

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin, I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktoren

Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Prof. Dr. Samuel M. Huber

Einfluss der Tumor-assoziierten Fibroblasten auf Differenzierung, Proliferation und Therapieansprechen in pankreatischen Neuroendokrinen Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tania Amin, geboren am 10.11.1992
in Bagdad, Irak

Hamburg 2020

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.12.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Eike- Christian Burandt

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Jörg Schrader

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Arbeitshypothese und Zielsetzung der experimentellen Arbeit.....	3
2 Einleitung.....	4
2.1 Pankreatische Neuroendokrine Tumore	4
2.1.1 Epidemiologie.....	4
2.1.2 Ätiologie	4
2.1.3 Klassifikation.....	4
2.1.4 Diagnostik.....	7
2.1.5 Therapie.....	8
2.2 Fibroblasten	10
2.2.1 Tumorstroma.....	11
2.2.2 CAF im Tumorstroma.....	12
2.2.3 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Laborgeräte	16
3.1.2 Kunststoff-und Verbrauchsmaterialien, weitere Materialien	17
3.1.3 Reagenzien	18
3.1.4 Kits	19
3.1.5 Primer	19
3.1.6 Antikörper.....	20
3.1.7 Puffer und Lösungen.....	20
3.2 Vorbereitung der immunhistochemischen Färbungen.....	22
3.2.1 Auswahl geeigneter NET-Schnitte	22
3.2.2 Auswahl geeigneter Fibroblastenmarker	22
3.2.3 Übersicht über gefärbte Antikörper	23
3.3 Abläufe immunhistochemischer Färbungen.....	24
3.3.1 Entparaffinieren.....	24
3.3.2 Demaskierung.....	24
3.3.3 Weiterer Ablauf	25
3.3.4 Aufsteigende Alkoholreihe	26
3.3.5 Anfertigung von Fotos im digitalen Mikroskop	26
3.4 Auswertung der Immunhistochemie.....	27
3.4.1 Schematische Darstellung der ausgewählten Bildabschnitte.....	27
3.4.2 Zellzählung mit dem Programm <i>ImageJ</i>	27
3.4.3 Statistische Auswertung	27
3.5 Kultivierung von etablierten Zelllinien	28
3.5.1 Humane NET-Zelllinie NT-3 und BON	28
3.5.2 Humane Fibroblasten-Zelllinien	28
3.5.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen	28
3.5.4 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer	29
3.5.5 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	30
3.5.6 Herstellung von Zelllysaten	30
3.5.7 RNA-Isolation.....	30
3.5.8 Umschreiben der Proben in cDNA.....	31
3.5.9 Durchführung der Real-Time PCR.....	31
3.6 Durchführung von Ko-Kultur-Versuchen und konditioniertes Medium.....	32
3.6.1 Ko-Kulturen mit NT-3 und BON Zellen: Expressionsanalyse.....	32

3.6.2	Durchführung von Versuchen mit konditioniertem Medium: Expressionsanalysen	34
3.6.3	Proliferations-Assays mit Ko-Kulturen aus CAF	34
3.6.4	Proliferations-Assays mit konditioniertem Medium	34
3.6.5	Versuche zum Therapieansprechen: Proliferations-Assays	34
3.6.6	Versuche mit STAT3-Inhibitoren	35
3.6.7	Versuche mit STAT3-siRNA	35
3.7	Immunfluoreszenzfärbung	36
3.7.1	Ablauf vor der Immunfluoreszenzfärbung	36
3.7.2	Fixierung von Zellen auf dem Boden einer 24-Well Platte	37
3.7.3	Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung in einer 24-Well Platte	37
3.8	Proteinanalytische Methoden	38
3.8.1	Lyse von Zellen	38
3.8.2	Proteinbestimmung	38
3.8.3	Proteinbestimmung	39
3.8.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
3.8.5	Gellauf	39
3.8.6	Blotting: Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	39
3.8.7	Immundetektion	40
3.9	Tissue-Microarray-Analyse	40
3.9.1	Gewebekollektiv	40
3.9.2	TMA-Herstellung	40
3.9.3	TMA-Auswertung	41
4	Ergebnisse	41
4.1	CAF Phänotyp in NET	41
4.1.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an humanem NET-Gewebe	42
4.1.2	Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung der CAF in NET	45
4.1.3	Expressionsanalysen mittels qPCR	46
4.2	Expressionsprofil der NET	49
4.2.1	Expressionsprofil von NT-3 und BON durch konditioniertes Medium	49
4.2.2	Expressionsprofil von BON durch Ko-Kultur	51
4.3	Einfluss der CAF auf die Proliferation der NET	51
4.3.1	Effekt des konditionierten Mediums auf die Proliferation	51
4.3.2	Proliferation von NT-3 Zellen durch indirekte Ko-Kultur	52
4.3.3	Analyse der Rb-Phosphorylierung in NT-3 Zellen	53
4.4	Therapieansprechen auf Everolimus in NT-3 Zellen nach CAF-Stimulation	54
4.4.1	Therapieansprechen von NT-3 Zellen in Kultur mit konditioniertem Medium:	54
4.4.2	Therapieansprechen von NT-3 Zellen in Kultur mit konditioniertem Medium:	55
4.5	Einfluss von CAF auf die Signaltransduktion in NET-Zellen	56
4.5.1	Einfluss des konditionierten Mediums auf die Signaltransduktion	56
4.5.2	Einfluss der Ko-Kultur	59
4.5.3	Einfluss von Everolimus auf die Signalwege	59
4.6	Modulation der STAT3-Aktivierung	60
4.6.1	Effekt der STAT3-Inhibitoren: Western-Blot	60
4.6.2	Effekt der STAT3-Inhibitoren: Proliferations-Assays	61
4.6.3	Effekt der STAT3-siRNA: Western-Blot	63
4.6.4	Effekt der STAT3-siRNA: Proliferations-Assays	64
4.7	TMA-Analyse	65
4.7.1	CgA-Intensität in Abhängigkeit von der pSTAT3-Expression	66
4.7.2	Auswirkung der pSTAT3-Expression auf die SSTR2-Intensität	66
4.7.3	Vergleich der p-STAT3-Expression in NET und NEC der verschiedenen Organe	67
4.7.4	Unterschiede in der Ki-67 Positivität zwischen NET und NEC in Primarii und Metastasen	68

4.7.5	Vergleich pSTAT3-Expression in NET und NEC-Primarii.....	69
4.7.6	Korrelation der Ki-67- und pSTAT3-Expression in NET-Primarii.....	69
4.7.7	Unterschiede in der pSTAT3- Expression zwischen Primarii und Metastasen in NET und NEC.....	70
4.7.8	Unterschiede in der STAT3- Expression zwischen Primarius und Metastasen in NET und NEC	70
4.7.9	Unterschiede in der Ki-67-Expression zwischen NET- und NEC- Primarii und -Metastasen.....	71
4.8	pSTAT3-Expression in der immunhistochemischen Färbung der Großflächenschnitte ...	72
5	<i>Diskussion</i>	75
5.1	Regulation der Proliferation in NET durch CAF	75
5.2	Tumor-Stroma-Interaktion und De-Differenzierung der NET	76
5.2.1	De-Differenzierung der NET durch STAT3- Aktivierung über CAF	77
5.3	Beeinflussung des Therapieansprechens der NET durch CAF	79
5.4	STAT3-Aktivierung in NET durch CAF.....	81
5.5	Unterschiede der CAF in Primarius und Metastasen.....	83
5.5.1	CAF-Phänotyp	83
5.5.2	α SMA Expression in Primarius und Metastasen	84
5.5.3	pSTAT3-Expression in Primarius und Metastasen	85
5.5.4	Mögliche Stimulatoren der erhöhten STAT3-Aktivität durch CAF	86
5.6	STAT3-Aktivierung in verschiedenen NET	87
5.6.1	pSTAT3-Expression in verschiedenen Organen	87
5.7	Ausblick.....	87
5.8	Fazit	89
6	<i>Zusammenfassung</i>	89
7	<i>Abstract</i>	91
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	93
9	<i>Publikationsliste</i>	102
9.1	Posterbeitrag und Abstract	102
9.2	Ko-Autorenschaft	102
10	<i>Danksagung</i>	103
11	<i>Lebenslauf</i>	104
12	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	105

Abkürzungsverzeichnis

α SMA	<i>α-smooth-muscle-actin</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAF	<i>Cancer-associated-fibroblasts</i>
CAM-DR	<i>Cell adhesion mediated drug resistance</i>
CgA	Chromogranin A
CIS	Carzinoma in situ
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CXCL12	<i>chemokine ligand 12</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
ENETS	<i>European Neuroendocrine Tumor Society</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated-kinase</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
F-PanNET	Funktionell aktive Pankreatische Neuroendokrine Tumore
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FCS	Foetales Kälberserum
GEP-NET	Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Tumore
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IL-1	Interleukin-1
JAK	Janus-kinase
KM	Konditioniertes Medium
Ko	Ko-Kultur
LAR	<i>Long-acting release</i>
LM	Lebermetastase/n
M	Monokultur
MAPK	<i>Mitogen-activated-protein-kinase</i>
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloprotease
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>

MTT	3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid
NEC	Neuroendokrines Karzinom
NET	Neuroendokriner Tumor
NETs	Neuroendokrine Tumore
NF-PanNET	Nicht funktionell aktive Pankreatische Neuroendokrine Tumore
P	Primarius
PanNET	Pankreatische Neuroendokrine Tumoren
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor-receptor</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Pankreatisches Polypeptid
PRRT	Peptid-Radio-Rezeptor-Therapie
RFA	Radiofrequenzablation
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSA	Somatostatin-Analoga
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAE	Transarterielle Embolisation
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor- β1</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor-receptor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

1 Arbeitshypothese und Zielsetzung der experimentellen Arbeit

Entsprechend aktueller Forschungen gelten Tumor-assoziierte Fibroblasten, auch *cancer-associated fibroblasts* (CAF), als wichtiger Faktor im Tumorstroma für die Progression verschiedener Tumorentitäten. Bislang wurde der Einfluss von CAF auf Tumorzellen bei neuroendokrinen Tumoren (NET) nicht untersucht.

Die Arbeitshypothesen für diese experimentelle Arbeit sind:

1. CAF fördern die Tumorprogression und beeinflussen das Therapieansprechen in neuroendokrinen Tumoren
2. Die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen in Tumorzellen durch CAF stellen ein potentielles therapeutisches und prognostisches Ziel dar

Basierend auf den Hypothesen sollen folgende Fragestellungen in dieser Dissertationsarbeit beantwortet werden:

1. Haben CAF einen Einfluss auf die Proliferation von NET Tumorzellen?
2. Können CAF das Therapieansprechen auf Everolimus beeinflussen?
3. Welche Signalwege werden durch die Interaktion von Tumorzellen mit CAF bzw. CAF konditioniertem Medium aktiviert?
4. Kann eine Hemmung dieser Signalwege den Effekt der CAF auf die Tumorzellen aufheben?
5. Gibt es eine Korrelation der CAF-aktivierten Signalwege mit malignen Eigenschaften in humanen NET Gewebeproben?

Das Ziel ist es, die Interaktion von CAF und NET-Tumorzellen neu zu erforschen und damit besser zu verstehen. Hieraus können neue therapeutische sowie prognostische Faktoren für NET abgeleitet werden, um das Problem der Therapieresistenz von NET auf einer neuen molekularen Ebene zu beheben.

2 Einleitung

2.1 Pankreatische Neuroendokrine Tumore

2.1.1 Epidemiologie

Pankreatische Neuroendokrine Tumore (PanNET) wurden bisher als Inselzelltumoren bezeichnet, wobei nach aktueller Studienlage der Ursprung aus pluripotenten Zellen des duktales Systems diskutiert wird. PanNET machen ungefähr 1-2% aller pankreatischen Tumore und 7-9% aller gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumore (GEP-NET) aus. Diese zeigen in der Regel ein langsames, indolentes Wachstum und sind dadurch meistens asymptomatisch. Aus diesem Grund werden PanNET meistens erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Unter den GEP-NET weisen sie allerdings den aggressivsten Charakter auf (Kelgiorgi and Dervenis 2017). Die Inzidenz ist mit zuletzt 0,22 pro 100000 pro Jahr in den USA, Asien und Europa als steigend beschrieben worden. Zudem findet sich die steigende Inzidenz nicht nur bei PanNET, sondern auch bei GEP-NET allgemein, die eine 2,5-fache Steigerung über die letzten 15 Jahren zeigen. Begründet werden kann die steigende Inzidenz zum Einen durch die häufigere Nutzung von bildgebenden Verfahren, wodurch vermehrt Zufallsbefunde bei asymptomatischen Patienten diagnostiziert werden. Zum Anderen stehen fortgeschrittene Methoden zur Detektion der Tumore zur Verfügung, die eine verbesserte Früherkennung ermöglichen (Bartolini et al. 2018).

2.1.2 Ätiologie

Während die meisten PanNET sporadisch entstehen, sind ca. 10-30% der PanNET mit genetischen Syndromen assoziiert. Diese beinhalten die Multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN 1) und Typ 4 (MEN4), das Von Hippel-Lindau-Syndrom, die Neurofibromatose 1 und die Tuberöse Sklerose (Kelgiorgi and Dervenis 2017).

2.1.3 Klassifikation

Zunächst einmal kann man die PanNET anhand der Hormonsekretion einteilen. Hierbei wird zwischen funktionell aktiven (F-PanNET) sowie inaktiven PanNET (NF-PanNET) unterschieden. Je nach produziertem Hormon der F-PanNET manifestieren sich unterschiedliche Symptome (Tabelle 1). Dahingegen sind die Symptome der NF-

PanNET abhängig von der Größe und Lokalisation und sind somit unspezifisch. Auch in den NF-PanNET kann gelegentlich eine Hormonproduktion von Pankreatischem Polypeptid, Ghrelin oder Neurentensin nachgewiesen werden, ohne dass damit jedoch ein funktionelles Syndrom assoziiert ist. Die funktionell inaktiven NET stellen den größeren Anteil (60-90%) aller PanNET. Bei den funktionell aktiven PanNET ist das Insulinom am häufigsten (Kelgiorgi and Dervenis 2017).

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der F-PanNET (Kelgiorgi and Dervenis 2017)

Hormon-aktive pankreatische neuroendokrine Tumoren		
Tumor	Hormone	Symptome
Insulinom	Insulin	Hypoglykämie
Gastrinom	Gastrin	Peptische Ulzera, Diarrhoe, GERD
Glukagonom	Glucagon	Diabetes, Depression, Erytheme
Somatostatinom	Somatostatin	Diarrhoe, Diabetes, Cholelithiasis, Hypochlorhydrie
VIPom	Vasoaktives intestinales Peptid	Wässrige Diarrhoen, Hypokaliämie, Achlorhydrie

Weiterhin erfolgt die Klassifikation nach Differenzierungsgrad und dem Wachstumsverhalten (Grading) gemäß der World Health Organisation (WHO-Klassifikation) (Tabelle 2). Diese Klassifikation für gut differenzierte NET basiert primär auf dem Ki-67 Proliferationsindex: bei einer Rate von unter 3% erfolgt eine Einstufung (Grading) als Grad 1, bei 3-20% als Grad 2 und bei über 20% als Grad 3. Als ein weiteres Kriterium kann die Mitoserate pro Hauptgesichtsfeld (HPF) herangezogen werden, wobei unter 2 pro 10 HPF als G1, 2 bis 20 pro 10 HPF als G2 und über 20 pro 10 HPF als G3 klassifiziert wird. Dahingegen werden Neuroendocrine Karzinome (NEC) laut WHO 2019 morphologisch als schlecht differenzierte Neoplasien, unabhängig vom Ki-67-Proliferationsindex, definiert (S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore 2018). Der Differenzierungsgrad der NET von G1 bis G3 wird nach aktueller Leitlinie als gut, der der NEC als schlecht differenziert beschrieben.

Zudem basiert das Staging auf der TNM-Klassifikation (Tabelle 3). Beide Klassifikationen haben einen hohen prognostisch prädiktiven Faktor, wobei die stärksten prädiktiven Variablen eine hohe Proliferationsrate (Grading G3) und ein Stadium 4 nach UICC oder ENETS sind. Ein Differenzierungsgrad G1 ist prognostisch günstiger als G2. Laut der SEER Database Analyse beobachtete man ein medianes Gesamtüberleben von 124 Monaten bei NET G1, 64 Monaten bei NET G2 und 10 Monaten bei NET G3. Darüber hinaus zeigen lokalisierte G1 und G2 Tumore ein medianes Überleben von 223 Monaten und NET G1 und G2 mit Lymphknotenmetastasen ein medianes Überleben von 111 Monaten. Bei Fernmetastasen zeigt sich ein medianes Überleben von 33 Monaten bei NET G1 und G2. Für NET G3 Tumore ergeben sich Zahlen von 34, 14 und 5 Monaten (Yao et al. 2008).

