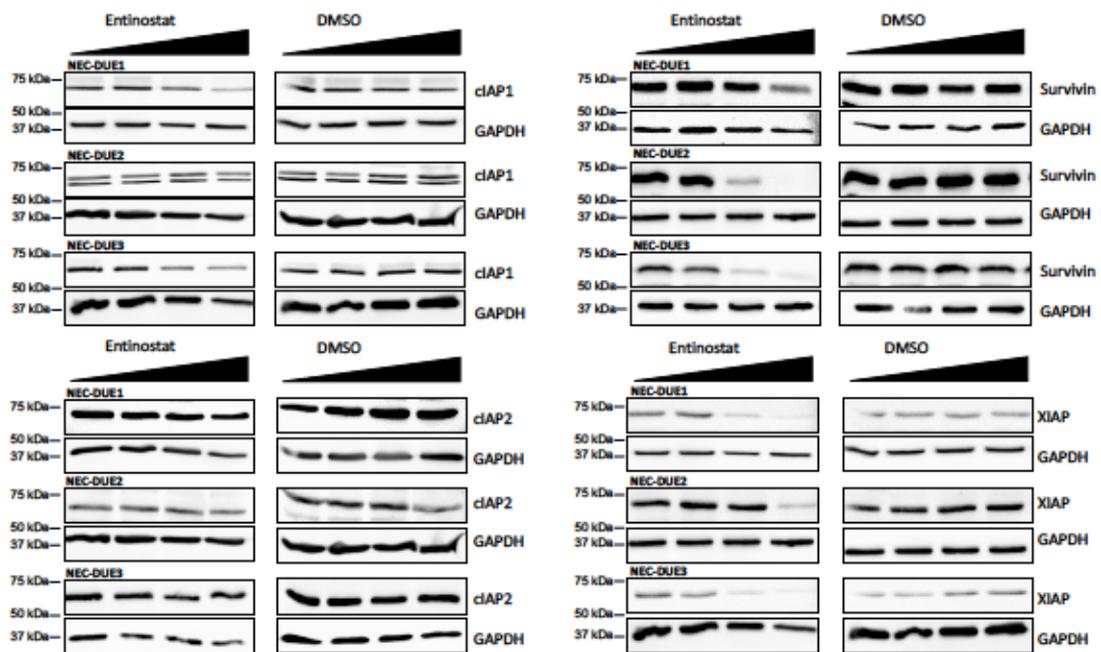
**A-C** FACS-Analyse nach Behandlung mit Entinostat über 24 h. Mittelwerte und

Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

**D-F** Repräsentatives Western-Blot-Ergebnis der Expression von PARP und cleaved PARP sowie GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Entinostat über 72 h

**G-I** Verhältnis der Densitometrie von cleaved/PARP zu PARP mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

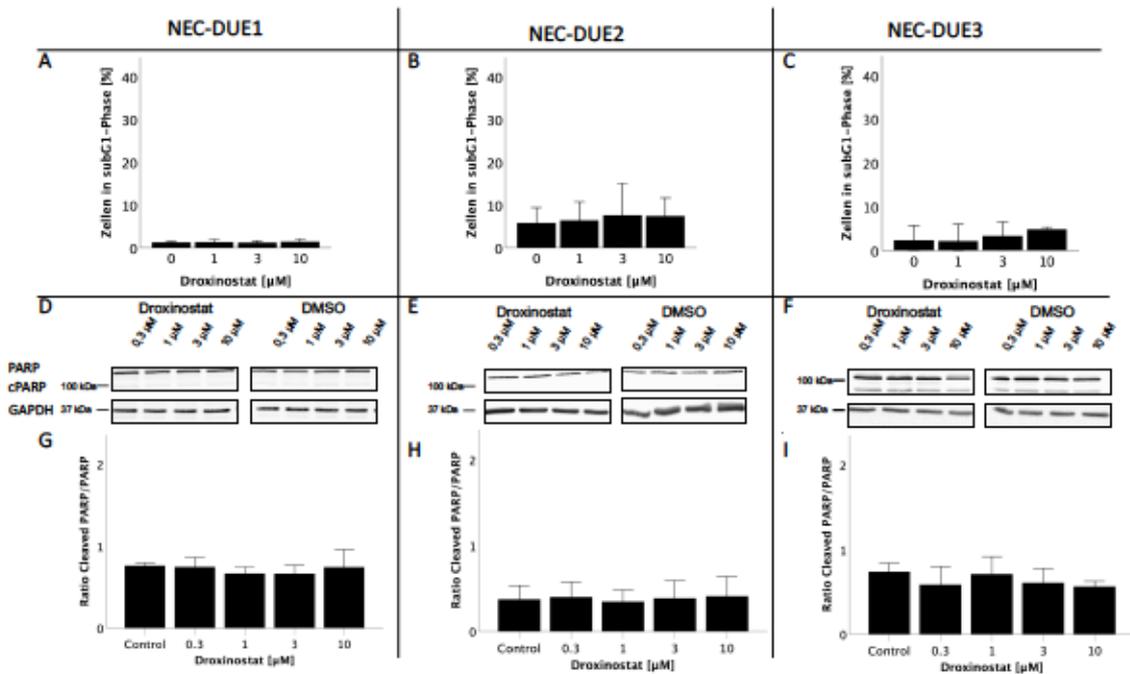
Entinostat bewirkte – wie in Abb. 13 zu sehen – eine reduzierte Expression von XIAP sowie von Survivin und cIAP1 in allen drei Zelllinien. cIAP2 jedoch zeigte eine unveränderte Expression nach Inkubation mit Entinostat.



**Abb. 13: Expression der IAPs nach Behandlung mit Entinostat**

Repräsentative Western-Blot-Ergebnisse der Expression von cIAP1, cIAP2, Survivin und XIAP sowie von GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Entinostat über 72 h

Im Zusammenhang mit der vergleichsweise geringen Reduktion der Zellviabilität durch Droxinostat konnten durch die Durchflusszytometrie sowie durch die PARP-Spaltung keine Hinweise auf eine Apoptoseinduktion festgestellt werden, wie am unveränderten Anteil an Zellen in der subG1-Phase sowie einem ausbleibenden Anstieg von *cleaved* PARP im Verhältnis zu *full length* PARP in Abb. 14 zu sehen ist.



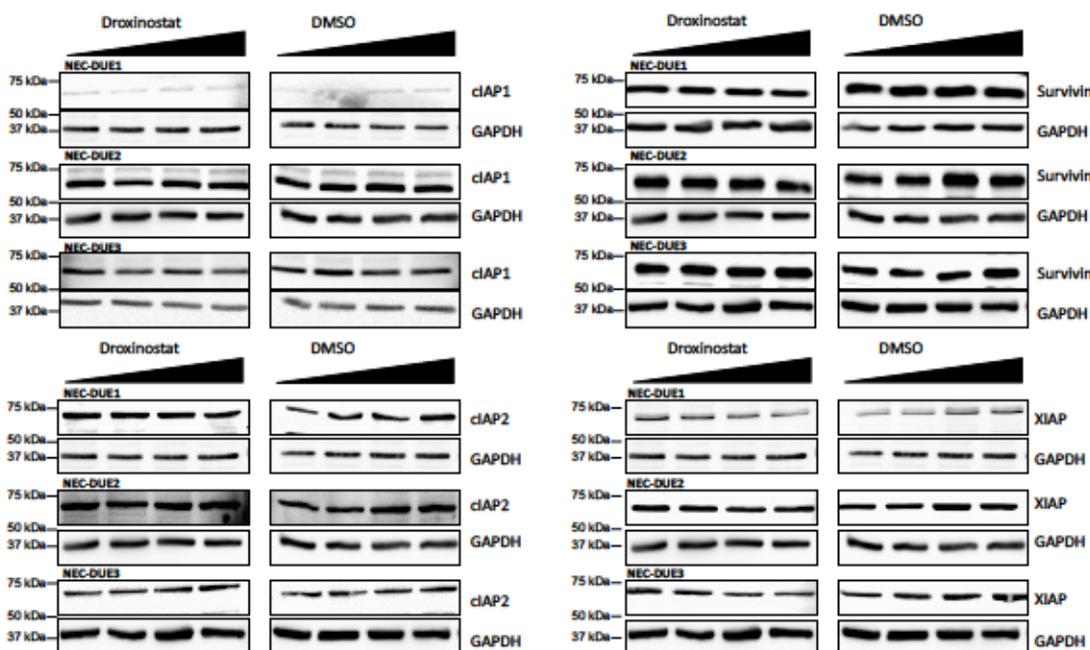
**Abb. 14: Apoptoseraten und PARP-Spaltung nach Behandlung mit Droxinostat**

A-C FACS-Analyse nach Behandlung mit Droxinostat über 24 h. Mittelwerte und Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

D-F Repräsentatives Western-Blot-Ergebnis der Expression von PARP und cleaved PARP sowie GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Droxinostat über 72

G-I Verhältnis der Densitometrie von cleaved/PARP zu PARP mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus mind. 3 unabhängigen Experimenten

Analog dazu zeigt Abb. 15, dass keine veränderte Expression der IAP nach Behandlung der Zellen mit Droxinostat vorlag.