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der NET (WHO 2019)

Typ	Differenzierung	Grad	Ki-67-index	Mitoserate
Neuroendokriner Tumor	Gut differenziert	G1	<3%	<2 pro 10HPF
		G2	3-20%	2-20 pro 10 HPF
		G3	>20%	>20 pro 10 HPF
Neuroendokrines Karzinom	Schlecht differenziert	kleinzellig	>20%	>20 pro 10 HPF
		großzellig		

Tabelle 3: TNM-Klassifikation nach ENETS und UICC (WHO 2017)

TNM-Klassifikation von PanNETs nach ENETS und UICC				
		<u>UICC</u>		<u>ENETS</u>
T1		Tumoren begrenzt auf das Pankreas <2 cm		Tumoren begrenzt auf das Pankreas <2cm
T2		Tumoren begrenzt auf das Pankreas >2cm		Tumoren begrenzt auf das Pankreas 2-4 cm
T3		Tumor wächst über das Pankreas hinaus ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior		Tumoren begrenzt auf das Pankreas >4 cm oder Infiltration von Gallengang oder Duodenum
T4		Infiltration großer Gefäße (Truncus		Infiltration großer Gefäße (Truncus

		coeliacus, Arteria mesenterica superior		coeliacus, Arteria mesenterica superior oder eines der folgenden Organe (Kolon, Nebenniere, Milz, Magen)
N0		Kein regionärer Lymphknotenbefall		Kein regionärer Lymphknotenbefall
N1		Regionärer Lymphknotenbefall		Regionärer Lymphknotenbefall
M0		Keine Fernmetastasen		Keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen		Fernmetastasen
		<u>UICC</u>		<u>ENETS</u>
Stadien	IA	T1 N0 M0	I	T1 N0 M0
	IB	T2 N0 M0	IIA	T2 N0 M0
	IIA	T3 N0 M0	IIB	T3 N0 M0
	IIB	T1-3 N1 M0	IIIA	T4 N0 M0
	III	T4 N0-1 M0	IIIB	Jedes T, N1 M0
	IV	Jedes T und N M1	IV	Jedes T und N M1

2.1.4 Diagnostik

Die Diagnostik richtet sich zunächst einmal nach der Klinik des jeweiligen NET. Weisen Patienten klinische Symptome auf, die auf einen funktionell aktiven NET hindeuten, so werden laborchemische Suchtests des jeweiligen Pankreashormons durchgeführt. Chromogranin A (CgA) spielt insbesondere eine prognostische Rolle für funktionell aktive und inaktive NET und dient damit als Verlaufparameter. Schließlich dient die pathologische Untersuchung einer Gewebeprobe der Diagnosesicherung. Hierbei sind CgA, Synaptophysin, die Morphologie sowie der Ki-67-Index obligat für die Diagnosesicherung. Anschließend spielen der nodale Status als auch die Metastasierung eine wichtige Rolle beim Staging. Man unterscheidet zum einen bildgebende Verfahren, die die Tumorausdehnung, Infiltration von Nachbarstrukturen und Metastasierung der Raumforderung, von Verfahren, die die Funktion der einzelnen Läsionen darstellen. Zu den bildgebenden Verfahren zählen die Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Endosonographie (EUS), wobei die EUS die höchste Sensitivität für den Nachweis von

PanNET hat. Dahingegen nutzt man die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie, um bei den Läsionen die Somatostatin-Rezeptor-Expression nachzuweisen und das Ausmaß der (Fern-) Metastasierung zu bestimmen. Das Ga68-DOTATATE-PET/CT ist eine neue Form der SSTR-basierten Bildgebung und weist eine höhere Sensitivität in der Detektion von SSTR-positiven Läsionen auf als die SSTR-Szintigraphie. Damit dient sie als bessere Methode für das Staging (Raj and Reidy-Lagunes 2018). Eine weitere Bildgebung dient der Detektion von metabolisch hoch aktivem Gewebe mittels 18F-Fluorodeoxyglucose (18F-FDG) PET-CT; diese wird für hoch proliferative NET und NEC verwendet (Kelgiorgi and Dervenis 2017).

2.1.5 Therapie

Operative Therapie

Die Therapie der PanNET lässt sich unterteilen in chirurgische, interventionell-radiologische und systemische Therapieoptionen. Eine komplette chirurgische Resektion des Tumors und ggf. seiner Metastasen ist die einzige kurative Therapieoption. Auch bei metastasiertem NET wird ein höheres medianes Überleben von 65 Monaten nach R0-Resektion des Primarius beobachtet. Im Gegensatz dazu beträgt das mediane Überleben ohne Primariusresektion bei metastasiertem NET 10 Monate. Bei palliativer Primariusresektion von PanNET wurde ebenso ein Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens beobachtet (Kelgiorgi and Dervenis 2017). Jedoch wird dies kontrovers diskutiert. Lesurtel et al. kamen nach einem Review zum Entschluss, dass Leberresektionen bei hepatisch metastasiertem NET zu keinem Vorteil hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens gegenüber interventionell-radiologische Verfahren führen (Lesurtel et al. 2015).

Interventionell-radiologische Therapien

Für Patienten mit Lebermetastasen besteht die Möglichkeit interventioneller radiologischer Therapien, wie Transarterielle Chemoembolisation (TACE), Transarterielle Embolisation (TAE), Radiofrequenzablation (RFA) und Selektive intraarterielle Radiotherapie (SIRT). Obwohl diese Verfahren klinisch häufig bei PanNET eingesetzt werden, fehlen bisher größere klinische Studien zur Evaluation dieser Therapien (Kelgiorgi and Dervenis 2017).

Systemische Therapie

Systemische Therapieoptionen für PanNET umfassen Somatostatin-Analoga (SSA), Chemotherapie, zielgerichtete Therapien (sogenannte *targeted therapies*) und Peptid-Radionuklid-Therapie (PRRT).

Zur Erstlinientherapie der F-PanNET werden SSA eingesetzt, die durch Reduktion der Hormonproduktion und –sekretion eine Symptomkontrolle bewirken. Zudem weisen die SSA einen antiproliferativen Effekt auf F-PanNET und NF-PanNET auf, sodass SSA auch zur Tumorkontrolle eingesetzt werden. Die randomisierte Placebo-kontrollierte CLARINET Studie zeigte einen Unterschied zwischen der mit Lanreotid behandelten Gruppe gegenüber der Placebo Gruppe, wobei das progressionsfreie Überleben (*progression free survival*, PFS) nach 24 Monaten bei der mit Lanreotid behandelten Gruppe 65.1% und bei der Placebo-Gruppe 33% betrug (Caplin et al. 2014)

Sind SSA wirkungslos, kommen bestimmte Chemotherapeutika in verschiedenen Kombinationen in Betracht. Hierzu zählen Streptozotocin/Doxorubicin, Streptozotocin/5-Fluouracil und Capecitabin/Temozolomid (Kelgiorgi and Dervenis 2017).

Bei der PRRT nutzt man den Somatostatinrezeptor-Status der NET aus. Durch radioaktive Elemente, wie Lutetium-177 oder Yttrium-90, die an Somatostatin-Analoga gebunden sind, entstehen radioaktive Medikamente, ⁹⁰Y-DOTATOC, ¹⁷⁷Lu-DOTATOC oder ¹⁷⁷Lu-DOTATATE. Der Octreotid-Anteil des Medikaments bindet an die NET-Zellen, die Somatostatin-Rezeptoren besitzen, woraufhin der radioaktive Teil des Medikaments diese Zellen abtötet (Kulke and Scherübl 2009).

Targeted Therapy

Unter *targeted therapy* versteht man die zielgerichtete Therapie, bei der gezielt verschiedene Schritte bestimmter Signalkaskaden gehemmt werden. In den letzten Jahren konnten Fortschritte hinsichtlich der zielgerichteten Therapie in vielen verschiedenen Tumoren erzielt werden (Paraiso and Smalley 2013; Sawyers 2004). Eine der wichtigsten Therapeutika für die PanNET sind hierbei die mTOR-Inhibitoren, die das Protein mTOR, eine Serin-Threonin-Kinase, die in der Zellproliferation eine wichtige Rolle spielt, inaktivieren. So konnte eine internationale randomisierte Placebo-kontrollierte Phase III Studie, RADIANT-3, zeigen, dass Patienten, die mit 10 mg Everolimus pro Tag behandelt wurden, ein Progressionsfreies Überleben (PFS)

von 11 Monaten im Gegensatz zur Placebo-Gruppe mit 6 Monaten hatten (Yao et al. 2011)

Eine weitere zielgerichtete Therapieoption ist Sunitinib, ein Multikinase-Inhibitor, der vor allem gegen *vascular endothelial growth factor-receptor* (VEGFR), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und *stem cell factor receptor* (c-Kit) gerichtet ist (Roskoski 2007). Ebenso konnte mithilfe einer randomisierten doppelblind kontrollierten Phase III Studie eine Verbesserung hinsichtlich des PFS durch Sunitinib erreicht werden (Raymond et al. 2011). Roviello et al. konnten ein verlängertes Überleben mithilfe der zielgerichteten Therapie im Gegensatz zum Placebo feststellen (Roviello et al. 2016).

Nichtsdestotrotz werden Resistenzen gegen *targeted therapy* beobachtet, die mit einer Überaktivierung des AKT Signalweges einhergehen. Daher erfolgt zunehmend der Einsatz von Kombinationstherapien, z.B. Kombinationen aus mTOR-Inhibitoren mit VEGF-Inhibitoren oder SSA (Bajetta et al. 2014). Eine Phase II Studie von Hobday et al. zeigte für die Kombination aus Temsirolimus, einem mTOR Inhibitor, und Bevacizumab, einem VEGF-a- Antikörper, eine bessere Wirkung als die Monotherapie (Hobday et al. 2015).

2.2 Fibroblasten

Fibroblasten entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen und sind nicht epitheliale, nicht inflammatorische und nicht endotheliale Zellen des Bindegewebes (Kalluri 2016). Diese sind für die Bildung der Extrazellulären Matrix (ECM) und damit für epitheliale Differenzierungsprozesse, Regulation der Inflammation und Wundheilung verantwortlich. Fibroblasten sorgen für die Formation der Extrazellulären Matrix, indem sie Kollagen I, Kollagen III, Kollagen V und Fibronectin herstellen. Auch nehmen sie an der Formation von Basalmembranen durch die Sekretion von Kollagen IV und Laminin teil. Zudem sorgen Fibroblasten für eine Interaktion zwischen epithelialen Zellen und Mesenchym (Kalluri and Zeisberg 2006).

Die Fibroblasten spielen in der Wundheilung eine besondere Rolle, die auch in leicht abgewandelter Form der Rolle von Fibroblasten in der Tumorentstehung ähnelt. Nach Verletzung kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten, die in Kontakt mit dem Kollagen kommen, woraufhin diese Wachstumsfaktoren, wie PDGF, *transforming growth factor beta-1* (TGF- β 1) und Interleukine, wie Interleukin-1-beta (IL-1 β),

ausschütten. Dies führt zu einer Rekrutierung von Immunzellen sowie Fibroblasten, die zu einer Proliferation und vermehrtem Aufbau der ECM-Bestandteile, bestehend aus Fibronectin, Fibrin, Laminin und Kollagen, führt. Weiterhin sorgen die Immunzellen für eine Differenzierung der Fibroblasten in *alpha smooth muscle actin*- (α SMA-) tragende Myofibroblasten, die für eine Anordnung des Kollagens in den fortgeschrittenen Stadien der Wundheilung sorgen. Schließlich weisen die Aufgaben der aktivierten Myofibroblasten Ähnlichkeiten mit denen der Tumorfibroblasten auf (Paraiso and Smalley 2013; Rodemann and Müller 1991; Tomasek et al. 2002).

Anders als die Wundheilung, bei der die Fibroblasten nur befristet aktiv sind, bleiben diese, vergleichbar mit Tumorprozessen, bei Prozessen einer Organfibrose stets aktiviert (Kalluri 2016; Rock et al. 2011). Laut Dvorak weist somit der Tumorprozess Ähnlichkeiten mit dem Prozess der Wundheilung auf, wobei der Tumor selbst als „nicht heilende Wunde“ bezeichnet wird. Der Grund hierfür ist eine stetige Aktivierung des Stromas (Dvorak 2015).

2.2.1 Tumorstroma

Mittlerweile spielt die Interaktion zwischen Tumor und dem dazugehörigen Tumorstroma in der onkologischen Forschung eine große Rolle. Handelt es sich beim Tumor um ein Karzinom in situ (CIS), so ist der Tumor durch eine Basalmembran vom umgebenden Stroma getrennt. Dabei spielt der Unterschied zwischen normalem Stroma und Tumorstroma eine Rolle, wobei letzteres eine höhere Dichte an Fibroblasten, Kapillaren, Kollagen I und Fibronectin aufweist (Hanahan and Weinberg 2011; Kalluri and Zeisberg 2006).

Ein zentraler Teil der Interaktion zwischen Tumor und Tumorstroma ist die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF. Zum einen wird VEGF vom Tumor selbst ausgeschüttet, in höheren Mengen jedoch von Fibroblasten und Immunzellen des Tumorstromas. VEGF wirkt auf die Endothelzellen und führt zu einer erhöhten Permeabilität, die eine Extravasation der Plasmaproteine, wie Fibrin, verursacht. Dieses wiederum sorgt für eine Invasion von Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen, wobei die Fibroblasten essentielle Bestandteile der ECM produzieren. Weiterhin ist VEGF ein zentraler Stimulator der Angiogenese, sodass durch eine erhöhte Ausschüttung des Faktors die Tumolvaskularisierung gewährleistet ist. (Brown et al. 1999; Leung et al. 1989).

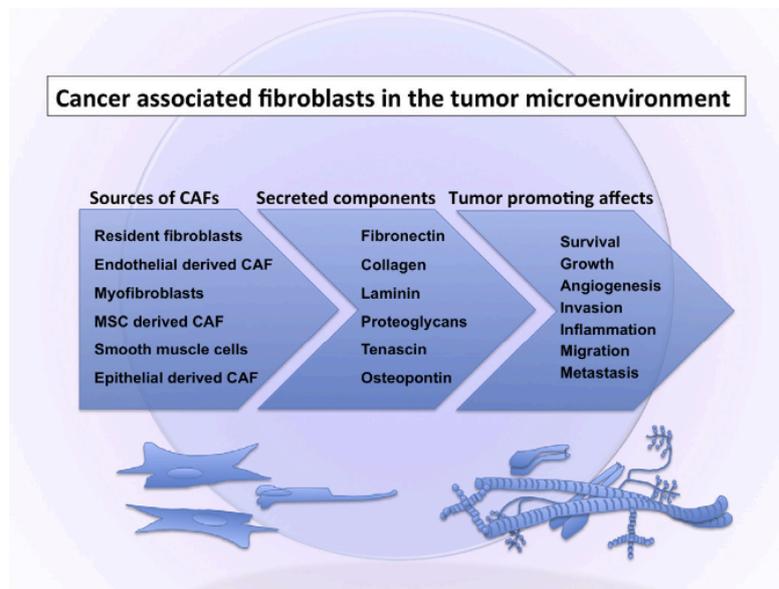


Abbildung 1.1: Übersicht über die Herkunft, sekretorischen Faktoren und Aufgaben der CAFs (Paraiso and Smalley 2013)

2.2.2 CAF im Tumorstroma

Karzinom-assoziierte Fibroblasten, auch *cancer associated fibroblasts* (CAF), entstammen aus mehreren Geweben und können epithelialer oder mesenchymaler Herkunft sein oder aus Myofibroblasten während der Wundheilung entstehen. Diese sezernieren Komponente der ECM wie Fibronectin, Fibrin, Kollagen, Laminin und Tenascin. Diese stellt, neben der Sekretion löslicher Faktoren, einen Mechanismus, der für eine erhöhte Tumorproliferation, Invasion und Angiogenese verantwortlich ist, dar (Paraiso and Smalley 2013).

Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAF) sind sogenannte modifizierte, aktivierte Fibroblasten, die bestimmte Proteine, wie α SMA, *fibroblast activation protein* (FAP) und *fibroblast specific protein* (FSP) exprimieren (L. Huang et al. 2014; Kalluri 2016; Nurmik et al. 2019; Sugimoto et al. 2006; Wilson et al. 2012). Diese Aktivierung kann mit der Aktivierung der Fibroblasten während der Wundheilung gleichgesetzt werden (Kalluri and Zeisberg 2006; Sappino et al. 1988). Die Signalwege, die zum Mechanismus der Aktivierung beitragen, sind aktuell Gegenstand der Forschung. Als einer der ersten Schritte erfolgt durch TGF β eine Transformation normaler Fibroblasten in Tumor-assoziierte Fibroblasten, deren Phänotyp denjenigen Fibroblasten ähnelt, die für die Wundheilung zuständig sind und mit einer Formation der ECM assoziiert sind (Rønnov-Jessen and Petersen 1993).

Zusätzlich zu VEGF und TGF β spielen auch weitere Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Aktivierung von CAF, wie beispielsweise PDGF und FGF (*fibroblast growth factor*) (L. Huang et al. 2014).

Während TGF β bei aktivierten Fibroblasten, die für einen erhöhten Aufbau der ECM sorgen, eine Rolle spielt, stimuliert PDGF in erster Linie die Proliferation. Dahingegen führt FGF2 zu einer erhöhten Expression von α SMA, einem Protein des Zytoskeletts, das aktivierte Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten, charakterisiert (Shao, Nguyen, and Barsky 2000; Strutz et al. 2000).

Zusammenfassend lässt sich die Interaktion zwischen Tumor und Fibroblasten so beschreiben: Zunächst schüttet der Tumor Wachstumsfaktoren, wie PDGF, *epidermal growth factor* (EGF) und TGF β aus. Diese führen zu einer Aktivierung der Fibroblasten, die daraufhin Wachstumsfaktoren, wie *hepatocyte growth factor* (HGF), *Insulin-like growth factor* (IGF), *nerve growth factor* (NGF), WNT1, FGF und VEGF sezernieren. Diese wirken zum Einen stimulierend auf das Tumorstadium. Zum Anderen induzieren FGF und VEGF die Angiogenese (L. Huang et al. 2014; Paraiso and Smalley 2013).

Eine Interaktion zwischen Fibroblasten und Immunzellen durch Ausschüttung von Interleukinen, wie IL-8, und Chemokinen ist ebenso beschrieben (Paraiso and Smalley 2013).

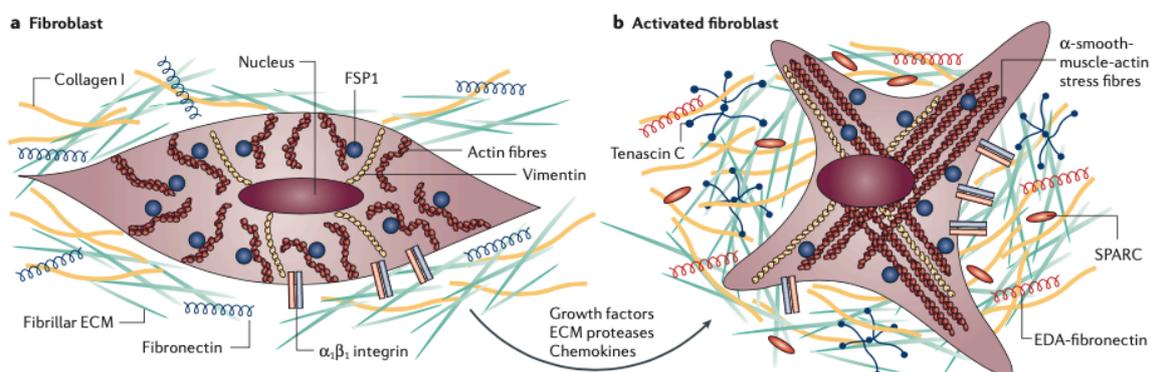


Abbildung 1.2: Darstellung eines inaktiven Fibroblasten gegenüber einem aktiven (Kalluri and Zeisberg 2006)

A: normaler nicht-aktivierter Fibroblast: Ist ein Fibroblast nicht aktiviert, ist er von einer Extrazellulären Matrix umgeben, die hauptsächlich aus Kollagen Typ I und Fibronectin besteht. Der Fibroblast ist durch Integrine, wie α 1 β 1 mit der ECM verbunden. Im Zytoskelett des Fibroblasten befinden sich das Fibroblasten-spezifische Protein (FSP), Vimentin und Aktinfilamente.

B: aktivierter Fibroblast: Kommt es durch verschiedene Wachstumsfaktoren oder Chemokinen zur Aktivierung des Fibroblasten, verändert sich seine Morphologie. Er exprimiert nun *alpha-smooth muscle actin* (α SMA) und sezerniert ECM-Proteine, wie Kollagen Typ I, Tenascin C, EDA-Fibronektin sowie SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*).

Bisher wurde in verschiedenen Tumoren der pro-tumorige Effekt der CAF gezeigt. Orimo et al. injizierten in Ras-transformierten Zellen des Mammakarzinoms CAF oder normale Fibroblasten. Hier zeigte sich, dass das Xenograft mit den CAF größer wuchs, als der mit den normalen Fibroblasten. Dies beruhte auf einer erhöhten Tumorpheriferation sowie vermehrten Angiogenese (Orimo et al. 2005). Als Mechanismus konnte eine Ausschüttung von *stromal-cell-derived factor -1* (SDF-1), durch die CAF, welcher zu einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen führt, gefunden werden (Orimo et al. 2005).

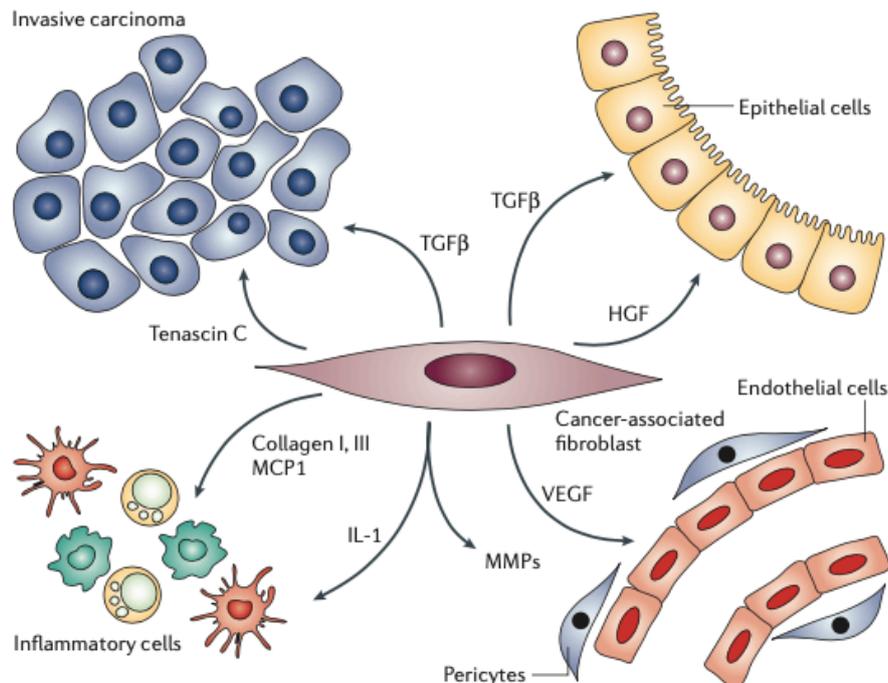


Abbildung 1.3: Übersicht über die Interaktion von CAF im Tumorstroma (Kalluri and Zeisberg 2006)

2.2.3 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)

Unter EMT versteht man eine Umwandlung von epithelialen in mesenchymale Zellen und damit einen Verlust der typischen epithelialen Zell-Zell-Kontakte (Hay 1995). Tumorzellen, die sich einer EMT unterziehen, entwickeln einen invasiven Phänotypen, sodass EMT mit einem Tumorprogress und Metastasierung in Verbindung gebracht wird (L. Huang et al. 2014; Thiery 2002).

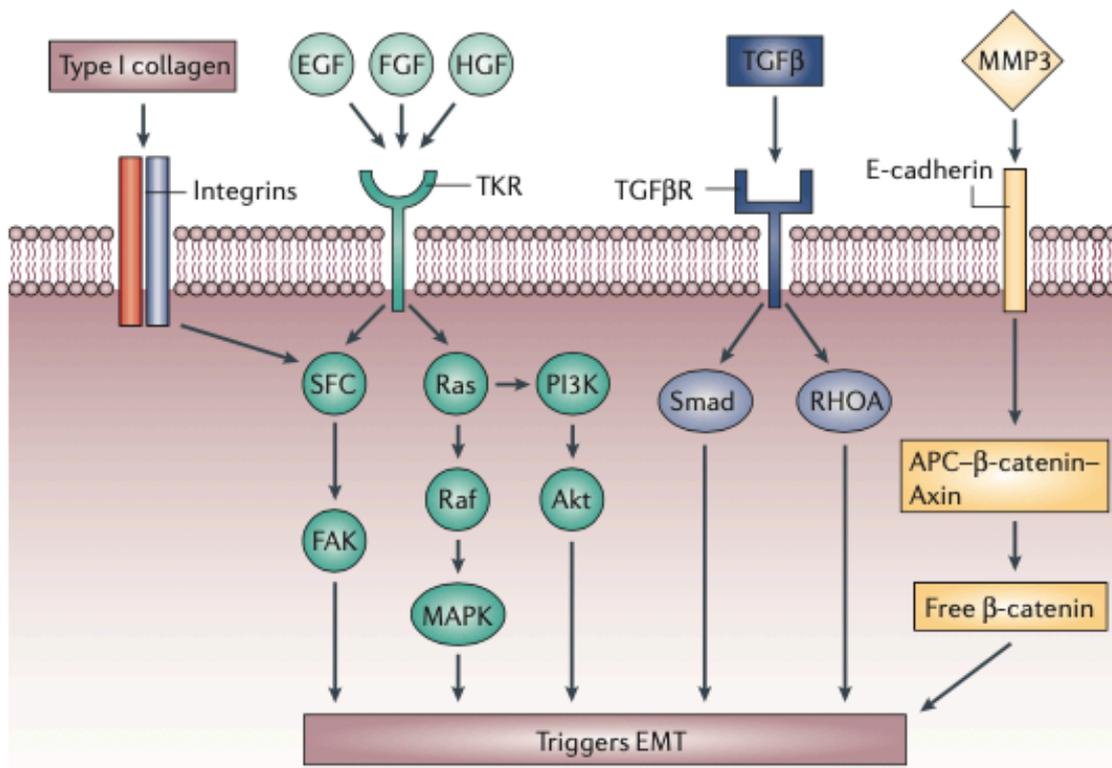


Abbildung 1.4: Darstellung der Signalwege einer EMT (Kalluri and Zeisberg 2006)

CAFs sind mögliche Verursacher einer EMT, wobei es verschiedene Signalwege gibt, die die EMT induzieren (Kalluri and Zeisberg 2006).

In einem ersten Schritt binden Wachstumsfaktoren, wie EGF, FGF und HGF an Tyrosinkinase-Rezeptoren, TGFβ an den dazugehörigen Rezeptor, ECM-Proteine, wie Typ I Kollagen an Integrine oder MMP (Matrix-Metalloprotease) an E-Cadherine auf den Tumorzellen. All diese Faktoren können von CAFs ausgeschüttet werden. Die Stimulation der EMT durch Integrine erfolgt über die *focal-adhesion kinase* (FAK) und durch Tyrosinkinase-Rezeptoren über die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). TGFβ sorgt für eine Aktivierung des Smad-Signalweges. MMP3, aber auch MMP2 und MMP9 bauen E-Cadherin ab, führen zu dessen Internalisierung, wodurch das *active*

β-Catenin ins Zellkern transportiert wird und EMT induziert (Kalluri and Zeisberg 2006; Paraiso and Smalley 2013).

In den Fibroblasten kommt es ebenso nach Bindung von Wachstumsfaktoren zu einer Aktivierung eines Signalweges, nämlich den JAK-STAT3-Signalweg. Dadurch setzen die Fibroblasten vermehrt MMP und weitere ECM-Proteine frei (Kuzet and Gaggioli 2016).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Autoklav VX-12	Systec, Wettenberg
Brutschrank	Binder GmbH, Hameln
Digitales Mikroskop: BZ-9000	KEYENCE, Neu-Isenburg
Laborwaage	Kern, Balingen-Frommern
Mikroskop: Wiluvert	Helmut Hundt GmbH, Wetzlar
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen
Multipipette E3/E3x	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf Research Plus, Hamburg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PowerPac	Bio-Rad GmbH, Feldkirchen
<i>Real-Time</i> -PCR-Gerät: Step One Plus	Applied Biosystem/Life Technologies, Darmstadt
Spektrophotometer: Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Stickstofftank	Custom BioGenic System, Michigan, USA
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe, BioChem VacuuCenter BVC professional	Vacuubrand GmbH+CO KG, Wertheim
Vortex VF2	Janke & Kunkel, Staufen

Zellkulturbank: Integra Vacusafe	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge ROTANTA 460S	Hettich, Kirchlingern
Zentrifuge: Minifuge RF	Heraeus, Hanau

3.1.2 Kunststoff-und Verbrauchsmaterialien, weitere Materialien

15 ml Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
24-Well-Schalen	Thermo Scientific Nunc, Schwerte
50 ml Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-Well-Schalen	Sarstedt, Nümbrecht
Coverplates	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Deckgläschen (Immunfluoreszenz)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen (Immunhistochemie)	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Glaspasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Thermo Scientific Nunc, Schwerte
Laborglasflaschen	DURAN Group GmbH, Mainz
Micro-Amp Fast Optical 96-Well Plate	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Slide rack	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Transwells für 24-Well-Schale (Porengröße: 0,4 µm)	Costar/Corning, Massachusetts, USA
Transwells für 6-Well-Schale (Porengröße: 0,4 µm)	Costar/Corning, Massachusetts, USA
Zellkulturflasche T175	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflasche T75	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Reagenzien

1%iges Penicillin G/Streptomycin	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Bluing Reagent	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Bovines Serumalbumin, Fraktion 5	PAA/GE Healthcare Europe GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol „Baker analyzed“	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Eukitt	O. KINDLER GMBH& CO, Freiburg
Fetales Kälberserum (FCS) 10%	PAA/GE Healthcare Europe GmbH, München
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco/Life Technologies, Darmstadt

Roswell Park Memorial Institute (RPMI)- Medium	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Trypanblau 0,4%	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Tween 20	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
VECTASHIELD HardSet Mounting Medium with	Vector Laboratories, Kalifornien, USA
Vollentsalztes Wasser	Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
Xylol	Chemsolute, Renningen
β-Mercaptoethanol	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA

3.1.4 Kits

ECL-Kit, SuperSignal West Dura	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems/Life technologies, Darmstadt
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT- PCR (AMV)	Roche, Mannheim
NucleoSpin TriPrep	MACHERY-NAGEL, Düren
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

3.1.5 Primer

Chromogranin A	QIAGEN, Hilden
CXCR4	QIAGEN, Hilden
E-Cadherin	QIAGEN, Hilden
EGF	QIAGEN, Hilden
FGF1, 2, 7	QIAGEN, Hilden
GAPDH	QIAGEN, Hilden
HGF	QIAGEN, Hilden

IL-8	QIAGEN, Hilden
SDF-1	QIAGEN, Hilden
VEGFa	QIAGEN, Hilden
Vimentin	QIAGEN, Hilden

3.1.6 Antikörper

AKT	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Desmin	Dako Agilent, Santa Clara, USA
ERK	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
FAP	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
FSP	Santa Cruz Biotechnology Texas, USA
Ki-67	Dako Agilent, Santa Clara, USA
p-AKT	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
p-ERK	Santa Cruz Biotechnology Texas, USA
p-STAT3	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
STAT3	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
α SMA	Dako Agilent, Santa Clara, USA

3.1.7 Puffer und Lösungen

Phosphate-buffered saline (PBS)

- Steril, Gibco/Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
- Ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot

PBS zehnfach Stock Solution:

- NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 14,4 g, KH₂PO₄ 2,72 g
- mit vollentsalztem Wasser auf 800 ml auffüllen und den pH auf 7,4 einstellen (mit HCL)
- auf einen Liter auffüllen und autoklavieren

TrisEDTA pH 9:

- Tris 1,21 g, EDTA 0,37 g
- mit vollentsalztem Wasser auf einen Liter auffüllen
- Zugabe von 0,5 ml Tween 20 und gut mischen

10x Laufpuffer

- 20 g SDS
- 288 g Glycin
- 60,6 g Trisbase
- Ad 2 l Wasser

1x Laufpuffer

- 100 ml 10x Laufpuffer
- 900 ml Wasser

10x Blotpuffer

- 144 g Glycin
- 0,3 g Trisbase
- Ad 1 l Wasser

1x Blotpuffer

- 100ml 10x Blotpuffer
- 200 ml Methanol
- 700 ml H₂O

10x TBS

- 24,22 g Trisbase
- 175,32 g NaCl
- Ad 2 l Aqua dest
- pH 7,6 (ca. 14,5 ml 13M HCL)

TBS-T

- 100 ml 10x TBS
- 900 ml Aqua dest

- 0,5 ml Tween-20

Trenngel 12% Stock (100 ml)

- 24 ml H₂O
- 30 ml Acrylamid 40%
- 25 ml 1,5M Tris pH 8,8
- A ml 10% SDS
- 20 ml Glycerol
- Für Gele bei 1,0 mm: 10 ml Stock+ 25 µl APD+ 12,5 µl TEMED

Sammelgel, Stock (100ml)

- 74 ml H₂O
- 12,5 ml 40% Acrylamid
- 12,5 ml 1M Tris pH 6,8
- 1 ml 10%SDS
- Für Gele bei 1,0mm: 5 ml Stock+ 20 µl APS+ 10µl TEMED)

3.2 Vorbereitung der immunhistochemischen Färbungen

Durch die Methode der immunhistochemischen Färbung ist es möglich, antigene Strukturen auf Gewebeschnitten nachzuweisen. So können Marker von Tumor-assoziierten Fibroblasten auf NET-Gewebe nachgewiesen werden.

3.2.1 Auswahl geeigneter NET-Schnitte

Das Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf stellte für die immunhistochemischen Färbungen humaner NET-Gewebe Paraffinschnitte mit einer Dicke von zwei µm zur Verfügung. Es handelte sich um Gewebe aus pankreatischen NET, von denen jeweils der Primarius sowie die zugehörigen Lebermetastasen untersucht wurden.

3.2.2 Auswahl geeigneter Fibroblastenmarker

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen sollten Fibroblastenmarker im Tumorgewebe eines NET dargestellt werden. Es wurden zunächst Vorversuche mit den Fibroblastenmarkern αSMA, FAP, FSP und Desmin nach Standardprotokoll durchgeführt.

3.2.3 Übersicht über gefärbte Antikörper

Um das Vorhandensein und die Verteilung von Fibroblasten in humanen NET-Geweben darzustellen, wurden charakteristische Fibroblastenmarker auf humanen NET-Geweben mittels spezifischer Antikörper gefärbt. Hier werden nun die aufgelisteten Marker näher beschrieben.

Alpha-smooth muscle actin (α SMA), auch *smooth muscle aortic alpha-actin* (ACRA2) gehört zur Aktin-Familie, die für die Zellmotilität, Struktur und Integrität zuständig ist. α SMA ist vor allem im Vorgang der Wundheilung bekannt, während der es für die Kontraktilität der Myofibroblasten verantwortlich ist. So sorgt es für Kontraktion und Festigkeit des Granulationsgewebes während der Wundheilung. Da die Myofibroblasten vermehrt in dem Tumorstroma zu finden sind, konnte α SMA als CAF-Marker genutzt werden (Nurmik et al. 2019).

Fibroblast activation Protein alpha (FAP) ist ein Typ II Membran-Protein aus der Familie der membrangebundenen Serinprotease-Familien. FAP sorgt für die Wundheilung, Fibrose und Degradation der extrazellulären Matrix durch die Dipeptidyl-Peptidase und Kollagenase Aktivität (Öhlund, Elyada, and Tuveson 2014). Zudem ist bereits beschrieben, dass FAP erhöht im Tumorstroma positiv ist, weshalb es ebenso als CAF-Marker bekannt ist (Isella et al. 2015; Kramer et al. 2017; De Marco et al. 2016). Aufgrund unspezifischer Färbung der Schnitte, wurde der Antikörper nicht weiter benutzt.

S100 calcium binding protein A4 (S100A4), oder auch *fibroblasts-specific protein 1* (FSP1) ist ebenso als CAF-Marker beschrieben. Es ist lokalisiert im Zytoplasma oder im Nukleus und sorgt für Differenzierungsvorgänge, Motilität und Invasion (Kahounová et al. 2018; Zeisberg et al. 2007). Es zeigte sich eine Färbung anderer Zelllinien zusätzlich zu den Fibroblasten, sodass dieser Antikörper nicht zur Auswertung genutzt werden konnte.