**Abb. 15: Expression der IAPs nach Behandlung mit Droxinostat**

Repräsentative Western-Blot-Ergebnisse der Expression von cIAP1, cIAP2, Survivin und XIAP sowie von GAPDH zur Ladungskontrolle nach Behandlung mit Droxinostat über 72 h

### 3.2.3 Zusammenfassung der veränderten IAP-Expression nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren

Anhand der Western-Blot-Ergebnisse ist in Tabelle 19 eine Übersicht zu allen verwendeten HDAC-Inhibitoren und den festgestellten Veränderungen in der Expression der einzelnen IAPs in den verschiedenen Zelllinien dargestellt. Zusammenfassend wies die Zelllinie NEC-DUE2 analog zu der geringeren Reduktion der Zellviabilität durch die HDAC-Inhibitoren in den MTS-Assays weniger Veränderungen der IAP-Expression auf. Nichtsdestotrotz ergaben sich durch eine PARP-Spaltung oder einen erhöhten Anteil von Zellen in der subG1-Phase nach der Inkubation mit Vorinostat, Belinostat und Entinostat Anzeichen einer Apoptoseinduktion durch diese Therapeutika.

	Vorinostat			Belinostat			Panobinostat			Entinostat			Droxinostat		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
cIAP1	▼	□	▼	▼	□	▼	□	□	□	▼	▼	▼	□	□	□
cIAP2	□	□	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	□	□	□	□	□	□
XIAP	▼	▼	▼	▼	□	▼	□	□	▼	▼	▼	▼	□	□	□
Survivin	□	□	▼	▼	↑	▼	↑	↑	↑	▼	▼	▼	□	□	□

**Tabelle 19: Übersicht über veränderte Expression der IAPs nach Behandlung mit den einzelnen HDAC-Inhibitoren**

Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse nach vermehrter (↑), verminderter (▼) oder unveränderter (□) Expression von cIAP1, cIAP2, XIAP und Survivin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle

Erwartungsgemäß führte Droxinostat weder zu Veränderungen der IAP-Expression noch zu einer PARP-Spaltung oder einem erhöhten Prozentsatz von apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie.

Der selektive HDAC-Inhibitor Entinostat induzierte in allen drei Zelllinien eine PARP-Spaltung oder einen höheren Anteil apoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie. Außerdem kam es durch Inkubation mit Entinostat in allen drei Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen verminderten Expression von cIAP1, XIAP und Survivin.

## 4 Diskussion

Nach Diagnosestellung eines GEP NEC liegt die mittlere Überlebenszeit je nach Literatur zwischen 4 und 16 Monaten. Durch eine Chemotherapie in neoadjuvanter oder adjuvanter Durchführung kann das Überleben um wenige Monate verlängert werden. Insgesamt sind die Therapieoptionen sehr begrenzt und die Prognose für die betroffenen Patient:innen dramatisch. Neue Therapieoptionen, die zu einer längeren Remission oder gar zu einem kurativen Therapieansatz führen, werden dringend benötigt und sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Eine *targeted therapy* der GEP-NEC ist aufgrund bisher nicht identifizierter Ziel-Onkogene nicht etabliert.

Ursprünglich ging man davon aus, dass die Entstehung von Krebs in genetischen Veränderungen begründet ist. Mittlerweile konnte die Forschung jedoch nachweisen, dass viele unterschiedliche Mechanismen zur malignen Entartung von Zellen führen können. Dazu gehören unter anderem die epigenetischen Veränderungen (Virani, Colacino, Kim, & Rozek, 2012).

NET weisen im Vergleich zu anderen bösartigen Tumoren eine relativ geringe Rate an genetischen Mutationen auf, sodass die maligne Potenz auf anderen zellulären Mechanismen zu beruhen scheint. Dazu gehören die epigenetische Modifikation durch DNA-Methylierung und Histonacetylierung.

Nachgewiesen werden konnte in mehreren Studien bereits eine Hypermethylierung diverser Promotor und Enhancer, die zu einer verminderten Translation von Tumorsuppressorgenen in pankreatischen und intestinalen NET führt (Fotouhi et al., 2014; House et al., 2003; Tirosh & Kebebew, 2020). Klieser et al. wiesen nach, dass die Expressionlevel bestimmter HDACs in pankreatischen NET im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht sind und die Expressionslevel mit einer höheren Malignität der Tumore korrelieren (Klieser et al., 2017).

Darauf basierend ergibt sich ein neuer hoffnungsvoller Therapieansatz für NEC mit Substanzen, die spezifisch die epigenetische Modifikationen, vor allem die Histonacetylierung, beeinflussen.

HDAC-Inhibitoren setzen genau an dieser Stelle an und bewirken durch eine Acetylierung der Histone unterschiedliche epigenetische Veränderungen.

HDAC-Inhibitoren sind bereits für die Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms sowie des peripheren T-Zell-Lymphoms und des multiplen Myeloms zugelassen. In den Einsatz in der Therapie weiterer Krebserkrankungen insbesondere in der Therapie solider Tumore wird intensive wissenschaftliche Arbeit investiert (Bolden et al., 2006). Die große Hoffnung, die in diese zielgerichteten Therapeutika gesetzt wird, besteht darin, dass sie ihre Wirkung hauptsächlich in den maligne entarteten Zellen entfalten und damit zu deutlich weniger Nebenwirkungen als herkömmliche Chemotherapeutika sowie zu einem besseren Therapieergebnis führen. Außerdem können sie durch die epigenetischen Modifikationen zu einer Sensibilisierung der malignen Zellen für eine herkömmliche Chemotherapie führen.

Bei der Proliferation und bei der Chemoresistenz von Krebszellen spielen unter anderem die IAP eine wichtige Rolle (Michie et al., 2020; Rathore et al., 2017). Survivin ist bei G3-GEP-NEC mit einer schlechteren Prognose und XIAP mit einer vermehrten Proliferation und erhöhtem Tumorwachstum in vitro assoziiert (Dizdar et al., 2017; Grabowski et al., 2005).

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit von HDAC-Inhibitoren auf G3-GEP-NEC zu untersuchen und die Beeinflussung von IAP sowie die Induktion von Apoptose durch die untersuchen HDAC-Inhibitoren aufzuklären.

#### **4.1 Chemosensitivität der GEP-NEC gegenüber HDAC-Inhibitoren**

Die Ansprechrate von GEP-NEC auf die Erstlinien-Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid liegt bei ungefähr 30 % und die mittlere Überlebensdauer bei lediglich ungefähr einem Jahr (Garcia-Carbonero et al., 2016). Die Kombination von Cisplatin mit Irinotecan führte bei japanischen Patient:innen mit ösophagealem NEC zu einer Ansprechrate von 50 % mit einer mittleren Überlebensdauer von ebenfalls ungefähr einem Jahr (Okuma et al., 2014). Dieses schlechte Anprechen von GEP-NEC auf herkömmliche Chemotherapeutika unterstreicht den dringenden Bedarf an einer wirksamen, zielgerichteten Therapie (Venizelos et al., 2021).

#### **4.1.1 HDAC-Inhibitoren reduzieren Zellviabilität von GEP-NEC**

Die Zelllinien NEC-DUE1, NEC-DUE2 und NEC-DUE3 wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität auf Etoposid und Cisplatin durch unsere Arbeitsgruppe mittels MTS-Assays getestet. NEC-DUE1 zeigte eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität nach Inkubation mit Etoposid (IC<sub>50</sub>: 0,6  $\mu$ M), jedoch keine Chemosensitivität für Cisplatin. Die Inkubation der Zelllinie NEC-DUE2 mit Cisplatin und Etoposid führte in beiden Fällen nicht zu einer typischen S-Form der Kurve mit Abfall der Zellviabilität, sodass eine Resistenz der Zellen gegenüber der beiden etablierten Chemotherapeutika anzunehmen ist. NEC-DUE3 wies keine adäquate Reduktion der Zellviabilität nach Inkubation mit Etoposid auf, aber eine Sensitivität gegenüber Cisplatin (IC<sub>50</sub>: 1,04  $\mu$ M).

Zum Nachweis einer Chemosensitivität der drei untersuchten Zelllinien gegenüber den verwendeten HDAC-Inhibitoren wurden ebenfalls MTS-Assays durchgeführt. Die Inkubation aller drei Zelllinien mit den Pan-HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat und Panobinostat und mit den selektiven HDAC-Inhibitoren Entinostat und Droxinostat führte mit steigender Konzentration des Wirkstoffes zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität aller drei Zelllinien. Bei Droxinostat waren jedoch vergleichsweise hohe Wirkstoffkonzentrationen nötig, sodass ein klinischer Nutzen der Wirkung unwahrscheinlich ist. Die Zelllinie NEC-DUE2, die sich resistenter gegenüber Cisplatin und Etoposid zeigte, wies im Vergleich zu den anderen Zelllinien in der Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren ebenfalls höhere mittlere Hemmkonzentrationen auf.

#### **4.1.2 HDAC-Inhibitoren führen zur Proteinacetylierung in GEP-NEC**

Wenn die HDAC-Aktivität durch die HDAC-Inhibitoren gehemmt wird, kommt es zu einem vermehrten Auftreten acetylierter Histone und anderer acetylierter Proteine (Mehnert & Kelly, 2007; Richon et al., 2000; Sanaei & Kavooosi, 2019). In Korrelation zur signifikanten und konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellviabilität, die durch die MTS-Assays gezeigt werden konnte, wurde durch die Western-Blot-Assays eine konzentrationsabhängige Zunahme von acetyliertem Histon H3 und acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen. Dies belegt, dass die Reduktion der Zellviabilität mit der typischen Wirkungsweise der HDAC-Inhibitoren assoziiert ist.

## 4.2 HDAC-Inhibitoren induzieren Apoptose in GEP-NEC-Zellen in vitro

Die Acetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen durch HDAC-Inhibitoren ist weitreichend belegt, wohingegen die dadurch ausgelösten Effekte in den Zellen aufgrund ihrer Vielfältigkeit bisher noch nicht vollkommen verstanden und untersucht sind. Diverse Versuche und Studien belegen jedoch eine Induktion der Apoptose durch HDAC-Inhibitoren (Al-Yacoub et al., 2012; Mehnert & Kelly, 2007; Perez-Perarnau et al., 2011; Sanaei & Kavooosi, 2019).

Die Inkubation der Zellen der Zelllinie NEC-DUE1 mit den Pan-HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat und Panobinostat führte abhängig von der Konzentration des HDAC-Inhibitors zu einer PARP-Spaltung, die in der Exekutionsphase der Apoptose stattfindet und damit Anzeichen einer erhöhten Apoptoserate ist. Auch der selektive HDAC-Inhibitor Entinostat bewirkte eine Spaltung von PARP in den Zellen der Zelllinie NEC-DUE1. Für Entinostat und Belinostat konnte außerdem durch eine Durchflusszytometrie nach PI-Färbung eine signifikant erhöhte Zellzahl der Zelllinie NEC-DUE1 in der subG1-Phase festgestellt werden, die aus fragmentierten, apoptotischen Zellen besteht. Die Inkubation der Zelllinie NEC-DUE1 mit Droxinostat führte zu keiner PARP-Spaltung und zu keinem erhöhten Anteil der Zellen in der subG1-Phase.

In den Zellen der Zelllinie NEC-DUE1 konnte folglich durch die HAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Panonbinostat und Entinostat Apoptose induziert werden.

Der Nachweis der HDAC-Inhibitor-induzierten PARP-Spaltung in der Zelllinie NEC-DUE3 gelang nicht, weil die Zellen nach Inkubation mit DMSO als Kontrolle bereits eine relevante Spaltung von PARP aufwiesen. Allerdings führte die Inkubation mit Belinostat und Panobinostat zu einem signifikant erhöhten Anteil der Zellen in der subG1-Phase als Korrelat einer erhöhten Apoptoserate.

Obwohl die Zelllinie NEC-DUE2 im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien resistenter gegenüber den untersuchten HDAC-Inhibitoren ist, bewirkte die Inkubation mit Vorinostat, Belinostat und Entinostat eine PARP-Spaltung. Folglich ist von einer Apoptoseinduktion durch diese HDAC-Inhibitoren auszugehen.

Alle untersuchten Pan-HDAC-Inhibitoren und der selektive HDAC-Inhibitor Entinostat führen zu einer Apoptoseinduktion, die sich durch PARP-Spaltung oder einen signifikant erhöhten Anteil der Zellen in der subG1-Phase zeigte, allerdings nicht jeder HDAC-Inhibitor in jeder Zelllinie. Belinostat ist der einzige untersuchte HDAC-Inhibitor, der in allen drei Zelllinien Apoptose induzierte. Vorinostat und Entinostat führten lediglich in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 und Panobinostat in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE3 zu einer nachweisbaren Apoptoseinduktion. Nach Inkubation mit dem selektiven HDAC-Inhibitor Droxinostat wiesen die Zellen aller drei Zelllinien keine Anzeichen einer stattgehabten Apoptoseinduktion auf.

### **4.3 Bedeutung der IAP in der Therapie der GEP-NEC**

Viele Krebsarten weisen eine erhöhte Aktivität von IAPs auf, die dazu führt, dass der programmierte Zelltod verringert auftritt und die Resistenz gegenüber herkömmlicher Chemotherapie erhöht wird (Michie et al., 2020). Eine zielgerichtete Krebstherapie, die die IAPs in ihrer Aktivität hemmt, kann Apoptose auslösen oder die Zellen für eine herkömmliche Chemotherapie sensibilisieren (Hassan, Watari, AbuAlmaaty, Ohba, & Sakuragi, 2014). HDAC-Inhibitoren wirken gezielt in maligne entarteten Zellen und gehören somit zur zielgerichteten Krebstherapie. Zudem konnte bei diversen Krebserkrankungen durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren bereits eine Sensibilisierung für Chemotherapeutika nachgewiesen werden (Eckschlager, Plch, Stiborova, & Hrabeta, 2017; Hassan et al., 2014).

Die IAPs sind in maligne entarteten Zellen daran beteiligt, dass die Zelle den programmierten Zelltod umgeht und resistenter gegenüber konventionellen Chemotherapeutika ist (Michie et al., 2020). Rosato et al. konnten bereits zeigen, dass XIAP durch die in-vitro-Inkubation von leukämischen Zellen mit Vorinostat herunterreguliert wird (Rosato et al., 2007). Al Yacoub et al. wiesen eine signifikant geringere Expression von XIAP und Survivin nach Inkubation von Zellen eines kutanen T-Zell-Lymphoms mit Vorinostat nach (Al-Yacoub et al., 2012).

Dizdar et al. stellten fest, dass in 60 % der untersuchten GEP-NENs copy number gains für Survivin und in 26.7% für XIAP vorlagen (Dizdar et al., 2017).

Nach unserem Kenntnisstand gibt es derzeit keine Forschungsarbeiten zur Hemmung der IAP-Expression durch HDAC-Inhibitoren in GEP-NEC und der davon abhängigen Apoptoseinduktion. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Apoptoseinduktion durch die HDAC-Inhibitoren mit einer verminderten Expression von IAPs korreliert.

#### **4.3.1 Survivin als therapeutisches Ziel in GEP-NEC**

Survivin scheint in der Proliferation von GEP-NEN eine wichtige Rolle zu spielen. Grabowski et al. stellten fest, dass das Vorhandensein von nukleärem Survivin mit einer signifikant verkürzten Lebensdauer assoziiert ist (Grabowski et al., 2005) und auch in unserer Arbeitsgruppe konnte in einer multivariaten Analyse Survivin als potentiell wichtige Zielstruktur in GEP-NEC herausgestellt werden. G3 GEP-NEC wiesen in der Analyse hohe Level an zytoplasmatischem und nukleärem Survivin auf (Dizdar et al., 2017). Ein *knockdown* von Survivin führte in den Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 zu einer Inhibition der Zellproliferation und des Tumorwachstums.

Mehrere Studien belegen außerdem, dass Survivin in maligne entarteten Zellen durch diverse epigenetische Modifikationen vermehrt exprimiert wird (Dizdar et al., 2017; Lyu, Huang, He, & Liu, 2018; Nabils, Broaddus, & Loose, 2009). Therapeutika, die über epigenetische Modifikationen wirken, wie z.B. HDAC-Inhibitoren sind daher möglicherweise eine sinnvolle Therapieoption. Einzelne Forschungen bestätigen bereits die Suppression von Survivin durch Vorinostat (Fiskus et al., 2012; J. S. Jin, Tsao, Sun, Yu, & Tzao, 2012), Belinostat (Chowdhury et al., 2011), Panobinostat (Jeon, Ko, Cho, Chae, & Shim, 2013; Wirries et al., 2018) und Entinostat (Luo, Zhou, Lv, Sun, & Tang, 2019; Wang et al., 2016) in unterschiedlichen maligne entarteten Zellen.