Desmin ist ein Intermediärfilament, das den kontraktilen Apparat mit verschiedenen Organellen verbindet und so für die Dreidimensionalität der Zellen sorgt. Zudem sorgt es für Signal- und Transportprozesse innerhalb der Zelle (Capetanaki et al. 2015). Die Expression von Desmin wurde ebenso in Wundheilungsprozessen vermehrt beschrieben (Capetanaki et al. 2015). Arentz et al. konnten eine signifikant höhere

Expression von Desmin im Tumorstroma bei höheren Stadien des kolorektalen Karzinoms verglichen mit früheren Stadien zeigen (Arentz et al. 2011). In diesem Projekt konnte jedoch keine spezifische Färbung von Desmin der immunhistochemischen Gewebeschnitte gezeigt werden, sodass keine Auswertung erfolgte.

3.3 Abläufe immunhistochemischer Färbungen

Diesem endgültigen Färbeprotokoll liegen Vorversuche zugrunde, die mitsamt ihren Ergebnissen und technischen Besonderheiten zu einer Etablierung dieses Protokolls beigetragen haben. Insgesamt wurde α SMA und FSP auf humanem NET-Gewebe aus pankreatischem Primarius sowie seiner Lebermetastasen gefärbt, wobei nur α SMA zur Auswertung genutzt wurde (siehe oben).

3.3.1 Entparaffinieren

Zunächst werden die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte in ein wässriges Milieu überführt. Hier wird mit drei jeweils fünfminütigen Inkubationen in reinem Xylol gestartet. Anschließend folgt die absteigende Alkoholreihe, bei der 100, 90, 70 und 50%iges Ethanol in verschiedene Glasküvetten befüllt wird und die Objektträger in jeder Küvette für fünf Minuten inkubiert werden. Schließlich dient dieser erste Schritt der Entwässerung und Entparaffinierung der Gewebeschnitte, die anschließend für fünf Minuten in vollentsalztes Wasser überführt werden.

3.3.2 Demaskierung

Um antigene Strukturen für die Antikörper zugänglich zu machen, folgt der Schritt der enzymatischen oder hitzeinduzierten Demaskierung des Formalin-fixierten Gewebes, auch *antigen-retrieval* genannt. Dieser Schritt ist sinnvoll, da durch die Fixierung mit Formalin und Verarbeitung mit Paraffin, Antigene verkettet sind. In unserem Versuch kam die hitzeinduzierte Demaskierung zum Einsatz. Als Demaskierungspuffer wurde TrisEDTA mit pH-Wert 9 verwendet. Zunächst wurden die zu färbenden Gewebe in eine mit dem Puffer befüllte Kochküvette gestellt und bei 900 Watt zum Kochen gebracht. Anschließend wurden diese für zehn Minuten bei 360 Watt erhitzt. Um morphologisch gute Ergebnisse zu erzielen, wurde die Küvette zum raschen Abkühlen für zehn Minuten auf Eis gestellt.

3.3.3 Weiterer Ablauf

Für die gesamte Färbung wurden die Reagenzien des Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB verwendet. Als Waschpuffer kam die gebrauchsfertige Stocklösung des Puffers *Phosphate-buffered saline und Tween* (PBS-T) im Verhältnis 1:20 mit vollentsalztem Wasser zum Einsatz.

Nach dem Abkühlen im Schritt der Demaskierung wurden die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS-T belassen.

Anschließend wurden die Schnitte in eine mit drei-prozentiger Peroxidase Lösung befüllten Glasküvette überführt und für zehn Minuten inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, unspezifischen Hintergrund durch endogene Peroxidasen zu vermeiden. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit PBS-T. Zudem diente eine Blocklösung der Verhinderung einer unspezifischen Bindung des Antikörpers, die auf den Objektträger aufgetragen wurde, nachdem mit dem sogenannten DakoPen, einem Fettstift, das Gewebe begrenzt wurde. Dies diente dazu, die Antikörperlösung auf das Gewebe zu begrenzen, um somit eine Antikörperlösung von 150 µl pro Schnitt ausreichend zu machen. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde unmittelbar der Antikörper auf den Objektträger gegeben. Für die Antikörper α SMA, FSP erwies sich eine Verdünnung von 1:200, für pSTAT3 1:50 als geeignet. Für die Verdünnung kam die Antikörperlösung des Färbekits zum Einsatz. Schließlich wurden die Schnitte mit den Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert.

In Anschluss der Antikörperinkubation schlossen sich drei Waschvorgänge mit PBS-T an.

Ein weiterer Blockvorgang wurde mittels Ziegenserum für zehn Minuten durchgeführt, wohingegen zu den anderen Schritten, kein Waschvorgang folgte.

Außerdem wird ein zweiter Antikörper, der spezifisch den ersten Antikörper bindet, benötigt, um das Farbsignal zu generieren. Hierbei handelt es sich um einen *antibody amplifier*, der mit dem Enzym gekoppelt ist. Es wurden ungefähr zwei Tropfen pro Schnitt benötigt, wonach sich eine Inkubationszeit von einer Stunde anschloss.

Der immunhistochemischen Färbereaktion liegt eine enzymatische Reaktion zugrunde. Das Enzym, das ein Substrat benötigt, mit dessen Hilfe eine spezifische Färbereaktion ausgelöst wird, ist am zweiten Antikörper gebunden. Hierbei handelt es sich beim Enzym um *horseradish peroxidase* (HRP). Als Substrat dient das

Färbechromogen 3,3'-Diaminbenzidin (DAB), das folgendermaßen verdünnt wurde: In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 1 ml einer gebrauchsfertigen Verdünnungslösung gegeben, zu der 20 µl des Färbechromogens gegeben wurde. Anschließend wurden 250 µl auf die jeweiligen Schnitte gegeben und 30 Sekunden für FSP und α SMA und 3 Minuten für pSTAT3 inkubiert. Wünscht man sich eine stärkere oder schwächere Intensität der Färbung, so konnte die Inkubationszeit entsprechend angepasst werden. Zur Beendigung der Färbereaktion wurden die Schnitte in vollentsalztes Wasser gegeben und mit diesem dreimal für jeweils fünf Minuten gewaschen. Der immunhistochemischen Färbung folgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, die weitere Strukturen der Zellen - insbesondere Zellkerne - mit unterschiedlich starkem Blau färbte. Das Hämatoxylin wird für zehn Minuten inkubiert. Schließlich folgt ein Waschschrift mit vollentsalztem Wasser, wonach die Schnitte in der Glasküvette unter laufendes destilliertes Wasser für zehn Minuten gestellt werden.

3.3.4 Aufsteigende Alkoholreihe

Für die Entwässerung nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte nun in eine aufsteigende Alkoholreihe aus 50, 70, 90 und 100%igem Ethanol sowie drei Xylobäder überführt.

Eindeckeln

Zur Abdeckung der gefärbten Gewebeschnitte wurde das Schnelleinschlussmittel Eukitt verwendet und schlussendlich ein Deckgläschen luftblasenfrei auf den Objektträger gelegt.

3.3.5 Anfertigung von Fotos im digitalen Mikroskop

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen stand ein digitales Mikroskop zur Verfügung, mit dessen Hilfe die Schnitte in verschiedenen Vergrößerungen begutachtet wurden. Dabei wurde besonders auf die Bereiche innerhalb der NET-Zellnester und auf Stromasepten zwischen den Tumornestern geachtet. Die statistische Auswertung von α SMA erfolgte durch Berechnung der Fläche mittels ImageJ, die pSTAT3-Färbung nach manueller Zellzählung. Pro Schnitt wurden zehn Fotos angefertigt. Die Übersichtsaufnahme mit der 10er Vergrößerung diente der übersichtlichen Darstellung der α SMA-Färbung, während die 20er Vergrößerung gewählt wurde, um die pSTAT3-positiven Zellkerne darzustellen und

einen Bezug zwischen Stroma und Tumor zu visualisieren. Durch den *quick full focus*-Modus konnten die Gewebeschnitte scharf gestellt und mit einer Autofunktion kontrastreich dargestellt werden. Bei allen Fotos betrug die Belichtungszeit 1/280 sec für die 10er Vergrößerung und 1/80 sec für die 20er.

3.4 Auswertung der Immunhistochemie

3.4.1 Schematische Darstellung der ausgewählten Bildabschnitte

Pro Färbung und pro Patienten wurden Bereiche innerhalb des Tumors und im stromanahen Tumorbereich ausgewertet. Abbildung 3.1 zeigt Beispiele der NET-Bereiche an Stromasepten (A) und innerhalb des Tumornestes (B).

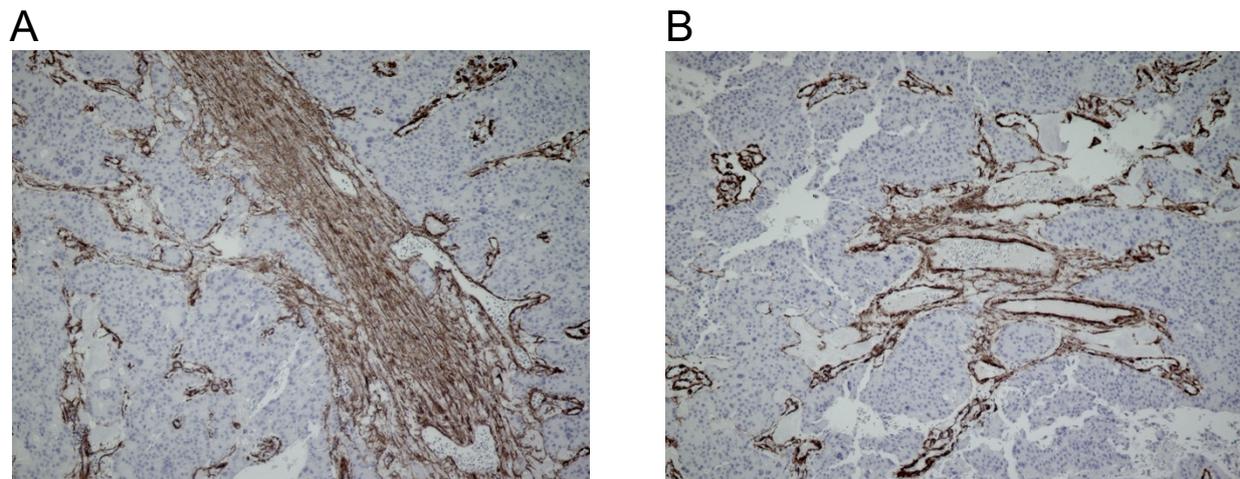


Abbildung 3.1: α SMA-Färbung in NET A: an Stromasepten, B: innerhalb des Tumornestes

3.4.2 Zellzählung mit dem Programm *ImageJ*

Mit dem Programm *ImageJ* konnten die angefertigten Bilder ausgewertet werden. Hierbei wurden die α SMA-positiven Bereiche als Fläche in Prozent berechnet. Die damit berechnete Fläche diente als Maß für die Anzahl der α SMA-positiven Zellen. Für die Auswertung der pSTAT-3-positiven Zellen wurden die gefärbten Zellkerne der Tumorzellen ausgezählt.

3.4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Zählergebnisse mittels t-Test sowie graphische Darstellung wurden mit dem Programm *GraphPad Prism 8* durchgeführt. Eine Beurteilung der Signifikanz erfolgte wie im Abschnitt 3.6.1 beschrieben.

3.5 Kultivierung von etablierten Zelllinien

Die Zellkultur-Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in geeigneten sterilen Kulturgefäßen kultiviert, in einem Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C gehalten und in regelmäßigen Abständen passagiert.

3.5.1 Humane NET-Zelllinie NT-3 und BON

Die humane NET-Zelllinie NT-3 ist eine gut differenzierte NET-Zelllinie aus dem Pankreas und stellt die Hauptzelllinie für das Projekt dar. Benten, Behrang et al. etablierten diese Zelllinie im Jahre 2016. Diese stammt aus einer Lymphknoten-Metastase eines Insulinoms. Mit einer Verdopplungszeit von acht bis zehn Tagen in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, FGF2 und EGF, stellt diese Zelllinie eine gut differenzierte, langsam proliferierende Zelllinie dar (Benten et al. 2018). Dies unterstreicht den Differenzierungsgrad G2 der Zellen im Gegensatz zur Zelllinie, BON. Diese ist eine humane Karzinoid-Zelllinie, die eine Verdopplungszeit von weniger als zwei Tagen aufweist (Benten et al. 2018; EVERS et al. 1994). In diesem Projekt dient die BON Zelllinie als Vergleichszelllinie für die NT-3 Zellen. Hier ist es von Bedeutung, den Einfluss der CAF auf verschieden differenzierte NET zu eruieren.

3.5.2 Humane Fibroblasten-Zelllinien

Im Zentrum der Arbeit steht die Interaktion zwischen humanen NET- und primären Tumorfibroblastenkulturen. Hierfür wurden drei verschiedene primäre Fibroblasten-Kulturen aus Lebermetasten von verschiedenen pankreatischen NET, in manchen Versuchen auch aus dem NET-Primarius des Pankreas, verwendet. Es wurden die Fibroblasten-Präparationen NT78-LM (Lebermetastasen), NT45-LM, NT52-LM, NT62-LM sowie NT84-P (Primarius), NT31-P und NT32-P eingesetzt.

3.5.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die NET-Zelllinien NT-3 und BON simulierten in den Ko-Kultur Versuchen und Versuchen mit konditioniertem Medium den Tumorzellanteil im Tumor. Diese Tumorzellen wachsen fest auf dem Boden der Zellkultur-Flasche an, die NT-3 Zellen nach Beschichtung des Flaschenbodens mit Kollagen IV. Die NET-Zelllinien werden in einem *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-Medium, die Fibroblasten dagegen

in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kultiviert. Beiden Medien werden 1%iges Penicillin G/Streptomycin und 10%iges *fetal calf serum* (FCS) zugefügt. Eine optimale Konfluenz war bei einer Bedeckung von 70% des Flaschenbodens zu beobachten. Bei zu starker Konfluenz wurden die Zellkulturen auf mehrere Falschen aufgeteilt („gesplittet“) und subkultiviert. Der Grund hierfür liegt darin, dass ein zu dichtes Zellwachstum eine Kontaktinhibition verursacht und eine weitere Proliferation der Zellen verhindert.

Zum Teilen der Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium mittels einer Glaspipette abgesaugt. Anschließend wurde mit fünf Milliliter (ml) calcium- und magnesiumfreien PBS gewaschen und die Zellkulturflasche leicht geschwenkt. Nach wiederholtem Absaugen des Puffers wurden drei ml Trypsin/EDTA in die Flasche pipettiert. Dies bewirkt durch die Funktion einer Endopeptidase eine Ablösung der Zellen von dem Kunststoffboden der Zellkulturflasche. Die Vollständigkeit der Zellablösung wurde mikroskopisch beurteilt. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr drei Minuten wurde die Reaktion des Trypsins mit FCS-haltigem RPMI-Medium gestoppt, in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit frischem RPMI-Medium resuspendiert, die gewünschte Menge an Zellsuspension in eine neue Zellkultur-Flasche überführt und das Gesamtvolumen auf 15 ml aufgefüllt. Entsprechend dem Wachstum der NT-3 Zellen, wurde ein Mediumwechsel zweimal die Woche und ein Splitten alle 7 bis 14 Tage durchgeführt. Bei den BON Zellen war ein Splitten ungefähr alle drei Tage notwendig.

3.5.4 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Für die Zellkulturversuche wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen benötigt und auf verschiedene Zellkulturschalen verteilt. Daher ist eine möglichst genaue Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer von Bedeutung. Es wurden die vier äußeren Großquadrate der 0,1 mm tiefen Zählkammer ausgezählt.

Um die Zellzahl für ein Quadrat zu ermitteln wurde das gezählte Ergebnis durch vier geteilt, dieses wiederum durch die Eichung mit 10000 multipliziert und die Verdünnung mit Trypanblau mit einer Multiplikation mit zwei herausgerechnet. Hieraus ergibt sich die Zellzahl in einem Milliliter, die dann auf andere Volumina umgerechnet werden konnte.

3.5.5 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Über einen längeren Zeitraum können Zellen in Stickstofftanks bei sehr niedrigen Temperaturen eingefroren werden. Es besteht die Möglichkeit, diese wieder aufzutauen und in ein geeignetes Kulturmedium zu überführen.

Die adhärennten Zellen wurden zum Einfrieren zunächst vom Boden, wie in 3.5.3 beschrieben, gelöst und nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in Einfriermedium bestehend aus 90% FCS und 10%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Pro Kryoröhrchen wurde eine Menge von einem ml Zellsuspension gewählt. In einem speziellen Einfrierbehälter wurden diese über Nacht schrittweise heruntergekühlt. Schließlich schloss sich die Lagerung in flüssigem Stickstoff an.

3.5.6 Herstellung von Zelllysaten

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des NucleoSpin TriPrep-Kits der Firma *MACHERY-NAGEL* nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Zelllysate wurden 350 µl eines gebrauchsfertigen Puffers und 3,5 µl β-Mercaptoethanol gemischt. Nachdem das Medium aus den 6-Well-Platten abgesaugt wurde, wurde der Lysispuffer hinzugegeben. Nach kurzer Inkubationszeit konnten die Zellen mittels Zellschaber gelöst werden. Daraufhin wurde der visköse Puffer mitsamt der abgelösten Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgenommen, eingefroren oder unmittelbar zur RNA-Isolation genutzt.

3.5.7 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Reagenzien aus dem bereits erwähnten Kit durchgeführt. Diese wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zelllysate wurden auf Säulen gegeben, die kleine Membranen enthielten, an denen die Nukleinsäuren hafteten. Durch die zwischendurch durchgeführten Waschschriffe konnten andere Strukturen aus der Membran ausgewaschen werden. Den verschiedenen Waschschriffen schlossen sich ein-bis zweiminütige Zentrifugationen bei 9000 rpm an. Zur Entfernung der DNA am Membranmaterial diente eine spezielle DNase, die auf die Membran gegeben wurde. Nach einem Waschschriff mit RNase-freiem Wasser wurden die RNA-Proben auf Eis gestellt. Zur Ermittlung der RNA-Konzentration, wurde eine

photometrische Messung mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt.

3.5.8 Umschreiben der Proben in cDNA

Um die *Real-Time* PCR durchführen zu können, ist es notwendig, die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben. Für diese cDNA-Synthese bildete das *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* der Firma Roche die Grundlage. Es wurden 250 ng RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Das benötigte Volumen konnte durch die spektrophotometrisch ermittelten RNA-Konzentrationen berechnet werden. Das RNA-Volumen wurde mit dem cDNA-Kit beigefügtem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Jeder Probe wurden anschließend ein Mix aus 1 µl *Oligo-dT* und 2 µl *Random Hexamer* als Primer zugeführt. Anschließend wurde ein Reaktionsgemisch aus 4 µl *Transcription Reverse Buffer*, 0,5 µl *Protection RNase Inhibitor*, 2 µl *Deoxynucleotide Mix* und 0,5 µl *Transcript. Reverse Transkriptase* hergestellt und jeweils 7 µl pro Probe beigefügt, sodass man pro Probe ein Volumen aus 20 µl hatte. Hieran schloss sich eine zweistündige Inkubation im Thermocycler bei 55°C, 85°C und 20°C an. Schließlich konnte die cDNA unmittelbar für eine *Real-Time* PCR verwendet oder bei -20°C eingefroren werden.

3.5.9 Durchführung der Real-Time PCR

Für die *Real-Time* PCR wurde die cDNA sowie der *Fast SYBR Green Master Mix* der Firma *Applied Biosystems* benötigt. Der Master Mix enthielt SYBR Green I Dye, AmpliTaq Fast DNA Polymerase, Uracil-DNA Glycosylase, ROX dye Passive Reference und dNTPs in einem geeigneten Puffer. Insgesamt wurde pro Probe ein Volumen von 10 µl eingesetzt und die PCR in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Pro Well wurden folgende Bestandteile pipettiert:

- 3,5 µl RNase freies Wasser
- 5,0 µl Master Mix
- 0,5 µl Primer
- 1 µl cDNA der jeweiligen Probe

Dabei erfolgte die Messung jeder einzelnen Probe in Doppelbestimmung. Folgende Primer wurden für die *Real-Time* PCR eingesetzt:

Für die NET-Zell-Charakterisierung:

- Chromogranin A (CgA), Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 (SSTR2, 5), Vimentin, E-Cadherin und CXCR-4.

Für die Charakterisierung der Fibroblasten dienten folgende Primer

- FGF1, FGF2, FGF7, HGF, EGF, VEGF-a, IL-8 und SDF-1

Dabei wurde die Expression der einzelnen Gene relativ zu der Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ermittelt.

Durch den gemittelten *Ct*-Wert (*cycle threshold*) der Doppelbestimmung konnte die PCR ausgewertet werden. Dieser Wert gab die Nummer des PCR-Zyklus an, ab wann eine gemessene Fluoreszenz den Schwellenwert überstieg. So konnte die relative Expression des jeweiligen Zielgens im Vergleich zum *housekeeper*-Gen, GAPDH, ermittelt werden.

3.6 Durchführung von Ko-Kultur-Versuchen und konditioniertes Medium

Die Ko-Kultur-Versuche dienten der Untersuchung der Interaktion zwischen NET-Tumorzellen und den Tumorfibroblasten des Tumorstroma. Hierzu wurden die bereits vorgestellten Zelllinien und primären Tumorfibroblasten verwendet.

3.6.1 Ko-Kulturen mit NT-3 und BON Zellen: Expressionsanalyse

Arbeiten mit dem Transwell-System

Mit Hilfe dieser Methode wurde das Expressionsprofil der NT-3 und BON Zellen, die in indirektem Kontakt zu den Fibroblasten waren, untersucht. Zunächst wurden die NET-Zelllinien in Zellkulturschalen, in diesem Fall 6-Well-Platten, ausplattiert, sodass jeder Versuchsdurchgang in Dreifachbestimmung erfolgen konnte. Pro Well wurden 800000 NT-3 und 100000 BON Zellen in RPMI-Medium mit den Zusätzen und ohne Wachstumsfaktoren ausgesät. Ein Volumen von zwei ml pro Well wurde eingehalten. Jeder Versuch erfolgte mit drei biologisch unabhängigen Replikaten.

In die Transwells wurden jeweils 300000 Primärfibroblasten ausplattiert und diese auf ein Volumen von einem ml RPMI-Medium befüllt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel in den Transwells sowie in der 6-Well-Platte durchgeführt und anschließend die Transwells in die 6-Well Platte überführt. Es folgte eine

Inkubationszeit von 48 Stunden und anschließend die Zellyse. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

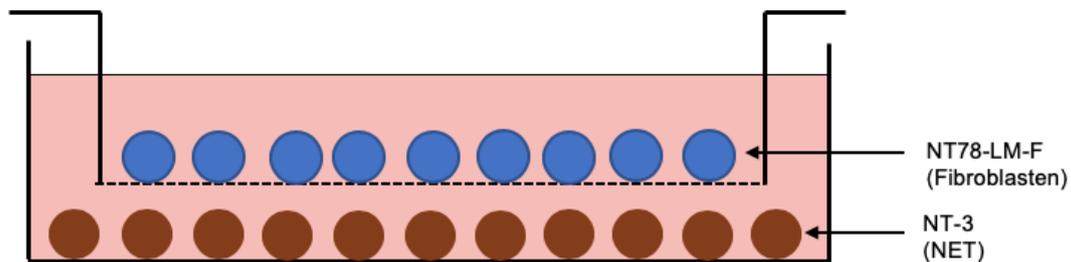


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der Ko-Kultur. Auf ein Well mit NT-3 Zellen wurde ein Transwell mit NT78-LM-F-Zellen aufgesetzt. Ein indirekter Zellkontakt durch eine semipermeable Membran (gestrichelte Linie) wurde somit hergestellt.

Als Kontrolle zu den Ko-Kulturversuchen wurden die NT-3 und BON Zellen ohne Transwells ausplattiert.

Die Erstellung der Zellysate wurde wie in 3.5.6 und die RNA-Isolierung wie 3.5.7 beschrieben.

Wie oben erwähnt wurde anschließend die Umschreibung der RNA in cDNA und die *Real-Time* PCR wie im Abschnitt 3.5.8 und 3.5.9 durchgeführt.

Mittels *GraphPad Prism 8* konnte die Erstellung der Graphiken der Expressionsanalysen durchgeführt werden. Ein statistischer t-Test erfolgte zur Ermittlung eines statistischen Zusammenhanges. Die entsprechenden P-Werte wurden wie folgt kodiert:

P-Wert: < oder = 0,05	*
P-Wert: < oder = 0,01	**
P-Wert: < oder = 0,001	***
P-Wert: < oder = 0,0001	****

3.6.2 Durchführung von Versuchen mit konditioniertem Medium:

Expressionsanalysen

Die Fibroblasten wurden in DMEM-Medium mit 10%igem FCS, 1%igem Penicillin G/Streptomycin in Kultur gehalten. Sobald eine Konfluenz von 50-70% erreicht wurde, erfolgte ein Mediumwechsel auf RPMI-Medium mit den bereits angegebenen Zusätzen und anschließend wurden die Fibroblasten für weitere 48 Stunden inkubiert. Das Medium konnte anschließend steril durch 0,22 µm großen Poren gefiltert werden. Hierbei wurde das konditionierte Medium aus den drei verschiedenen CAF-Kulturen vermischt und mit RPMI-Medium in einem Verhältnis von 1:3 verdünnt. Dieses Medium wurde dann auf die Tumorzellkulturen gegeben und es folgte, wie bereits bei den Ko-Kultur-Versuchen beschrieben, vor der Zelllyse der Tumorzellen eine Inkubationszeit von 48 Stunden.

3.6.3 Proliferations-Assays mit Ko-Kulturen aus CAF

Nachdem, wie oben beschrieben, der Ko-Kultur-Versuch gestartet wurde, wurden die Zellen für insgesamt 120 Stunden inkubiert. Eine Analyse der Zellzahl als Maß für die Proliferation erfolgte durch den Metabolismus von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid in den Zellen (MTT-Assay). Bei den 6-Well-Platten wurde pro Well 100 µl MTT pipettiert, und anschließend eine Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 37°C eingehalten. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und eine Lyse mit DMSO bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Menge des metabolisierten MTT-Reagenzes konnte schließlich durch die Absorption bei 560 nm evaluiert werden.

3.6.4 Proliferations-Assays mit konditioniertem Medium

24 Stunden nach Vorbereitung des konditionierten Mediums werden die Zellen ausplattiert und nach weiteren 24 Stunden das vorbereitete konditionierte Medium den Zellen zugeführt. Da es sich im Gegensatz zur Ko-Kultur hierbei um ein verbrauchtes Medium handelte, war ein Mediumwechsel nach weiteren 48 Stunden obligat. Schließlich erfolgte nach 72 Stunden, wie oben beschrieben, die Zellüberlebens-/proliferations-Analyse mittels MTT.

3.6.5 Versuche zum Therapieansprechen: Proliferations-Assays

Vorbereitung von Everolimus

Zur Evaluation des Therapieansprechens wurde der mTOR-Inhibitor Everolimus in der Zellkultur eingesetzt. Dieser wurde mit DMSO aliquotiert und am Tag der Anwendung

aus einem Stock von 10 mM verwendet. Für die NT-3 Zellen wurde eine Endkonzentration von 10 nM und für die BON Zellen eine Endkonzentration von 50 nM verwendet.

Bei Ko-Kultur Versuchen sowie Versuchen mit konditioniertem Medium wurde die Therapie mit Everolimus 24 Stunden nach Stimulation mit den CAF bzw. dem konditionierten Medium gestartet. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit erneuter Therapie mit Everolimus. Schließlich erfolgte der MTT-Assay und Auswertung nach weiteren 72 Stunden wie bereits in 3.6.3 beschrieben.

3.6.6 Versuche mit STAT3-Inhibitoren

Die beiden Inhibitoren des JAK/STAT Signalweges, Napabucasin und Ruxolitinib, wurden für die Western Blot-Analyse 30 Minuten vor Stimulation mit dem konditionierten Medium zu den NT-3 Zellen in einer Konzentration von 100 nM für Ruxolitinib und 1 µM für Napabucasin zugeführt. Weitere 48 Stunden später, wurde die Lyse durchgeführt.

In den Proliferationsassays, MTT und Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung, wurden die Inhibitoren ebenso 30 Minuten vor Stimulation durch das konditionierte Medium hinzugegeben. 24 Stunden später erfolgte die Behandlung mit Everolimus. Ein erneuter Mediumwechsel und Gabe von konditioniertem Medium sowie Zufuhr von STAT3-Inhibitoren sowie Everolimus erfolgte nach weiteren 48 Stunden. Die Auswertung konnte nach weiteren 72 Stunden durchgeführt werden.

3.6.7 Versuche mit STAT3-siRNA

Zur Verifikation des STAT3-*knockdowns*, wurde zunächst die STAT3-Expression mittels Western-Blot Analyse für drei biologische Replikate der NT-3 Zellen für eine Inkubationszeit von 72 und 120 Stunden nach Zugabe der siRNA ermittelt. Bei der Transfektion in 6-Well Platten werden zunächst 9 µl Lipofektamin zu 150 µl serumfreies DMEM-Medium zugeführt. Separat dazu werden 10 µg siRNA mit 150 µl serumfreies DMEM-Medium vermischt. Anschließend werden die beiden Reagenzien vermischt und für 5 Minuten bei Raumluft inkubiert. Schließlich werden daraus 250 µl vorsichtig und tröpfchenweise pro Well pipettiert. Als Negativkontrolle diente die sogenannte *scrambled RNA*.

Um den Effekt der STAT3-siRNA auf die Proliferation zu ermitteln, wurden MTT-Analysen und Ki-67-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. 24 Stunden nach Zugabe der siRNA, wurde den Zellen das konditionierte Medium zugeführt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde eine Inkubationszeit von 48 Stunden eingehalten. Im MTT-Assay hingegen wurde 24 Stunden nach Stimulation durch das konditionierte Medium eine Therapie mit Everolimus vollzogen. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Zugabe von konditioniertem Medium und Everolimus wiederholt und schließlich der Versuch nach weiteren 72 Stunden ausgewertet.

3.7 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung sollte durch die Zugabe von konditioniertem Medium der Unterschied in der Proliferation der NT-3 Zellen ohne und bei Vorhandensein von konditioniertem Medium aus CAF beurteilt werden. Auch konnten durch diese Methode CAF-Monokulturen mit den Fibroblastenmarkern, α SMA, FSP, FAP und Desmin gefärbt werden.

3.7.1 Ablauf vor der Immunfluoreszenzfärbung

NT-3 Zellen

Zunächst wurden in einer 24-Well Platte 200000 NT-3 Zellen in RPMI-Medium ausplattiert. Insgesamt befand sich in jedem Well ein Volumen von 600 μ l. Nach 24 Stunden wurde das bereits am Vortag der Aussaat vorbereitete konditionierte Medium den Zellen in einem Verhältnis von 1:3 zugeführt. Somit gab es zum Einen den Vergleich zwischen NT-3 in Monokultur und zum Anderen NT-3 in Kombination mit konditioniertem Medium in jeweils vierfacher Bestimmung. Zusätzlich zu den unbehandelten Zellen wurden acht weitere Wells mit Everolimus 10 nM behandelt. So wurden insgesamt 16 Wells pro biologisches Replikat ausgesät. Die Behandlung mit Everolimus erfolgte 24 Stunden nach Stimulation mit konditioniertem Medium. 48 Stunden nach der Behandlung erfolgte der Fixierungsprozess mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA). Ko-Kultur-Versuche waren aus technischen Gründen nicht möglich, da die NT-3 Zellen unter den Transwells in der 24-well Platte nicht überlebten.

Fibroblastenmarker

Es wurden 200000 Fibroblasten pro Well in eine 24-Well Platte in DMEM-Medium ausplattiert. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden. Nach weiteren 48 Stunden Inkubationszeit erfolgte der Fixierungsprozess.

3.7.2 Fixierung von Zellen auf dem Boden einer 24-Well Platte

Um den Färbungsprozess zu beginnen, sollten die auf dem Boden angewachsenen Zellen in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Die Inkubationsdauer hierfür betrug zehn Minuten. Nach einem dreiminütigen Waschvorgang in PBS, konnte die mit PBS befüllte Platte bei 4°C gelagert oder unmittelbar zur Färbung genutzt werden.

3.7.3 Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung in einer 24-Well Platte

Nach Fixierung der Zellen mittels 4%igem PFA erfolgte ein Blockierungsschritt, der eine spezifische Bindung des ersten Antikörpers gewährleistete. Dieser wurde mit 10%igem bovines Serumalbumin (BSA) in PBS und 0,1%igem Tween-20 für insgesamt 30 Minuten durchgeführt. Nach Abnahme der Blocklösung konnte der erste Antikörper zugegeben werden. Zur Verdünnung des Antikörpers in einem Verhältnis von 1:100 wurde 1%iges BSA in PBS und 0,1%igem Tween genutzt. Als Antikörper für die NT-3 Zellen wurde der Proliferationsmarker Ki-67 verwendet, der gegen humane Zellen gerichtet war. Als Fibroblastenmarker dienten die Antikörper α SMA, FSP, FAP und Desmin. Diese waren ebenfalls gegen humane Zellen gerichtet.

Weiterhin schlossen sich der einstündigen Inkubation der Erstantikörper drei Waschschriffe mit 0,1%igem BSA in PBS und 0,1%igem Tween-20 für jeweils 3 Minuten an. Um die Antikörperfärbungen fluoreszenzmikroskopisch darzustellen, wurde ein ALEXA-555-gekoppelter zweiter Antikörper für die NT-3 Zellen und ein ALEXA-488-gekoppelter Zweitantikörper für die CAF verwendet. Dieser wurde ebenso in 1%igem BSA in PBS und 0,1%igem Tween-20 1:400 verdünnt und für 30 Minuten inkubiert. Nach weiteren drei Waschvorgängen mit 0,1%igem BSA gelöst in PBS und 0,1%igem Tween erfolgte die Zugabe von 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) in einem Verhältnis von 1:1000. Schließlich konnte das Well nach Zugabe von Eindeckmedium mit einem runden Deckgläschen versehen werden.

Schließlich wurde zur Auswertung der Färbung das bereits beschriebene Mikroskop verwendet. Es wurde jeweils eine Aufnahme gemacht, die die mit DAPI gefärbten

Zellkerne darstellt. Außerdem wurde in einem weiteren Foto die spezifische Färbung der Antikörper aufgenommen. Die Kanäle waren hiermit ALEXA-546, ALEXA-459 und DAPI. Die DAPI-Färbung erschien blau, während die spezifischen je nach Zweitantikörper, bei ALEXA-555, rot und, bei ALEXA-488, grün erschienen. Schließlich wurden aus diesen Fotos *overlay*-Bilder erstellt, sodass die spezifischen Färbungen in Relation zu den einzelnen mit DAPI-gefärbten Zellen gebracht werden konnten.

3.8 Proteinanalytische Methoden

Für die Versuche mittels Western Blot wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Pro Well wurden 800000 NT-3 und 100000 BON Zellen ausplattiert.

3.8.1 Lyse von Zellen

Zunächst erfolgte die Zellyse mittels Triton X-100 Lysis-Puffer. Dadurch wurden die Zellmembranen sowie Zellkerne und weitere Organellen aufgelöst. Anschließend werden durch die Zentrifugation die Reste der Zellmembran entfernt.