In den Zelllinien NEC-DUE1-3 führten die HDAC-Inhibitoren zu unterschiedlichen Veränderungen der Survivinexpression. Der selektive HDAC-Inhibitor Entinostat induzierte in allen drei Zelllinien eine Suppression von Survivin.

Auffällig war, dass der Pan-HDAC-Inhibitor Panobinostat in allen drei Zelllinien und Belinostat in der Zelllinie NEC-DUE2 trotz einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität zu einer erhöhten Expression von Survivin führte. Unabhängig von der

erhöhten Survivin-Expression konnten jedoch auch in diesen Fällen Anzeichen einer Apoptose-Induktion beobachtet werden, sodass die Wirkung der Pan-HDAC-Inhibitoren auf die untersuchten Zelllinien nicht notwendigerweise von der veränderten Survivin-Expression abhängig zu sein scheint.

#### **4.3.2 XIAP als therapeutisches Ziel in GEP-NEC**

Auch XIAP spielt bei der Zellproliferation und dem Tumorwachstum von GEP-NEC eine Rolle. Ein *Knockdown* von XIAP in Zellen der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 führte zu einer Reduktion der Zellviabilität *in vitro* sowie der Zellproliferation und des Tumorwachstums *in vivo* im Mausmodell (Dizdar et al., 2017). Die Herunterregulierung von XIAP durch die HDAC-Inhibitoren konnte bereits in einzelnen Versuchsreihen für Vorinostat (J. S. Jin et al., 2012; K. L. Jin et al., 2010), Belinostat (Kim et al., 2018; Ong et al., 2016), Panobinostat (Rosato, Almenara, Dai, & Grant, 2003; Symanowski et al., 2009) sowie für Entinostat (Rosato et al., 2003) bestätigt werden.

In unseren Versuchen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine reduzierte Expression von XIAP nach Inkubation der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 mit Vorinostat und Entinostat mit einer verminderten Zellviabilität sowie einer Apoptoseinduktion einhergeht. Beide HDAC-Inhibitoren führten auch in der Zelllinie NEC-DUE3 dosisabhängig zu einer verminderten Konzentration von XIAP und einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität, allerdings gelang in diesen Fällen nicht der Nachweis einer stattgehabten Apoptoseinduktion.

Auch nach Inkubation der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE3 mit Belinostat konnte konzentrationsabhängig weniger XIAP nachgewiesen werden in Korrelation mit einer Apoptoseinduktion.

Es traten jedoch auch Fälle auf, in denen Apoptose induziert wurde und die Expression von XIAP unverändert blieb. Dies war nach Inkubation der Zelllinie NEC-DUE2 mit Belinostat und der Zelllinie NEC-DUE1 mit Panobinostat der Fall.

Die verminderte Expression von XIAP ist folglich vermutlich nicht essentiell für die Apoptose-induzierende und Zellviabilitäts-hemmende Wirkung der Pan-HDAC-Inhibitoren. Nichtsdestotrotz führten die untersuchten HDAC-Inhibitoren

abgesehen von Droxinostat in den meisten Fällen zu einer verminderten Expression von XIAP und könnten die malignen Zellen auf diesem Weg für weitere Chemotherapeutika oder zielgerichtete Therapien sensibilisieren. Herauszustellen sind hierbei vor allem der Pan-HDAC-Inhibitor Vorinostat und der selektive HDAC-Inhibitor Entinostat, die in allen drei Zelllinien zu einer verminderten Expression von XIAP führten.

#### **4.3.3 Einfluss von Pan-HDAC-Inhibitoren auf IAP in GEP-NEC in vitro**

HDAC-Inhibitoren können sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptose-Signalweg induzieren. Bisher deutet viel darauf hin, dass die einzelnen, strukturell unterschiedlichen HDAC-Inhibitoren eine Zelltyp-spezifische Wirkweise und vermutlich keinen übergreifenden einheitlichen Wirkmechanismus haben (Bolden et al., 2006; Chun, 2015).

Zusammenfassend führen die Pan-HDAC-Inhibitoren in den untersuchten GEP-NEC-Zellen zur Induktion von Apoptose und zu einer veränderten Expression der IAPs, insbesondere einer verminderten Expression von XIAP. XIAP wird als das potenteste IAP angesehen (Tu & Costa, 2020) und da XIAP zudem das einzige IAP ist, das Caspasen direkt inhibieren kann, gilt es als interessante Zielstruktur für neuartige Therapeutika (Eckelman et al., 2006). Die Pan-HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat und Panobinostat und der selektive HDAC-Inhibitor Entinostat könnten durch die Reduktion der XIAP-Expression eine essentielle Rolle in der Apoptose-induzierenden Therapie der NEC in Kombination mit Chemotherapeutika oder zielgerichteter Therapie spielen.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Pan-HDAC-Inhibitoren auf die IAP Survivin, cIAP 1 und cIAP 2 belegen hingegen die multiplen Effekte von HDAC-Inhibitoren (O. Khan & La Thangue, 2012). Peart et al. untersuchte die Wirkung der HDAC-Inhibitoren Vorinostat und Depsipeptid auf diverse pro- und antiapoptotische Proteine und kam zu dem Schluss, dass unter anderem auch proapoptotische Proteine herunterreguliert und antiapoptotische Proteine aktiviert werden, aber insgesamt gesehen proapoptotische Gene vermehrt transkribiert und antiapoptotische Gene herunterreguliert werden (Peart et al., 2005).

#### 4.3.4 Einfluss von selektiven HDAC-Inhibitoren auf IAP in GEP-NEC in vitro

In maligne entarteten Zellen sind nicht alle HDACs, sondern meistens nur einzelne HDACs überexprimiert, sodass die selektive Inhibition dieser HDACs sinnvoll und effizient erscheint (N. Khan et al., 2008).

Entinostat inhibiert hauptsächlich HDAC1 und HDAC3 und führt in maligne entarteten Zellen zur Induktion von Apoptose. Einer der Wirkmechanismen, der zur Apoptoseinduktion durch Entinostat führt, ist unter anderem die Herunterregulierung von XIAP (Knipstein & Gore, 2011). Diese Herunterregulierung von XIAP durch Entinostat konnte bereits in leukämischen Zellen (Dai, Rahmani, Dent, & Grant, 2005; Rosato et al., 2003) belegt werden. Außerdem konnte eine Herunterregulierung von Survivin durch Entinostat in NSCLC-Zellen gezeigt werden (Luo et al., 2019).

Der selektive HDAC-Inhibitor Entinostat führte in den Zellen der Zelllinie NEC-DUE1 und NEC-DUE2 zu einer nachgewiesenen Apoptoseinduktion. Im Gegensatz zu den Pan-HDAC-Inhibitoren konnte in allen drei Zelllinien eine simultane Herunterregulierung von cIAP1, XIAP und Survivin festgestellt werden. cIAP2 wurde in allen drei Zelllinien unverändert exprimiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Apoptose-induzierende Wirkung von Entinostat unter anderem auf einer Herunterregulierung der genannten IAP beruht.

Der selektive HDAC-Inhibitor Droxinostat führte in den verwendeten Wirkstoffkonzentrationen bis  $10 \mu\text{M}$  in den Zelllinien NEC-DUE1-3 zu keiner veränderten Expression von XIAP, Survivin, cIAP1 und cIAP2. Wood et al. bezeichneten Droxinostat bereits als nützliche chemische Probe in vitro mit eingeschränktem klinischen Nutzen aufgrund der hohen mittleren letalen Dosis (Wood et al., 2010). Allerdings ist Droxinostat in der Lage, manche Tumorzellarten für die Todesrezeptorliganden FAS und TRAIL zu sensitivieren, sodass die Substanz im Rahmen einer Kombinationstherapie wirksam sein könnte (Bijangi-Vishehsaraei et al., 2010; J. Liu et al., 2016; Schimmer et al., 2006; Wood et al., 2010).

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend liefert diese Arbeit wichtige Erkenntnisse über HDAC-Inhibitoren als zukünftige Therapieoption für Patient:innen mit GEP-NEC, die unter den aktuell durchgeführten Therapien mit einer hohen Letalität und einer kurzen Überlebensdauer nach Diagnosestellung einhergehen.