Als Erstes erfolgte die Zubereitung des Lysispuffers. Zu einem ml Lysispuffer mit 50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glyzerin, 5 mM EDTA pH 8,0 und 1% Triton X-100 wurden 2 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Phenylmethylsulfonyl (PMSF), 10 µg/ml Natriumfluorid, 10 µg/ml Benzamidin und 1 µg/ml Leupeptin zugeführt. Pro Well reichten 150 µl Puffer aus. Ähnlich der RNA-Lyse, wurden die Zelle mit einem Zellschaber von dem Boden gelöst, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis gestellt. Nun konnten die Proben bei -20°C gelagert oder zur Sonifikation für 30 Minuten bei 11000 rpm und 4°C zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand, der die zytosolischen und membranständigen Proteine enthielt, in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

3.8.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Pierce BCA Protein Assay Kit“ verwendet. Dieser ist in 96-Well-Mikrotiterplatten durchführbar. Hierbei galt eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe als Standard (0 µg-2500 µg Protein/ml).

3.8.3 Proteinbestimmung

Nachdem die Standardkurve aus BSA und destilliertem Wasser zu den Konzentrationen 0 µg bis 2500 µg pipettiert wurde, galt es bei den NT-3 Zellen aus den zentrifugierten Proben 10 µl pro Well zu pipettieren. Da es sich bei den BON meist um höhere Zellzahlen handelte, wurden ihre Lysate in einem Verhältnis von 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dazu wurde pro Probe eine Doppelbestimmung erstellt. Anschließend erfolgte die zügige Zugabe des Reaktionsgemisches von 200 µl. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die photometrische Messung bei 560 nm mittels ELISA Reader.

3.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichten die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht, indem es die Oberfläche der Proteine gleichmäßig mit negativer Ladung besetzt, sodass eine Auftrennung der Proteine allein nach Molekulargewicht und nicht nach Aminosäurezusammensetzung und Eigenladung der verschiedenen Proteine ermöglicht wird. Je nach Molekulargewicht der einzelnen zu detektierenden Proteine wurden in dieser Arbeit vorwiegend 12,5%ige Gele gegossen.

3.8.5 Gellauf

Der Gellauf erfolgte in einer Laufkammer, die mit entsprechendem Laufpuffer befüllt wurde. Bei Gelen mit 10 Taschen wurde in die erste Tasche 5 µl des Proteinmarkers *PageRuler Prestained Protein Ladder* pipettiert. Anschließend wurden die Proben in der gewünschten Reihenfolge in die jeweiligen Taschen mit 20 µl Volumen zugeführt. Der Gellauf wurde mit einer Spannung von 100 Volt gestartet, bis alle Proben eine Linie bildeten. Im Anschluss wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht. Damit dauerte dieser Abschnitt ungefähr 1,5 Stunden.

3.8.6 Blotting: Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese erfolgte mit Transblot-SD Puffer für eine Stunde bei 300 mA. Hierfür wurden in einer Kammer, die mit Schwämmen und Filterpapieren abgepolstert wurde, das Gel und die Membran aneinander geführt. Während des Vorganges wurde die Kammer auf Eis gestellt.

3.8.7 Immundetektion

Nach Beschriftung der entsprechenden Nitrozellulosemembran wurden die Proteine durch ein antikörpergekoppeltes Detektionsverfahren sichtbar gemacht. Beim ersten Schritt ging es darum, dass die Proteine durch einen spezifischen Antikörper erkannt werden, der wiederum beim zweiten Schritt durch einen zweiten Antikörper, der an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, erkannt wird. Vor Gabe des ersten Antikörpers war eine 30-minütige Inkubation der Nitrozellulosemembran in Blocklösung, nämlich 5%ige Milch gelöst in TBS, notwendig. Anschließend erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers über Nacht bei 4°C je nach Antikörper entweder in 5%iger Milch oder BSA. Die hier verwendeten Antikörper wurden zu einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt, GAPDH jedoch zu 1:5000. Am nächsten Morgen folgte nach einem dreimaligen Waschschrift in TBS-T zu je fünf Minuten die Inkubation des zweiten Antikörpers in Milch in einem Verhältnis von 1:2000, bei GAPDH ebenso 1:5000. Nach erneutem dreimaligen Waschschrift folgte eine Lumineszenzreaktion der enzymatischen Aktivität, durch die die Antigenbanden detektiert werden konnten. Diese Reaktion erfolgte mit dem „ECL-Kit“. Dabei wurden die beiden Reagenzien des Kits 1:1 vermischt und ein Volumen von einem ml zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation, bei GAPDH einminütig, wurde die Membran zur Detektion mittels Imager in eine Klarsichtfolie gelegt.

3.9 ***Tissue-Microarray-Analyse***

3.9.1 Gewebekollektiv

Insgesamt standen 242 NET- und NEC-Proben für die TMA-Analyse zur Verfügung. Die NET und NEC entstammen aus der Lunge, dem Pankreas und dem weiteren Gastrointestinaltrakt, wie Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Appendix, Colon, Rektum, Gallenblase, Papilla Vateri sowie Meckel-Divertikel. Es wurden nicht nur NET-Primarii, sondern auch 25 NET- und NEC-Metastasen untersucht.

3.9.2 TMA-Herstellung

Mit Hilfe des *Tumor-Microarray*-Verfahrens gab es die Möglichkeit, zahlreiche Gewebezyylinder von histologisch definierten Regionen verschiedener NET- und NEC Tumoren in einen einzigen Paraffinblock einzubringen. Der Vorteil besteht im geringen Materialverbrauch. Dieser TMA wurde uns vom Institut für Pathologie des

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) zur Verfügung gestellt und es erfolgte eine immunhistochemische Färbung bestimmter Antikörper durch das TMA-Labor des UKE.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

- Synaptophysin
- Chromogranin A
- Ki-67
- pSTAT3
- STAT3

3.9.3 TMA-Auswertung

Bei Synaptophysin und Chromogranin A wurde jeweils zwischen stark, schwach positiven und negativen Gewebespots unterschieden. Für pSTAT3 und STAT3 wurde sowohl die Intensität als auch die Anzahl der gefärbten Zellkerne ermittelt. Für Ki-67 wurden ebenso die gefärbten Zellkerne gezählt.

Mittels *GraphPad Prism 8* erfolgte die Auswertung der einzelnen Parameter. Es wurde jeweils eine Korrelation zwischen CgA und pSTAT3 sowie SSTR2 und pSTAT3 vollzogen. Auch wurden die einzelnen verschiedenen NET und NEC hinsichtlich der STAT3 und p-STAT3 Expression analysiert und mit Ki-67 korreliert. Schließlich konnte eine Analyse zur Unterscheidung in der Expression von pSTAT3 zwischen einzelnen Organen und zwischen Primarius und Metastasen durchgeführt werden.

4 Ergebnisse

4.1 CAF Phänotyp in NET

Eine Charakterisierung der CAF in NET ist bisher nicht erfolgt. Daher sollte in einem ersten Schritt der Phänotyp und die Verteilung von CAF im Tumorprimarius und seinen korrespondierenden Lebermetastasen immunhistochemisch untersucht werden.

4.1.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an humanem NET-Gewebe

Bei α SMA und FSP handelt es sich um zytoplasmatische Proteine, die als Marker für Fibroblasten etabliert sind. Die spezifisch gefärbten Zellen stellen sich in brauner Farbe in den fibrotischen Tumorstromasepten sowie auch disseminiert zwischen einzelnen Tumorzellen dar.

Die Serienfärbungen des NET-Gewebes beinhalteten Schnitte von neun Patienten, jeweils mit Gewebe aus dem NET-Primarius sowie aus einer korrespondierenden NET-Lebermetastase desselben Patienten. Diese wurden mit den oben genannten Antikörpern spezifisch gefärbt.

Immunhistochemie: α SMA

Die Abbildung 4.1 stellt eine Übersicht über α SMA jeweils im Primarius als auch in der zugehörigen Lebermetastase für zwei Patienten in 10er und 20er Vergrößerung dar. Die Ermittlung der α SMA-positiven Zellen gelang durch Berechnung der α SMA-gefärbten Fläche im jeweiligen Gewebeschnitt. Die ermittelten Flächen wurden anschließend graphisch dargestellt. Abbildungen 4.1.1-E und 4.1.2-E zeigen den Vergleich zwischen α SMA -positiven Zellen im Primarius und der korrespondierenden Lebermetastase für jeweils einen Patienten. Diese wurde anschließend statistisch ausgewertet.

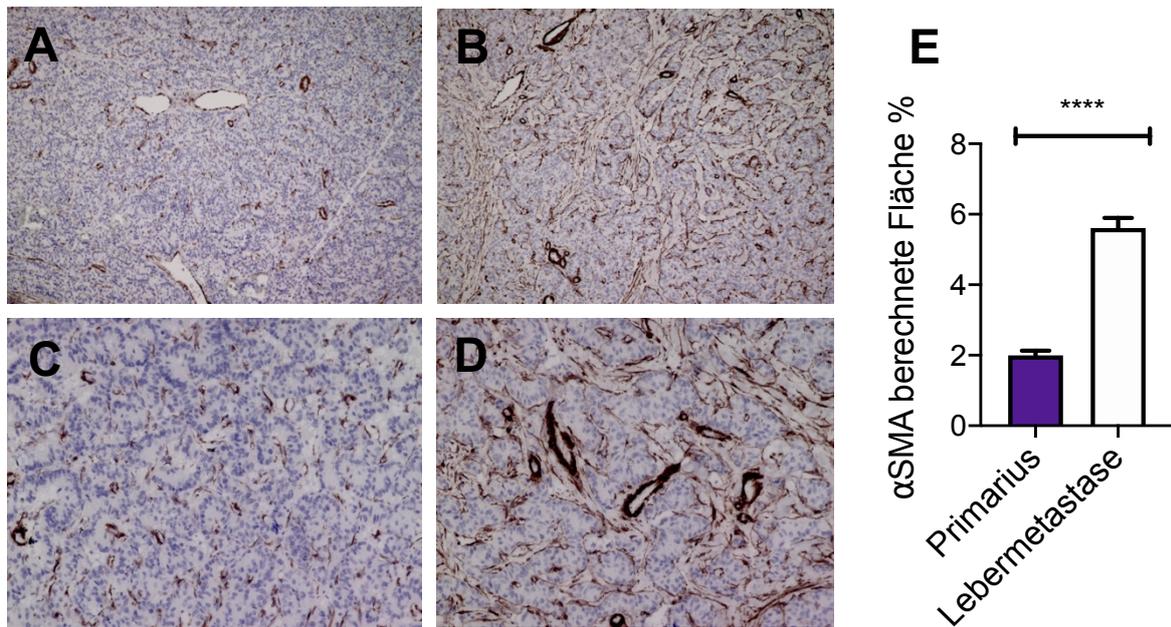


Abbildung 4.1.1: Übersicht über die α SMA-Färbung für einen Patienten im Primarius (A, C) und in einer Lebermetastase (B, D). A und B: 10er Vergrößerung; C und D: 20er Vergrößerung. E: Quantifizierung der α SMA-positiven Zellen durch Kalkulation der spezifisch immunhistochemisch gefärbten Fläche (%). Auswertung von insgesamt n= 10 Tumorgewebearealen, **** p<0,0001

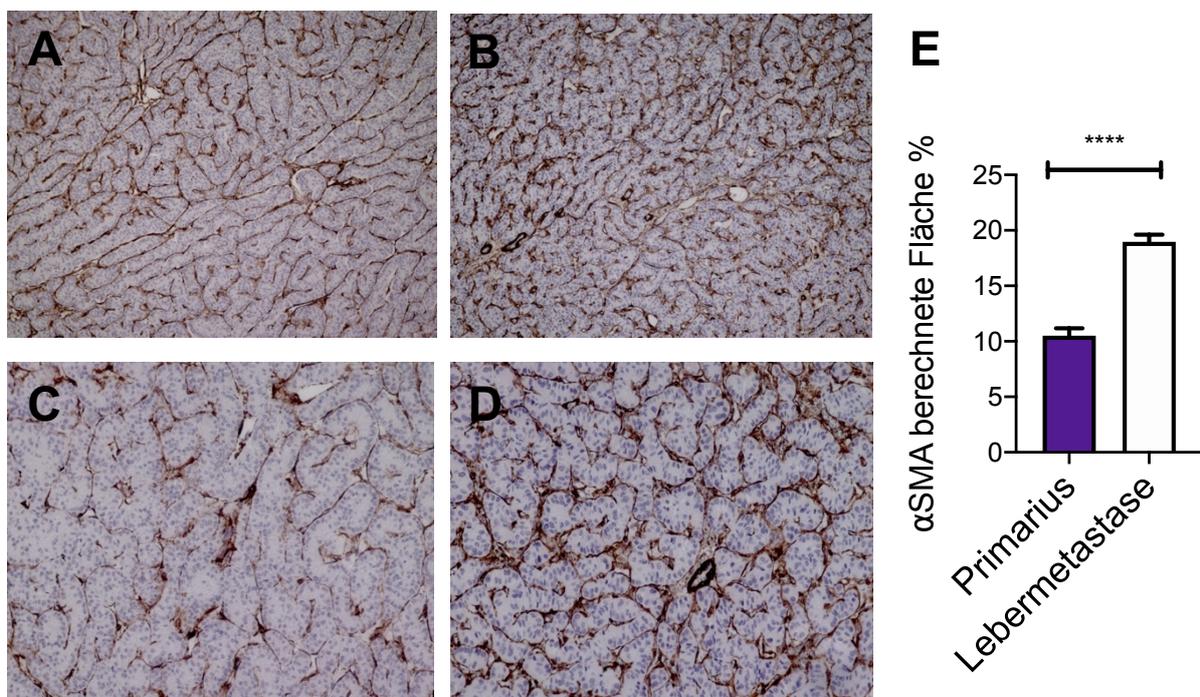


Abbildung 4.1.2: Übersicht über die α SMA-Färbung für einen Patienten im Primarius (A, C) und in einer Lebermetastase (B, D). A und B: 10er Vergrößerung; C und D: 20er Vergrößerung. E: Quantifizierung der α SMA-positiven Zellen durch Kalkulation der spezifisch immunhistochemisch gefärbten Fläche (%). Auswertung von insgesamt n= 10 Tumorgewebearealen, **** p<0,0001

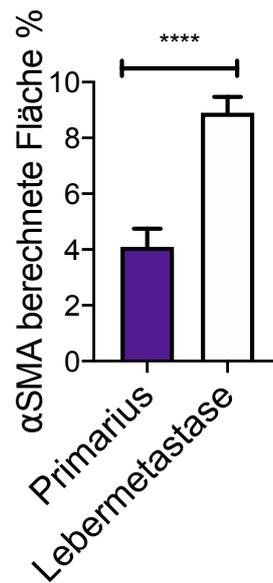


Abbildung 4.1.3: Quantifizierung der α SMA-positiven Zellen durch Kalkulation der spezifisch immunhistochemisch gefärbten Fläche (%). Auswertung von insgesamt n= 10 Tumorgewebearealen bei jeweils neun Primarii und einer korrespondierenden Lebermetastasen, **** $p < 0,0001$

Betrachtet man das Färbemuster von α SMA, lässt sich feststellen, dass bei den meisten der neun Patienten die Lebermetastasen eine signifikant höhere Expression von α SMA im Vergleich mit dem Primarius haben. Dahingegen zeigte einer der neun Patienten ein genau entgegengesetztes Färbemuster, bei dem die Lebermetastase eine geringere Expression von α SMA zeigte (Abbildung nicht gezeigt). Die α SMA-Färbung zeigt eine spezifische Färbung der Fibroblasten im Tumorgewebe, sowohl disseminiert zwischen den Tumorzellen, als auch in den Tumorstromasepten.

Immunhistochemie: FSP

Die Abbildung 4.2 stellt eine Übersicht über die FSP-Färbung eines Patienten in 10er und 20er Vergrößerung dar.

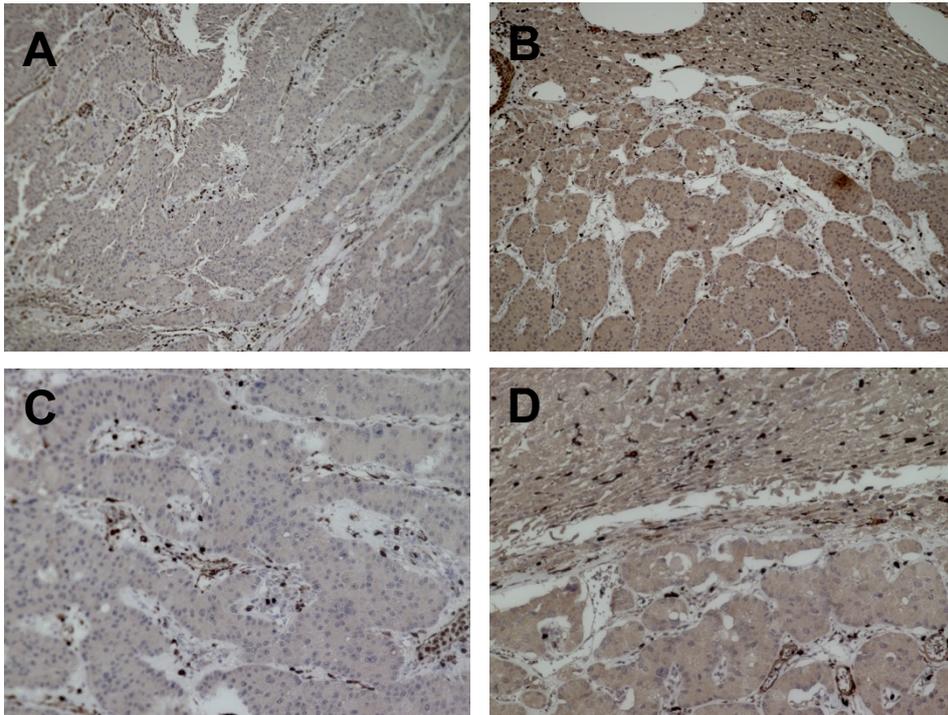


Abbildung 4.2: Übersicht über die FSP-Färbung für einen Patienten im Primarius (A, C) und in einer Lebermetastase (B, D). A und B: 10er Vergrößerung; C und D: 20er Vergrößerung

Die Färbung mittels FSP zeigte zum Einen eine diffuse geringe Färbung der Tumorzellen und eine starke Färbung von einzelnen morphologisch eher myeloiden Zellen im Tumorstroma. So konnte keine morphologische Korrelation mit Fibroblasten und damit keine spezifische Auswertung der Färbung erfolgen.

4.1.2 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung der CAF in NET

Zur weiteren Phänotypisierung der CAF wurden isolierte CAF in Zellkultur untersucht. Hier erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung von den CAF-Markern α SMA, FSP, FAP und Desmin. Während α SMA, FSP und FAP eine hohe Positivität aufweisen und die meisten Zellen diese exprimieren, war Desmin nur gering exprimiert. Dieses Ergebnis konnte für drei verschiedene CAF-Kulturen aus Lebermetastasen pankreatischer NET gezeigt werden.

Abbildung 4.3 stellt eine Übersicht über die 4 Marker bei einer CAF-Kultur, NT86-LM, dar.

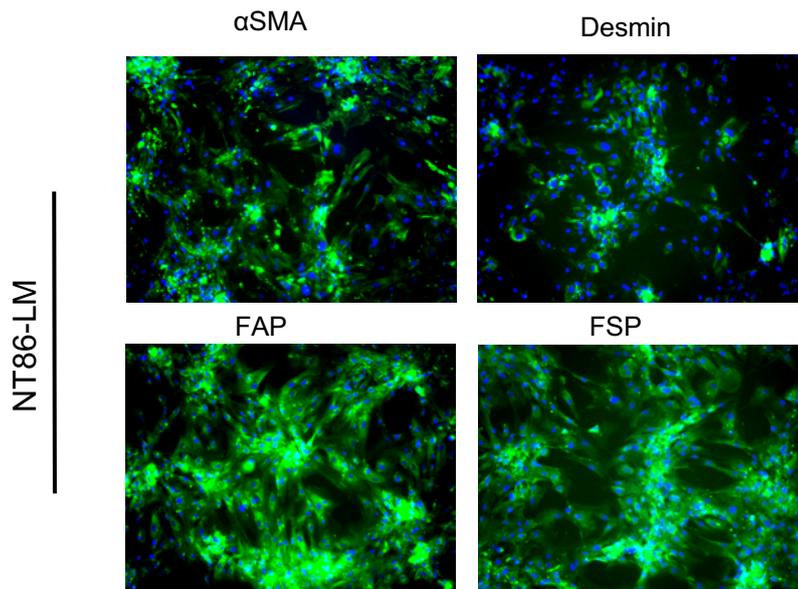


Abbildung 4.3: Fibroblastenmarker (α SMA, Desmin, FAP, FSP) der Zellpräparation NT86-LM, einer Fibroblasten-Kultur aus Lebermetastasen pankreatischer NET.

4.1.3 Expressionsanalysen mittels qPCR

Für die weitere Charakterisierung der CAF sollten sezernierte Faktoren, die eine mögliche Wirkung auf die NET haben könnten, identifiziert werden. Als Erstes sollte das basale Expressionsprofil von verschiedenen CAF-Kulturen untersucht werden. Dabei war der Vergleich zwischen CAF aus dem NET-Primarius als auch aus den Lebermetastasen von Bedeutung. Mittels qPCR wurden verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine jeweils für drei verschiedene CAF Kulturen aus den Lebermetastasen als auch aus dem Primarius analysiert.

Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die an bestimmte Oberflächenrezeptoren von Zellen binden und so für Zellproliferation und -differenzierung sorgen.

EGF, *epidermal growth factor*, zuerst in 1986 vom Nobelpreisträger Stanley Cohen beschrieben (Murphy 1998), wird einerseits von den Fibroblasten ausgeschüttet und wirkt wachstumsfördernd auf die Tumorzellen. Andererseits wird es auch von Tumorzellen ausgeschüttet, wirkt damit parakrin auf Fibroblasten und aktiviert diese dazu, weitere Wachstumsfaktoren für die Tumorphiliferation auszuschütten (Paraiso and Smalley 2013).

FGF, *fibroblast growth factor*, bildet eine Familie aus 22 Untergruppen. Diese binden an Oberflächenrezeptoren und stimulieren Zellen zur Zellproliferation, Migration und Differenzierung (Hay 1995; Ornitz and Sannes 2006). In diesem Projekt wurden die drei Untergruppen, FGF1, FGF2 und FGF7 untersucht.

Darüber hinaus wird HGF, *hepatocyte growth factor*, von Stromazellen ausgeschüttet und sorgt in epithelialen Zellen für Zellproliferation, Motilität und Angiogenese (Nakamura and Mizuno 2010; Tamura et al. 1993).

VEGF, *vascular endothelial growth factor*, eine Familie aus sezernierten Polypeptiden, ist involviert in Angiogenese. Vor allem VEGF-a sorgt für eine erhöhte Blutgefäßbildung (Holmes and Zachary 2005).

IL-8, *interleukin 8*, bezeichnet ein Interleukin und Chemokin der Neutrophilen und ist somit an Prozessen der Inflammation beteiligt. Auch wurde es bereits erhöht in tumorösen Prozessen beschrieben (Cao et al. 2005).

SDF-1, *stromal cell-derived factor 1*, auch als CXCL12, *chemokine ligand 12*, bezeichnet, ist ein Chemokin, was Stammzellmotilität, Neovaskularisation und Angiogenese vermittelt (Burns et al. 2006).

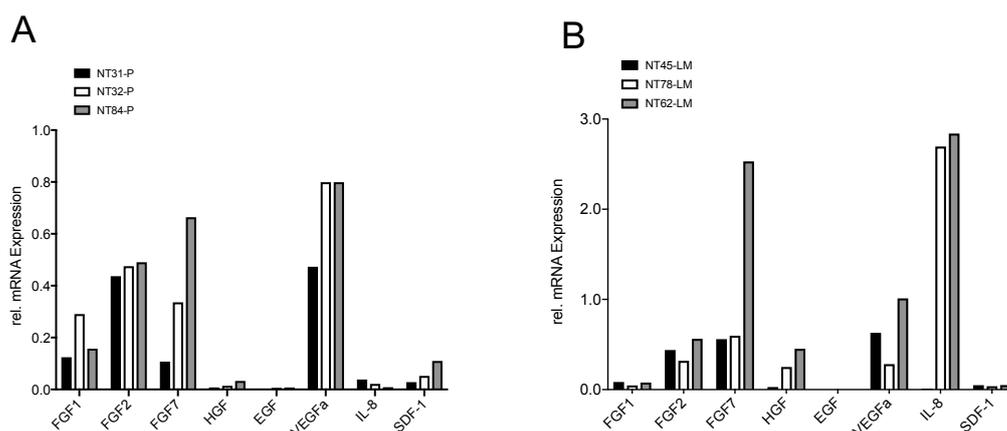


Abbildung 4.4: relative mRNA Expression verschiedener Wachstumsfaktoren und Interleukine in CAF-Kulturen A: aus dem Primarius, B: aus den Lebermetastasen.

Abbildung 4.4 zeigt, dass EGF und SDF-1 sowohl bei den CAF aus den Lebermetastasen als auch aus den CAF des Primarius niedrig exprimiert ist.

FGF zeigt in den verschiedenen Fibroblasten-Kulturen unterschiedliche Expressionen. Vor allem FGF2 weist eine hohe Expression in allen drei CAF Kulturen aus Primarius und Lebermetastasen auf. Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass es keinen

Unterschied in der Expression zwischen Primarius und Metastasen gibt (Abbildung 4.4).

Dahingegen zeigt HGF eine etwas höhere Expression in den CAF aus den Lebermetastasen als im Primarius.

Eine deutlich höhere Expression in den CAF aus den Lebermetastasen im Vergleich zu denen aus dem Primarius lässt sich für IL-8 feststellen. Jedoch lässt sich dieses Ergebnis nicht in allen drei Kulturen wiederfinden.

Schließlich zeigt auch VEGF-a keinen Unterschied zwischen Primarius und Metastasen, die Expression ist jedoch zu erkennen (Abbildung 4.4)

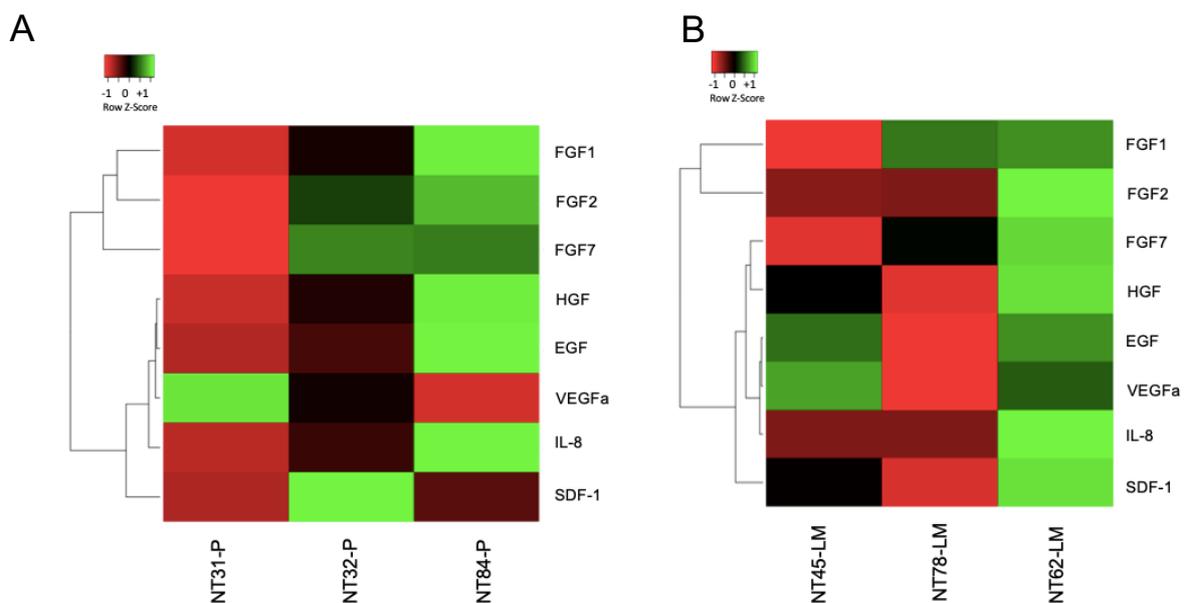


Abbildung 4.5: Heatmaps veranschaulichen das Expressionsprofil von drei verschiedenen CAF-Kulturen jeweils aus dem Primarius (A) und Lebermetastasen (B) pankreatischer NET hinsichtlich verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Grün: hohe Expression; rot: niedrige Expression

Insgesamt veranschaulichen die Heatmaps (Abbildung 4.5), dass es keine einheitlichen Ergebnisse innerhalb der einzelnen Gruppen aus Primarius (Abbildung 4.5-A) und Lebermetastasen (Abbildung 4.5-B) gibt. Einzelne CAF zeigen hinsichtlich mehrerer Faktoren eine hohe Expression (NT84-P, NT62-LM), andere dagegen eher niedrige Expressionen hinsichtlich verschiedener Faktoren (NT31-P, NT78-LM) (Abbildung 4.5).

4.2 Expressionsprofil der NET

In diesen Versuchen wurden die NET-Zelllinien, NT-3 und BON, in indirektem Kontakt mit den CAF oder deren Medium, sprich konditioniertes Medium, gebracht. Ziel war es, den Einfluss von Fibroblasten - und damit einem Zellbestandteil des Tumorstromas - auf die NET hinsichtlich des Expressionsprofils zu evaluieren.

4.2.1 Expressionsprofil von NT-3 und BON durch konditioniertes Medium

Mittels qRT-PCR konnten Differenzierungsmarker von NET analysiert werden.

Chromogranin A (CgA), ist ein Protein neuroendokriner Tumoren, das in sekretorischen Granula aufzufinden ist und für eine gute Differenzierung von NET steht (Nobels et al. 1997). Eine signifikante Herunterregulation von CgA findet sich bei BON Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium (Abbildung 4.7-A). Es zeigt sich im Gegensatz hierzu keine verminderte Expression bei NT-3 Zellen (Abbildung 4.6-A).

Somatostatinrezeptoren, SSTR, fungieren als Rezeptoren von Somatostatin, einem Polypeptidhormon, das im gastrointestinalen Trakt (GI-Trakt), vor allem im Pankreas, gebildet wird und eine hemmende Wirkung auf die Sekretion gastrointestinaler Hormone zeigt. Eine vermehrte Expression von SSTR korreliert somit mit einer erhöhten Differenzierung von NET. Es setzt sich zusammen aus fünf Subtypen, SSTR1 bis 5 (Stenger, Frilling, and Broelsch 1997). Auch hier zeigt sich eine signifikant verminderte Expression des Somatostatin-Rezeptors 2 in den BON-Zellen nach Stimulation mit konditioniertem Medium (Abbildung 4.7-A), während es bei den NT-3 Zellen eine verminderte Expression zeigt, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 4.6-A). Dahingegen zeigt sich beim SSTR5 ebenso eine Herunterregulierung bei den BON Zellen (4.7-A), jedoch eine erhöhte Expression bei NT-3 Zellen durch konditioniertes Medium (Abbildung 4.6-A)

CXCR4, *chemokine receptor type 4*, ist ein Transmembranprotein, das durch die Bindung von SDF-1 aktiviert wird und für Zellmigration und De-Differenzierung sorgt (Hesselgesser et al. 1998). Abbildung 4.6-B zeigt eine starke Hochregulation der Expression nach Stimulation der NT-3 Zellen mit konditioniertem Medium, während das konditionierte Medium keinen Effekt auf die BON Zellen zeigt (Abbildung 4.7-B).

E-Cadherin, ist ein Protein des Zytoskelets und ist für die Zell-Zell-Adhäsion von Bedeutung (Larue et al. 1994; Tunggal et al. 2005). Durch Verlust des E-Cadherins, und damit der interzellulären Adhäsion, wird die zuvor beschriebene EMT induziert (Sánchez-Tilló et al. 2010). In der Analyse der EMT bei NT-3 und BON Zellen durch konditioniertes Medium konnte jedoch eine signifikante Überexpression des E-Cadherins festgestellt werden (Abbildung 4.6-B), während es bei den BON Zellen zu keiner signifikanten Veränderung kam (Abbildung 4.7-B).

Vimentin ist ein Intermediärfilament, welches im Prozess der EMT hochreguliert wird (Ivaska 2011). Dieses Phänomen findet sich in der Kombination aus NT-3 und konditioniertes Medium, nicht jedoch bei BON Zellen, bei denen es herunterreguliert wird (4.6-B und 4.7-B).

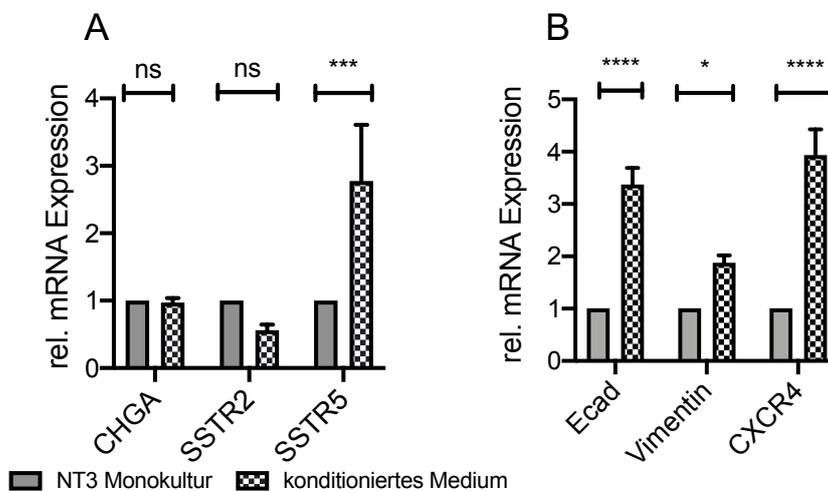


Abbildung 4.6: Expressionsprofil der NT-3 Zellen hinsichtlich A: Differenzierungs- und B: EMT Marker nach Zugabe von konditioniertem Medium, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, ns=nicht signifikant

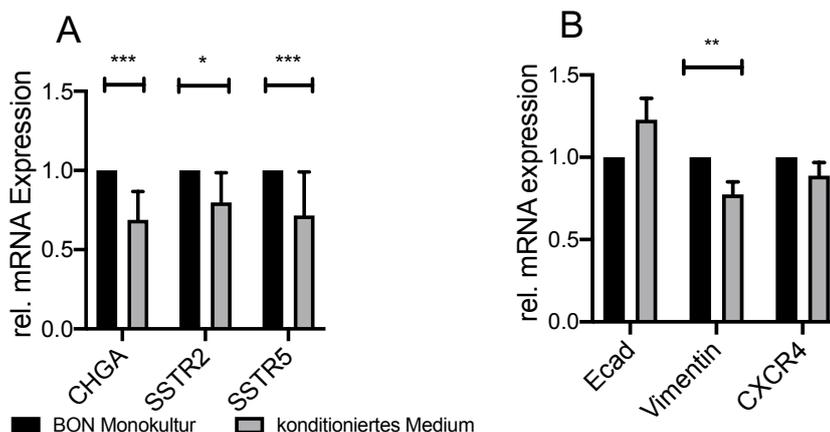


Abbildung 4.7: Expressionsprofil von BON Zellen hinsichtlich A: Differenzierungs- und B: EMT-Marker nach Zugabe von konditioniertem Medium, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, ns=nicht signifikant

4.2.2 Expressionsprofil von BON durch Ko-Kultur

Um den Effekt der Ko-Kultur auf NET zu analysieren, wurden die BON Zellen für die Versuche herangezogen. Hier konnte nur eine Verminderung der CgA-Expression festgestellt werden (Abbildung 4.8-A). Ein signifikantes Ergebnis lässt sich auch hinsichtlich der erhöhten CXCR4-Expression finden (Abbildung 4.8-B).