Für diese Arbeit wurden Zellen aus drei Zelllinien, die unterschiedlichen GEP-NEC entstammen, mit den drei Pan-HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat und Panobinostat sowie den selektiven HDAC-Inhibitoren Entinostat und Droxinostat inkubiert. Nachfolgend zeigte eine MTS-Analyse eine Reduktion der Zellviabilität aller drei Zelllinien durch die HDAC-Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Panobinostat und Entinostat.

Weitere Analysen des Wirkmechanismus der HDAC-Inhibitoren auf die untersuchten GEP-NEC wiesen nach, dass IAPs supprimiert werden und Apoptoseinduktion stattfindet. Insbesondere der selektive HDAC-Inhibitor Entinostat führte zu einer einheitlichen Suppression von XIAP, Survivin und cIAP1 in allen drei Zelllinien.

Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise darauf, dass HDAC-Inhibitoren eine wirksame Therapieoption für GEP-NEC darstellen. Die Suppression von IAPs insbesondere durch den selektiven HDAC-Inhibitor Entinostat könnte die GEP-NEC für herkömmliche Chemotherapeutika oder zielgerichtete Krebstherapeutika wie z.B. TRAIL sensitivieren. Die nächsten Schritte wären somit *in vitro* Versuche mit Kombinationstherapien und *in vivo* Versuche.

## VII. Literaturverzeichnis

- Al-Yacoub, N., Fecker, L. F., Mobs, M., Plotz, M., Braun, F. K., Sterry, W., & Eberle, J. (2012). Apoptosis induction by SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells is related to downregulation of c-FLIP and enhanced TRAIL signaling. *J Invest Dermatol*, *132*(9), 2263-2274. doi:10.1038/jid.2012.125
- Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, *3*(8), 917-921. doi:10.1038/nm0897-917
- Ambrosini, V., Kunikowska, J., Baudin, E., Bodei, L., Bouvier, C., Capdevila, J., . . . Yao, J. (2021). Consensus on molecular imaging and theranostics in neuroendocrine neoplasms. *Eur J Cancer*, *146*, 56-73. doi:10.1016/j.ejca.2021.01.008
- Auernhammer, C. J., & Goke, B. (2011). Therapeutic strategies for advanced neuroendocrine carcinomas of jejunum/ileum and pancreatic origin. *Gut*, *60*(7), 1009-1021. doi:10.1136/gut.2009.204453
- Auernhammer, C. J., Spitzweg, C., Heinemann, V., & Goke, B. (2012). [Medicinal therapy of metastasized neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system.]. *Internist (Berl)*. doi:10.1007/s00108-011-2919-z
- Bijangi-Vishehsaraei, K., Huang, S., Safa, A. R., Saadatzadeh, M. R., & Murphy, M. P. (2010). 4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-N-hydroxybutanamide (CMH) targets mRNA of the c-FLIP variants and induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, *342*(1-2), 133-142. doi:10.1007/s11010-010-0477-7
- Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, *5*(9), 769-784. doi:10.1038/nrd2133
- Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H., & N.D., T. (2010). *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*.
- Breitling, L. P., Rinke, A., & Gress, T. M. (2019). [Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors]. *Dtsch Med Wochenschr*, *144*(21), 1509-1521. doi:10.1055/a-0865-0061
- Catena, L., Bajetta, E., Milione, M., Ducceschi, M., Valente, M., Dominoni, F., & Colonna, V. (2011). Mammalian target of rapamycin expression in poorly differentiated endocrine carcinoma: clinical and therapeutic future challenges. *Target Oncol*, *6*(2), 65-68. doi:10.1007/s11523-011-0171-z
- Chesi, M., Mirza, N. N., Garbitt, V. M., Sharik, M. E., Dueck, A. C., Asmann, Y. W., . . . Bergsagel, P. L. (2016). IAP antagonists induce anti-tumor immunity in multiple myeloma. *Nat Med*, *22*(12), 1411-1420. doi:10.1038/nm.4229
- Choi, Y. E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C. S., Cohen, G. M., & Bratton, S. B. (2009). The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem*, *284*(19), 12772-12782. doi:10.1074/jbc.M807550200
- Chowdhury, S., Howell, G. M., Teggart, C. A., Chowdhury, A., Person, J. J., Bowers, D. M., & Brattain, M. G. (2011). Histone deacetylase inhibitor belinostat represses survivin expression through reactivation of transforming growth factor beta (TGFbeta) receptor II leading to cancer cell death. *J Biol Chem*, *286*(35), 30937-30948. doi:10.1074/jbc.M110.212035

- Chun, P. (2015). Histone deacetylase inhibitors in hematological malignancies and solid tumors. *Arch Pharm Res*, *38*(6), 933-949. doi:10.1007/s12272-015-0571-1
- clinicaltrials.gov. (2023a). clinicaltrials.gov - Belinostat Phase II. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/search?intr=belinostat&aggFilters=phase:2>
- clinicaltrials.gov. (2023b). clinicaltrials.gov - Droxinostat. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/search?intr=Droxinostat>
- clinicaltrials.gov. (2023c). clinicaltrials.gov - Panobinostat Phase III. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/search?intr=panobinostat&aggFilters=phase:3>
- clinicaltrials.gov. (2023d). clinicaltrials.gov - Vorinostat Phase III. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/search?intr=Vorinostat&aggFilters=phase:3>
- Coradini, D., Zorzet, S., Rossin, R., Scarlata, I., Pellizzaro, C., Turrin, C., . . . Perbellini, A. (2004). Inhibition of hepatocellular carcinomas in vitro and hepatic metastases in vivo in mice by the histone deacetylase inhibitor HA-But. *Clin Cancer Res*, *10*(14), 4822-4830. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-04-0349
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, *43*(6), 582-592. doi:10.1002/cbin.11137
- Dai, Y., Rahmani, M., Dent, P., & Grant, S. (2005). Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol Cell Biol*, *25*(13), 5429-5444. doi:10.1128/mcb.25.13.5429-5444.2005
- Dasari, A., Mehta, K., Byers, L. A., Sorbye, H., & Yao, J. C. (2018). Comparative study of lung and extrapulmonary poorly differentiated neuroendocrine carcinomas: A SEER database analysis of 162,983 cases. *Cancer*, *124*(4), 807-815. doi:10.1002/cncr.31124
- Deans, C., & Maggert, K. A. (2015). What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*, *199*(4), 887-896. doi:10.1534/genetics.114.173492
- Decker, P., & Muller, S. (2002). Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol*, *3*(3), 275-283. doi:10.2174/1389201023378265
- Deroanne, C. F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clause, N., . . . Castronovo, V. (2002). Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*, *21*(3), 427-436. doi:10.1038/sj.onc.1205108
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, *388*(6639), 300-304. doi:10.1038/40901
- Dizdar, L., Drusenheimer, J., Werner, T. A., Mohlendick, B., Schutte, S. C., Esposito, I., . . . Krieg, A. (2018). Establishment and Characterization of a Novel Cell Line Derived from a Small Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Anal Canal. *Neuroendocrinology*, *107*(3), 246-256. doi:10.1159/000492222
- Dizdar, L., Oesterwind, K. A., Riemer, J. C., Werner, T. A., Mersch, S., Mohlendick, B., . . . Krieg, A. (2017). Preclinical assesement of survivin and XIAP as prognostic biomarkers and therapeutic targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia. *Oncotarget*, *8*(5), 8369-8382. doi:10.18632/oncotarget.14207

- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., . . . Altieri, D. C. (2004). An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, *279*(33), 34087-34090. doi:10.1074/jbc.C400236200
- Dougan, S. K., & Dougan, M. (2018). Regulation of innate and adaptive antitumor immunity by IAP antagonists. *Immunotherapy*, *10*(9), 787-796. doi:10.2217/imt-2017-0185
- Duvic, M., Talpur, R., Ni, X., Zhang, C., Hazarika, P., Kelly, C., . . . Frankel, S. R. (2007). Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*, *109*(1), 31-39. doi:10.1182/blood-2006-06-025999
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., & Scott, F. L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*, *7*(10), 988-994. doi:10.1038/sj.embor.7400795
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci*, *18*(7). doi:10.3390/ijms18071414
- Ellis, L., Hammers, H., & Pili, R. (2009). Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett*, *280*(2), 145-153. doi:10.1016/j.canlet.2008.11.012
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, *35*(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- European Medicines Agency. (2023). *Farydak : EPAR - Product Information*. Retrieved from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/farydak#assessment-history-section>
- Faggiano, A., Sabourin, J. C., Ducreux, M., Lumbroso, J., Duvillard, P., Leboulleux, S., . . . Baudin, E. (2007). Pulmonary and extrapulmonary poorly differentiated large cell neuroendocrine carcinomas: diagnostic and prognostic features. *Cancer*, *110*(2), 265-274. doi:10.1002/cncr.22791
- Fiskus, W., Hembruff, S. L., Rao, R., Sharma, P., Balusu, R., Venkannagari, S., . . . Bhalla, K. N. (2012). Co-treatment with vorinostat synergistically enhances activity of Aurora kinase inhibitor against human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, *135*(2), 433-444. doi:10.1007/s10549-012-2171-9
- Fotouhi, O., Adel Fahmideh, M., Kjellman, M., Sulaiman, L., Höög, A., Zedenius, J., . . . Larsson, C. (2014). Global hypomethylation and promoter methylation in small intestinal neuroendocrine tumors: an in vivo and in vitro study. *Epigenetics*, *9*(7), 987-997. doi:10.4161/epi.28936
- Fulda, S., & Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, *11*(2), 109-124. doi:10.1038/nrd3627
- Garcia-Carbonero, R., Sorbye, H., Baudin, E., Raymond, E., Wiedenmann, B., Niederle, B., . . . Perren, A. (2016). ENETS Consensus Guidelines for High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Neuroendocrine Carcinomas. *Neuroendocrinology*, *103*(2), 186-194. doi:10.1159/000443172
- Grabowski, P., Griss, S., Arnold, C. N., Hörsch, D., Göke, R., Arnold, R., . . . Scherübl, H. (2005). Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease. *Neuroendocrinology*, *81*(1), 1-9. doi:10.1159/000084892
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, *305*(5684), 626-629. doi:10.1126/science.1099320

- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, *2014*, 150845. doi:10.1155/2014/150845
- Hassell, K. N. (2019). Histone Deacetylases and their Inhibitors in Cancer Epigenetics. *Diseases*, *7*(4). doi:10.3390/diseases7040057
- House, M. G., Herman, J. G., Guo, M. Z., Hooker, C. M., Schulick, R. D., Lillemoe, K. D., . . . Yeo, C. J. (2003). Aberrant hypermethylation of tumor suppressor genes in pancreatic endocrine neoplasms. *Ann Surg*, *238*(3), 423-431; discussion 431-422. doi:10.1097/01.sla.0000086659.49569.9e
- Hu, E., Dul, E., Sung, C. M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., . . . Jaye, M. (2003). Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther*, *307*(2), 720-728. doi:10.1124/jpet.103.055541
- Huang, X., Gao, L., Wang, S., Lee, C. K., Ordentlich, P., & Liu, B. (2009). HDAC inhibitor SNDX-275 induces apoptosis in erbB2-overexpressing breast cancer cells via down-regulation of erbB3 expression. *Cancer Res*, *69*(21), 8403-8411. doi:10.1158/0008-5472.Can-09-2146
- Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., & Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, *104*(5), 781-790.
- Ilett, E. E., Langer, S. W., Olsen, I. H., Federspiel, B., Kjaer, A., & Knigge, U. (2015). Neuroendocrine Carcinomas of the Gastroenteropancreatic System: A Comprehensive Review. *Diagnostics (Basel)*, *5*(2), 119-176. doi:10.3390/diagnostics5020119
- Inoue, S., Mai, A., Dyer, M. J., & Cohen, G. M. (2006). Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res*, *66*(13), 6785-6792. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-4563
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., . . . Pelicci, P. G. (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med*, *11*(1), 71-76. doi:10.1038/nm1160
- Jan, R., & Chaudhry, G. E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*, *9*(2), 205-218. doi:10.15171/apb.2019.024
- Jeon, Y. J., Ko, S. M., Cho, J. H., Chae, J. I., & Shim, J. H. (2013). The HDAC inhibitor, panobinostat, induces apoptosis by suppressing the expression of specificity protein 1 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*, *32*(4), 860-866. doi:10.3892/ijmm.2013.1451
- Jin, J. S., Tsao, T. Y., Sun, P. C., Yu, C. P., & Tzao, C. (2012). SAHA inhibits the growth of colon tumors by decreasing histone deacetylase and the expression of cyclin D1 and survivin. *Pathol Oncol Res*, *18*(3), 713-720. doi:10.1007/s12253-012-9499-7
- Jin, K. L., Park, J. Y., Noh, E. J., Hoe, K. L., Lee, J. H., Kim, J. H., & Nam, J. H. (2010). The effect of combined treatment with cisplatin and histone deacetylase inhibitors on HeLa cells. *J Gynecol Oncol*, *21*(4), 262-268. doi:10.3802/jgo.2010.21.4.262
- Johnstone, R. W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, *1*(4), 287-299. doi:10.1038/nrd772

- Jost, P. J., & Vucic, D. (2020). Regulation of Cell Death and Immunity by XIAP. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *12*(8). doi:10.1101/cshperspect.a036426
- 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*(2), 183-189. doi:10.1007/s00384-006-0145-2
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., & Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, *53*(17), 3976-3985. Retrieved from <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/53/17/3976.full.pdf>
- Khan, N., Jeffers, M., Kumar, S., Hackett, C., Boldog, F., Khramtsov, N., . . . Sehested, M. (2008). Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J*, *409*(2), 581-589. doi:10.1042/bj20070779
- Khan, O., & La Thangue, N. B. (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol*, *90*(1), 85-94. doi:10.1038/icb.2011.100
- Khan, S., Aspe, J. R., Asumen, M. G., Almaguel, F., Odumosu, O., Acevedo-Martinez, S., . . . Wall, N. R. (2009). Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer*, *100*(7), 1073-1086. doi:10.1038/sj.bjc.6604978
- Kim, S. H., Kang, J. G., Kim, C. S., Ihm, S. H., Choi, M. G., Yoo, H. J., & Lee, S. J. (2018). Gemigliptin, a novel dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, exerts a synergistic cytotoxicity with the histone deacetylase inhibitor PXD101 in thyroid carcinoma cells. *J Endocrinol Invest*, *41*(6), 677-689. doi:10.1007/s40618-017-0792-x
- Klempner, S. J., Gershenhorn, B., Tran, P., Lee, T. K., Erlander, M. G., Gowen, K., . . . Ali, S. M. (2016). BRAFV600E Mutations in High-Grade Colorectal Neuroendocrine Tumors May Predict Responsiveness to BRAF-MEK Combination Therapy. *Cancer Discov*, *6*(6), 594-600. doi:10.1158/2159-8290.Cd-15-1192
- Klieser, E., Urbas, R., Stättner, S., Primavesi, F., Jäger, T., Dinnewitzer, A., . . . Swierczynski, S. (2017). Comprehensive immunohistochemical analysis of histone deacetylases in pancreatic neuroendocrine tumors: HDAC5 as a predictor of poor clinical outcome. *Hum Pathol*, *65*, 41-52. doi:10.1016/j.humpath.2017.02.009
- Knipstein, J., & Gore, L. (2011). Entinostat for treatment of solid tumors and hematologic malignancies. *Expert Opin Investig Drugs*, *20*(10), 1455-1467. doi:10.1517/13543784.2011.613822
- 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*(8), 1975-1983. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.022
- Krieg, A., Mersch, S., Boeck, I., Dizdar, L., Weihe, E., Hilal, Z., . . . Knoefel, W. T. (2014). New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. *PLoS One*, *9*(2), e88713. doi:10.1371/journal.pone.0088713
- Lalaoui, N., & Vaux, D. L. (2018). Recent advances in understanding inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Res*, *7*. doi:10.12688/f1000research.16439.1

- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., & Earnshaw, W. C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, *371*(6495), 346-347. doi:10.1038/371346a0
- Lee, H. Z., Kwitkowski, V. E., Del Valle, P. L., Ricci, M. S., Saber, H., Habtemariam, B. A., . . . Pazdur, R. (2015). FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*, *21*(12), 2666-2670. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-14-3119
- Liu, J., Li, G., Wang, X., Wang, L., Zhao, R., Wang, J., . . . Zhang, L. (2016). Droxinostat, a Histone Deacetylase Inhibitor, Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines via Activation of the Mitochondrial Pathway and Downregulation of FLIP. *Transl Oncol*, *9*(1), 70-78. doi:10.1016/j.tranon.2016.01.004
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., . . . Fesik, S. W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*, *408*(6815), 1004-1008. doi:10.1038/35050006
- Lucas, D. M., Davis, M. E., Parthun, M. R., Mone, A. P., Kitada, S., Cunningham, K. D., . . . Grever, M. R. (2004). The histone deacetylase inhibitor MS-275 induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, *18*(7), 1207-1214. doi:10.1038/sj.leu.2403388
- Luo, B. L., Zhou, Y., Lv, H., Sun, S. H., & Tang, W. X. (2019). MS-275 potentiates the effect of YM-155 in lung adenocarcinoma via survivin downregulation induced by miR-138 and miR-195. *Thorac Cancer*, *10*(6), 1355-1368. doi:10.1111/1759-7714.13076
- Lyu, H., Huang, J., He, Z., & Liu, B. (2018). Epigenetic mechanism of survivin dysregulation in human cancer. *Sci China Life Sci*, *61*(7), 808-814. doi:10.1007/s11427-017-9230-2
- Maeda, T., Towatari, M., Kosugi, H., & Saito, H. (2000). Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood*, *96*(12), 3847-3856. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120482278?via%3Dihub>
- Maggio, S. C., Rosato, R. R., Kramer, L. B., Dai, Y., Rahmani, M., Paik, D. S., . . . Grant, S. (2004). The histone deacetylase inhibitor MS-275 interacts synergistically with fludarabine to induce apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res*, *64*(7), 2590-2600. doi:10.1158/0008-5472.can-03-2631
- Magner, W. J., Kazim, A. L., Stewart, C., Romano, M. A., Catalano, G., Grande, C., . . . Tomasi, T. B. (2000). Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol*, *165*(12), 7017-7024. doi:10.4049/jimmunol.165.12.7017
- Marks, P. A. (2010). The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs*, *19*(9), 1049-1066. doi:10.1517/13543784.2010.510514
- McHugh, K. E., Mukhopadhyay, S., Doxtader, E. E., Lanigan, C., & Allende, D. S. (2020). INSM1 Is a Highly Specific Marker of Neuroendocrine Differentiation in Primary Neoplasms of the Gastrointestinal Tract, Appendix, and Pancreas. *Am J Clin Pathol*, *153*(6), 811-820. doi:10.1093/ajcp/aqaa014
- Mehnert, J. M., & Kelly, W. K. (2007). Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of action. *Cancer J*, *13*(1), 23-29. doi:10.1097/PPO.0b013e31803c72ba

- Mehrotra, S., Languino, L. R., Raskett, C. M., Mercurio, A. M., Dohi, T., & Altieri, D. C. (2010). IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell*, *17*(1), 53-64. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.021
- Michie, J., Kearney, C. J., Hawkins, E. D., Silke, J., & Oliaro, J. (2020). The Immunomodulatory Effects of Inhibitor of Apoptosis Protein Antagonists in Cancer Immunotherapy. *Cells*, *9*(1). doi:10.3390/cells9010207
- Milione, M., Maisonneuve, P., Spada, F., Pellegrinelli, A., Spaggiari, P., Albarello, L., . . . La Rosa, S. (2017). The Clinicopathologic Heterogeneity of Grade 3 Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms: Morphological Differentiation and Proliferation Identify Different Prognostic Categories. *Neuroendocrinology*, *104*(1), 85-93. doi:10.1159/000445165
- Modlin, I. M., Oberg, K., Chung, D. C., Jensen, R. T., de Herder, W. W., Thakker, R. V., . . . Sundin, A. (2008). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol*, *9*(1), 61-72. doi:10.1016/s1470-2045(07)70410-2
- Morizane, C., Machida, N., Honma, Y., Okusaka, T., Boku, N., Kato, K., . . . Furuse, J. (2022). Effectiveness of Etoposide and Cisplatin vs Irinotecan and Cisplatin Therapy for Patients With Advanced Neuroendocrine Carcinoma of the Digestive System: The TOPIC-NEC Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, *8*(10), 1447-1455. doi:10.1001/jamaoncol.2022.3395
- Moulin, M., Anderton, H., Voss, A. K., Thomas, T., Wong, W. W., Bankovacki, A., . . . Vaux, D. L. (2012). IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development. *Embo j*, *31*(7), 1679-1691. doi:10.1038/emboj.2012.18
- Nabils, N. H., Broaddus, R. R., & Loose, D. S. (2009). DNA methylation inhibits p53-mediated survivin repression. *Oncogene*, *28*(19), 2046-2050. doi:10.1038/onc.2009.62
- Nakata, S., Yoshida, T., Horinaka, M., Shiraishi, T., Wakada, M., & Sakai, T. (2004). Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene*, *23*(37), 6261-6271. doi:10.1038/sj.onc.1207830
- Ndubaku, C., Varfolomeev, E., Wang, L., Zobel, K., Lau, K., Elliott, L. O., . . . Vucic, D. (2009). Antagonism of c-IAP and XIAP proteins is required for efficient induction of cell death by small-molecule IAP antagonists. *ACS Chem Biol*, *4*(7), 557-566. doi:10.1021/cb900083m
- Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., . . . Altucci, L. (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med*, *11*(1), 77-84. doi:10.1038/nm1161
- Niederle, M. B., Hackl, M., Kaserer, K., & Niederle, B. (2010). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification: an analysis based on prospectively collected parameters. *Endocr Relat Cancer*, *17*(4), 909-918. doi:10.1677/erc-10-0152
- Okuma, H. S., Iwasa, S., Shoji, H., Takashima, A., Okita, N., Honma, Y., . . . Shimada, Y. (2014). Irinotecan plus cisplatin in patients with extensive-disease poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of the esophagus. *Anticancer Res*, *34*(9), 5037-5041.
- Okuyama, H., Ikeda, M., Okusaka, T., Furukawa, M., Ohkawa, S., Hosokawa, A., . . . Furuse, J. (2020). A phase II trial of everolimus in patients with advanced pancreatic neuroendocrine carcinoma refractory or intolerant to platinum-

- containing chemotherapy (NECTOR trial). *Neuroendocrinology*. doi:10.1159/000505550
- Ong, P. S., Wang, L., Chia, D. M., Seah, J. Y., Kong, L. R., Thuya, W. L., . . . Goh, B. C. (2016). A novel combinatorial strategy using Seliciclib(®) and Belinostat(®) for eradication of non-small cell lung cancer via apoptosis induction and BID activation. *Cancer Lett*, *381*(1), 49-57. doi:10.1016/j.canlet.2016.07.023
- Pearl, M. J., Smyth, G. K., van Laar, R. K., Bowtell, D. D., Richon, V. M., Marks, P. A., . . . Johnstone, R. W. (2005). Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(10), 3697-3702. doi:10.1073/pnas.0500369102
- Perez-Perarnau, A., Coll-Mulet, L., Rubio-Patino, C., Iglesias-Serret, D., Cosialls, A. M., Gonzalez-Girones, D. M., . . . Gil, J. (2011). Analysis of apoptosis regulatory genes altered by histone deacetylase inhibitors in chronic lymphocytic leukemia cells. *Epigenetics*, *6*(10), 1228-1235. doi:10.4161/epi.6.10.17200
- Qian, D. Z., Kato, Y., Shabbeer, S., Wei, Y., Verheul, H. M., Salumbides, B., . . . Pili, R. (2006). Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res*, *12*(2), 634-642. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-05-1132
- Qiu, L., Burgess, A., Fairlie, D. P., Leonard, H., Parsons, P. G., & Gabrielli, B. G. (2000). Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell*, *11*(6), 2069-2083. doi:10.1091/mbc.11.6.2069
- Raedler, L. A. (2016). Farydak (Panobinostat): First HDAC Inhibitor Approved for Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Am Health Drug Benefits*, *9*(Spec Feature), 84-87.
- Rathore, R., McCallum, J. E., Varghese, E., Florea, A. M., & Busselberg, D. (2017). Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*, *22*(7), 898-919. doi:10.1007/s10495-017-1375-1
- Raymond, E., Dahan, L., Raoul, J. L., Bang, Y. J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C., . . . Ruzsniwski, P. (2011). Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*, *364*(6), 501-513. doi:10.1056/NEJMoa1003825
- Richon, V. M., Sandhoff, T. W., Rifkind, R. A., & Marks, P. A. (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(18), 10014-10019. doi:10.1073/pnas.180316197
- Rindi, G., Mete, O., Uccella, S., Basturk, O., La Rosa, S., Brosens, L. A. A., . . . Asa, S. L. (2022). Overview of the 2022 WHO Classification of Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Pathol*, *33*(1), 115-154. doi:10.1007/s12022-022-09708-2
- Rosato, R. R., Almenara, J. A., Dai, Y., & Grant, S. (2003). Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther*, *2*(12), 1273-1284.
- Rosato, R. R., Almenara, J. A., Kolla, S. S., Maggio, S. C., Coe, S., Giménez, M. S., . . . Grant, S. (2007). Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interactions. *Mol Cancer Ther*, *6*(2), 692-702. doi:10.1158/1535-7163.Mct-06-0562

- Sanaei, M., & Kavooosi, F. (2019). Histone Deacetylases and Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action in Various Cancers. *Adv Biomed Res*, *8*, 63. doi:10.4103/abr.abr\_142\_19
- Schimmer, A. D., Thomas, M. P., Hurren, R., Gronda, M., Pellecchia, M., Pond, G. R., . . . Reed, J. C. (2006). Identification of small molecules that sensitize resistant tumor cells to tumor necrosis factor-family death receptors. *Cancer Res*, *66*(4), 2367-2375. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-1061
- Senese, S., Zaragoza, K., Minardi, S., Muradore, I., Ronzoni, S., Passafaro, A., . . . Chiocca, S. (2007). Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol*, *27*(13), 4784-4795. doi:10.1128/mcb.00494-07
- Silke, J., & Vucic, D. (2014). IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol*, *545*, 35-65. doi:10.1016/b978-0-12-801430-1.00002-0
- Singh, T. R., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2005). HDAC inhibitors enhance the apoptosis-inducing potential of TRAIL in breast carcinoma. *Oncogene*, *24*(29), 4609-4623. doi:10.1038/sj.onc.1208585
- Soldani, C., Lazzi, M. C., Bottone, M. G., Tognon, G., Biggiogera, M., Pellicciari, C. E., & Scovassi, A. I. (2001). Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Exp Cell Res*, *269*(2), 193-201. doi:10.1006/excr.2001.5293
- Sorbye, H., Grande, E., Pavel, M., Tessler, M., Fazio, N., Reed, N. S., . . . Tiensuu Janson, E. (2023). European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) 2023 guidance paper for digestive neuroendocrine carcinoma. *J Neuroendocrinol*, *35*(3), e13249. doi:10.1111/jne.13249
- Sorbye, H., Welin, S., Langer, S. W., Vestermark, L. W., Holt, N., Osterlund, P., . . . 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*(1), 152-160. doi:10.1093/annonc/mds276
- 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*(6), 799-800. doi:10.1097/MPA.0b013e3181ebb56f
- Symanowski, J., Vogelzang, N., Zawel, L., Atadja, P., Pass, H., & Sharma, S. (2009). A histone deacetylase inhibitor LBH589 downregulates XIAP in mesothelioma cell lines which is likely responsible for increased apoptosis with TRAIL. *J Thorac Oncol*, *4*(2), 149-160. doi:10.1097/JTO.0b013e318194f991
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem*, *273*(14), 7787-7790. doi:10.1074/jbc.273.14.7787
- Thomas, J. O. (1984). The higher order structure of chromatin and histone H1. *J Cell Sci Suppl*, *1*, 1-20. doi:10.1242/jcs.1984.supplement\_1.1
- Tirosh, A., & Kebebew, E. (2020). Genetic and epigenetic alterations in pancreatic neuroendocrine tumors. *J Gastrointest Oncol*, *11*(3), 567-577. doi:10.21037/jgo.2020.03.11
- Tsapis, M., Lieb, M., Manzo, F., Shankaranarayanan, P., Herbrecht, R., Lutz, P., & Gronemeyer, H. (2007). HDAC inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant acute lymphatic leukemia cells despite a switch from the extrinsic to the intrinsic death pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, *39*(7-8), 1500-1509. doi:10.1016/j.biocel.2007.03.009

- Tu, H., & Costa, M. (2020). XIAP's Profile in Human Cancer. *Biomolecules*, *10*(11). doi:10.3390/biom10111493
- U.S. Food and Drug Administration. (2022). *Secura Bio, Inc.; Withdrawal of Approval of New Drug Application for FARYDAK (Panobinostat) Capsules, 10 Milligrams, 15 Milligrams, and 20 Milligrams*.
- Vasudevan, D., & Ryoo, H. D. (2015). Regulation of Cell Death by IAPs and Their Antagonists. *Curr Top Dev Biol*, *114*, 185-208. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.07.026
- Venizelos, A., Elvebakken, H., Perren, A., Nikolaienko, O., Deng, W., Lothe, I. M. B., . . . Knappskog, S. (2021). The molecular characteristics of high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer*, *29*(1), 1-14. doi:10.1530/erc-21-0152
- Virani, S., Colacino, J. A., Kim, J. H., & Rozek, L. S. (2012). Cancer epigenetics: a brief review. *Ilar j*, *53*(3-4), 359-369. doi:10.1093/ilar.53.3-4.359
- Wang, S., Zhu, L., Zuo, W., Zeng, Z., Huang, L., Lin, F., . . . Liu, B. (2016). MicroRNA-mediated epigenetic targeting of Survivin significantly enhances the antitumor activity of paclitaxel against non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, *7*(25), 37693-37713. doi:10.18632/oncotarget.9264
- Wheatley, S. P., & Altieri, D. C. (2019). Survivin at a glance. *J Cell Sci*, *132*(7). doi:10.1242/jcs.223826
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., . . . et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, *3*(6), 673-682. doi:10.1016/1074-7613(95)90057-8
- Wirries, A., Jabari, S., Jansen, E. P., Roth, S., Figueroa-Juárez, E., Wissniowski, T. T., . . . Di Fazio, P. (2018). Panobinostat mediated cell death: a novel therapeutic approach for osteosarcoma. *Oncotarget*, *9*(68), 32997-33010. doi:10.18632/oncotarget.26038
- Wood, T. E., Dalili, S., Simpson, C. D., Sukhai, M. A., Hurren, R., Anyiwe, K., . . . Schimmer, A. D. (2010). Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands. *Mol Cancer Ther*, *9*(1), 246-256. doi:10.1158/1535-7163.Mct-09-0495
- Yao, J. C., Hassan, M., Phan, A., Dagohoy, C., Leary, C., Mares, J. E., . . . 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*(18), 3063-3072. doi:10.1200/jco.2007.15.4377
- Yao, J. C., Shah, M. H., Ito, T., Bohas, C. L., Wolin, E. M., Van Cutsem, E., . . . Oberg, K. (2011). Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*, *364*(6), 514-523. doi:10.1056/NEJMoa1009290
- Yeruva, S. L. H., Zhao, F., Miller, K. D., Tevaarwerk, A. J., Wagner, L. I., Gray, R. J., . . . Connolly, R. M. (2018). E2112: randomized phase iii trial of endocrine therapy plus entinostat/placebo in patients with hormone receptor-positive advanced breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, *4*, 1. doi:10.1038/s41523-017-0053-3
- Zagni, C., Floresta, G., Monciino, G., & Rescifina, A. (2017). The Search for Potent, Small-Molecule HDACIs in Cancer Treatment: A Decade After Vorinostat. *Med Res Rev*, *37*(6), 1373-1428. doi:10.1002/med.21437
- Zhang, C., Richon, V., Ni, X., Talpur, R., & Duvic, M. (2005). Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell

- lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol*, *125*(5), 1045-1052. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23925.x
- Zhang, P., Li, J., Li, J., Zhang, X., Zhou, J., Wang, X., . . . Lu, M. (2020). Etoposide and cisplatin versus irinotecan and cisplatin as the first-line therapy for patients with advanced, poorly differentiated gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinoma: A randomized phase 2 study. *Cancer*, *126 Suppl 9*(Suppl 9), 2086-2092. doi:10.1002/cncr.32750
- Zhou, B. R., & Bai, Y. (2019). Chromatin structures condensed by linker histones. *Essays Biochem*, *63*(1), 75-87. doi:10.1042/ebc20180056

## **Danksagung**

Ich danke an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Wolfram Trudo Knoefel und Herrn Prof. Dr. Andreas Krieg für die Bereitstellung des Themas und die Aufnahme in die Forschungsgruppe. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Krieg für die jahrelange geduldige und zuverlässige Betreuung von der Anmeldung der Promotion bis zur Korrektur der Dissertation bedanken.

Danke auch an das gesamte Team des chirurgischen Forschungslabors unter der Leitung von Imke Hoffmann und Herrn Prof. Dr. Niklaus Stoecklein für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern Claudia und Wolfgang, die mich während der gesamten Studien- und Promotionszeit in jeglicher Hinsicht unterstützt, bestärkt und motiviert haben, sowie an meinen Bruder Tobias, der mir mit seiner Leidenschaft für sein Fachgebiet ein wichtiges Vorbild für wissenschaftliches Arbeiten ist. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Großeltern, die mich immerzu darin bestärkt haben, meine Ziele zu verfolgen.

Zu guter Letzt danke ich meinem Ehemann Lukas und meinem Sohn Jakob von Herzen, die mir vor allem während der Fertigstellung der Arbeit bedingungslose Unterstützung und die nötige Motivation geschenkt haben.