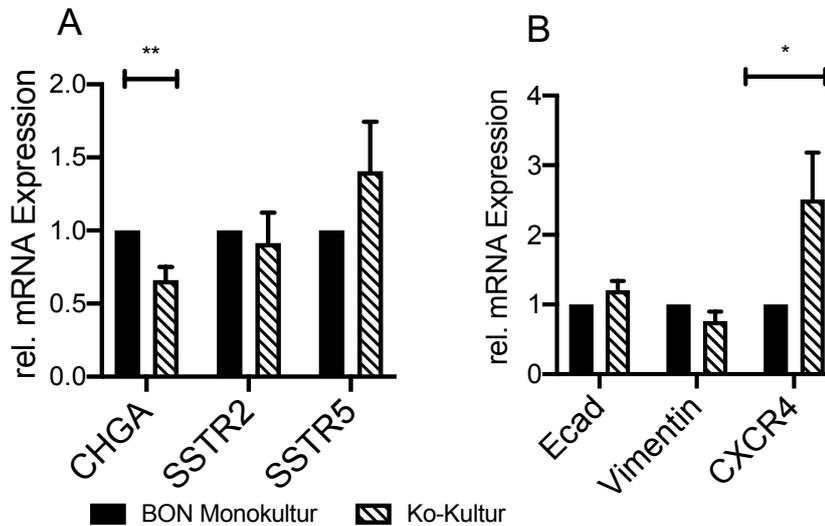


Abbildung 4.8: Expressionsprofil von BON Zellen hinsichtlich A: Differenzierungs- und B: EMT-Marker nach Stimulation durch CAF-Ko-Kultur, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$

4.3 Einfluss der CAF auf die Proliferation der NET

Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit ist es, Veränderung der Zellproliferation von NET-Zellen durch Stimulation mit Fibroblasten zu untersuchen. In den folgenden Experimenten zur Analyse der Proliferation sowie des Therapieansprechen wurden Versuche nur mit NT-3 Zellen durchgeführt, da sich in den Vorversuchen kein Einfluss auf die Proliferation der BON Zellen zeigte.

4.3.1 Effekt des konditionierten Mediums auf die Proliferation

Eine Inkubation von NT-3 Zellen mit konditioniertem Medium über 120 Stunden im Vergleich zur Kontrolle zeigt eine auf das 1,5-fache erhöhte Zellzahl (Abbildung 4.9-A). Einen Effekt auf BON Zellen konnte nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Ein von Gerdes et al. zuerst in proliferierenden Zellen beschriebenes, nukleäres Protein, Ki-67, nutzten wir auch in unseren Versuchen zur Detektion der Proliferationsrate mittels Immunfluoreszenzfärbung (Gerdes et al. 1983). Ergebnisse

der Immunfluoreszenzfärbung von Ki-67 zeigten eine dreifach erhöhte Ki-67-Positivität der NT-3 Zellen bei Vorhandensein von konditioniertem Medium im Vergleich zur Kontrolle aus NT-3 Monokultur (Abbildung 4.9-B).

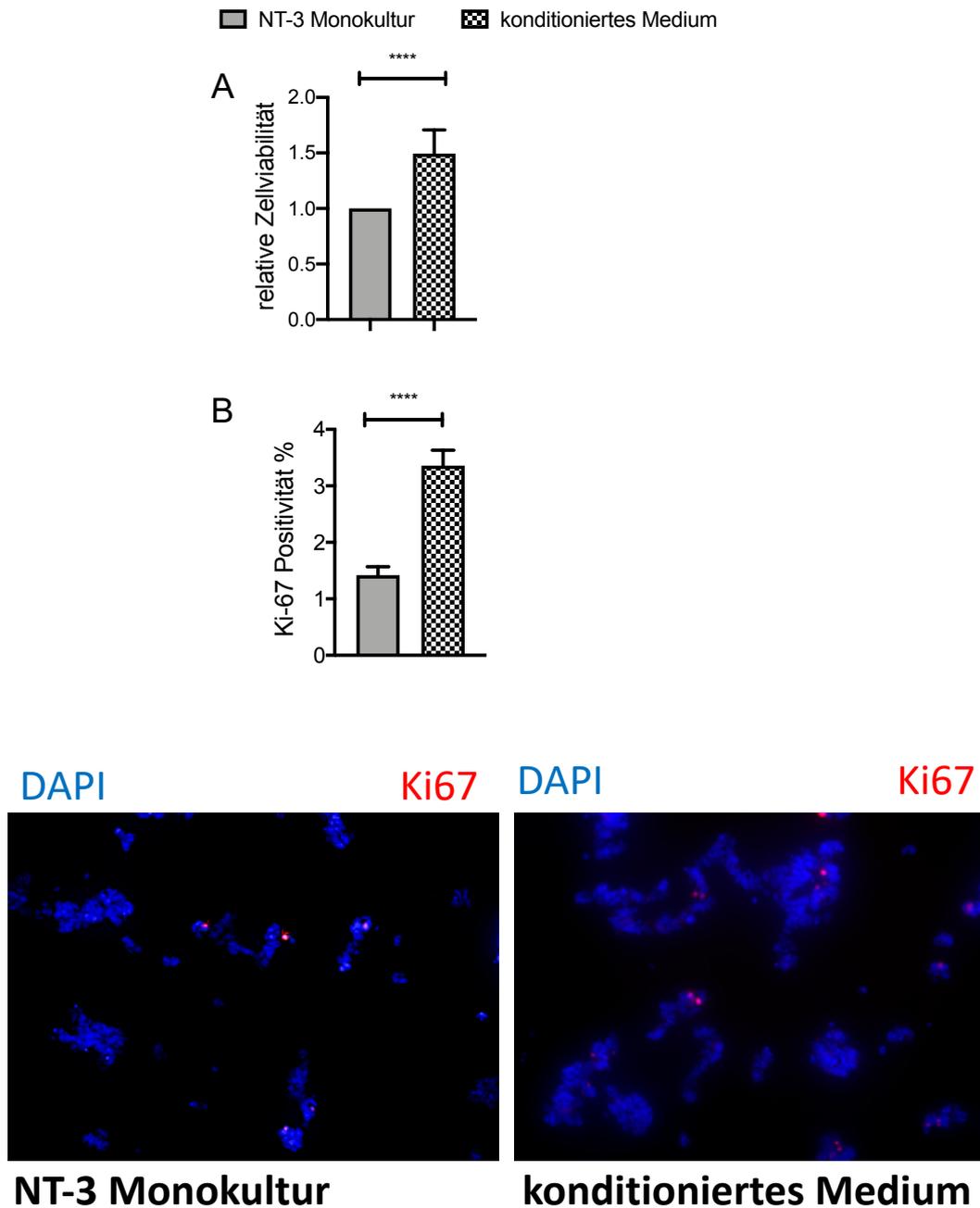


Abbildung 4.9: A: Zellviabilität durch konditioniertes Medium im MTT-Assay; B: Ki-67-Positivität in % nach Zugabe von konditioniertem Medium, **** $p < 0,0001$

4.3.2 Proliferation von NT-3 Zellen durch indirekte Ko-Kultur

Abbildung 4.10 zeigt eine höhere Zellzahl der NT-3 Zellen von 30% durch die Ko-Kultur im Vergleich zur Monokultur.

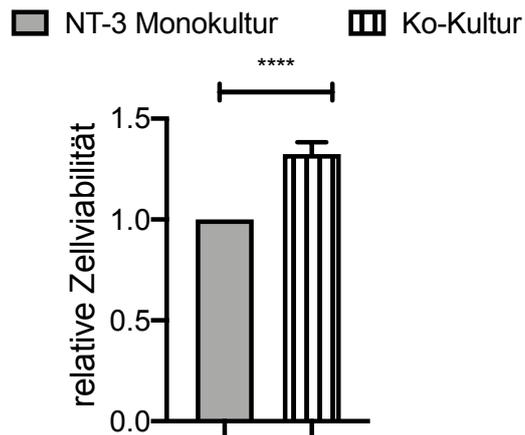


Abbildung 4.10: Zellviabilität der NT-3 Zellen im MTT-Assay nach Stimulation durch indirekte Ko-Kultur, **** $p < 0,0001$

Um dem Einfluss der indirekten Ko-Kultur mit CAF auf NT-3 mittels Ki-67 Immunfluoreszenz zu erforschen, war ein Ausplattieren der Zellen in 24-Well-Platten notwendig. Hier zeigte sich nach dreimaliger Durchführung des Versuches eine verminderte Zelldichte unmittelbar unter dem Transwell, während an den Rändern der jeweiligen Wells eine höhere Zelldichte von NT-3 zu erkennen war. Diese technische Problematik ließ keine aussagekräftige Analyse der indirekten Ko-Kultur auf den Proliferationsindex zu.

4.3.3 Analyse der Rb-Phosphorylierung in NT-3 Zellen

Retinoblastom, Rb, ist ein Tumorsuppressor und sorgt durch seine Bindung an E2F für eine Herunterregulierung des Zellzyklus. Gehemmt wird es durch Phosphorylierung durch Kinasen, wie *cyclin-dependent kinases* (CDK4, CDK6 und CDK2). Durch Hyperphosphorylierung kommt es somit zur gesteigerten Zellproliferation (Vélez-Cruz and Johnson 2017). Es konnte in drei verschiedenen biologischen Replikaten eine erhöhte Phosphorylierung des Rb durch Zugabe von konditioniertem Medium bei NT-3 Zellen gezeigt werden (Abbildung 4.11).

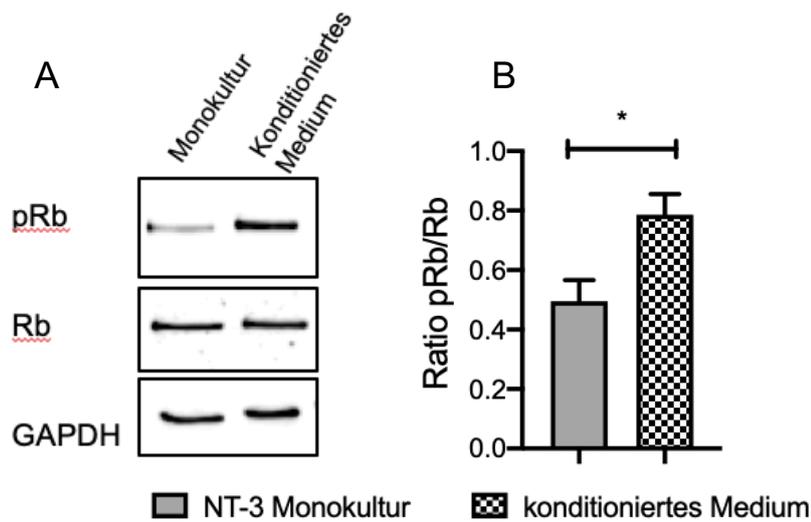


Abbildung 4.11: Expression von pRb in NT-3 Zellen nach Stimulation durch konditioniertes Medium: A Western Blot; B Densitometrie, * $p < 0,05$

4.4 Therapieansprechen auf Everolimus in NT-3 Zellen nach CAF-Stimulation

Da bei fehlendem Einfluss der CAF auf die Proliferation sowie Zellviabilität der BON Zellen keine Proliferationsassays durchgeführt wurden, wurde im weiteren Verlauf auf eine Analyse des Therapieansprechen verzichtet. Im Folgenden wurde nur das Therapieansprechen der NT-3 Zellen auf Everolimus analysiert.

4.4.1 Therapieansprechen von NT-3 Zellen in Kultur mit konditioniertem Medium:

MTT-Assay

Hinsichtlich des Therapieansprechens wurde die Sensitivität der NT-3 Zellen gegenüber dem mTOR-Inhibitor, Everolimus, in einer Konzentration von 10 nM getestet. Nach Inkubation der Zellen über 120 Stunden konnte eine signifikante Wirkung von Everolimus und damit Reduktion der Zellzahl um 15% in der Monokultur gezeigt werden. Diese Wirkung wurde durch Zugabe von konditioniertem Medium aus drei verschiedenen Fibroblasten-Kulturen signifikant aufgehoben. Hier zeigte sich ein höheres Zellüberleben um 25% im Vergleich zur mit Everolimus behandelten Monokultur aus NT-3 Zellen (Abbildung 4.12).

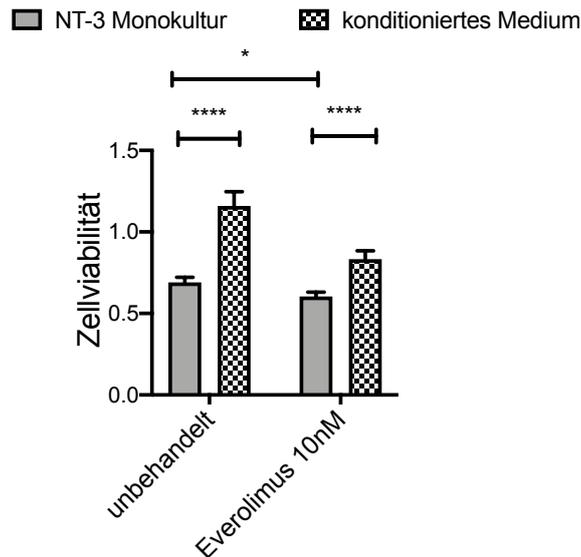


Abbildung 4.12: Therapieansprechen auf Everolimus in NT-3 Zellen nach Stimulation mit konditioniertem Medium, **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$

4.4.2 Therapieansprechen von NT-3 Zellen in Kultur mit konditioniertem Medium:

Immunfluoreszenz

Durch Zugabe von Everolimus zur NT-3 Monokultur konnte nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden eine signifikante Reduktion der Ki-67-Positivität um ein Drittel erreicht werden. Auch hier hebt sich der Effekt von Everolimus auf und die Ki-67-positiven NT-3 Zellen erhöhen sich um ungefähr 90% durch konditioniertes Medium aus CAF auf (Abbildung 4.12).

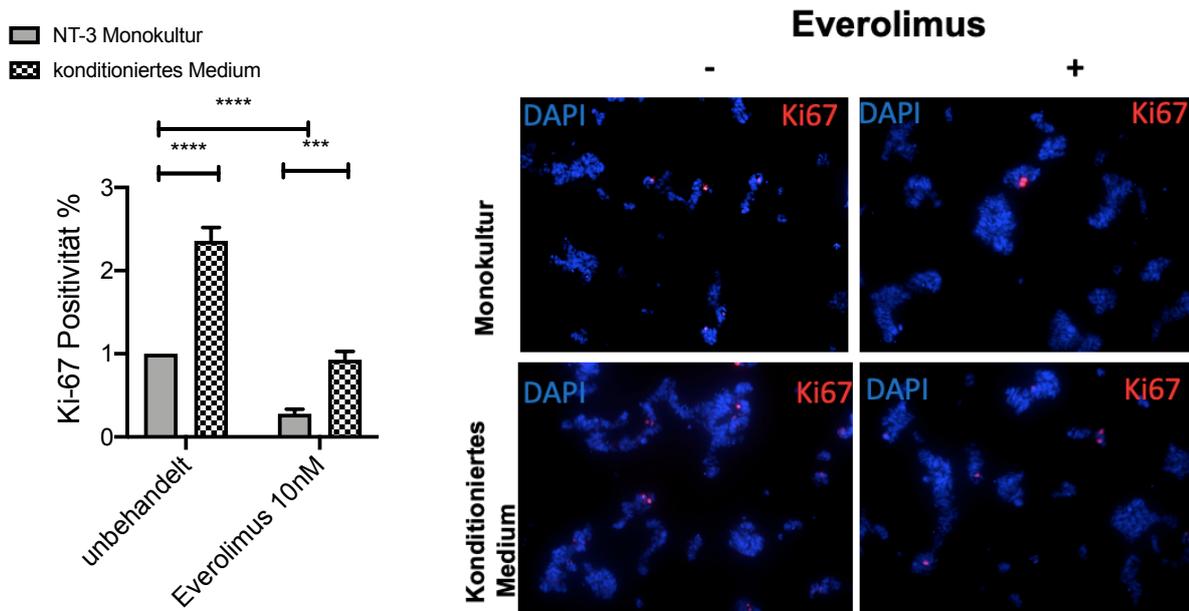


Abbildung 4.13: Ansprechen auf Everolimus nach Gabe von konditioniertem Medium zu NT-3 Zellen in der Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$

4.5 Einfluss von CAF auf die Signaltransduktion in NET-Zellen

Um auf molekularer Basis den Einfluss von CAF auf NET zu analysieren, ist es von großer Bedeutung, die Expression von Proteinen mehrerer Signalwege in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Fibroblasten zu identifizieren. Hierzu diente die Analyse von drei verschiedenen Signalwegen: AKT, ERK und STAT3.

4.5.1 Einfluss des konditionierten Mediums auf die Signaltransduktion

Der Phosphatidol-Inositol-3-Kinase (Pi3K)/AKT Signalweg ist zuständig für die Zellproliferation, das Zellüberleben sowie Onkogenese (J. Huang et al. 2011; Shukla et al. 2007). Es wurde bereits eine erhöhte Aktivität des AKT in verschiedenen Tumoren, wie das Ovarzellkarzinom, Nierenzellkarzinom und auch Prostatakarzinom festgestellt (J. Huang et al. 2011; Shukla et al. 2007; Xu et al. 2015). Nach Aktivierung von AKT folgt die Phosphorylierung und damit Aktivierung von mTOR und induziert hiermit die Proteinsynthese (Muise-Helmericks et al. 1998).

Diesbezüglich wurde der Einfluss des konditionierten Mediums auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung von AKT in NT-3 und BON untersucht. Der

Western Blot zeigte hierzu keinen signifikanten Einfluss des konditionierten Mediums auf die NT-3 Zellen. Bei BON konnte eine signifikant höhere Aktivierung von AKT 30 Minuten, nicht jedoch 24 Stunden nach Zugabe von konditioniertem Medium gezeigt werden (Abbildung 4.14-A und -B).

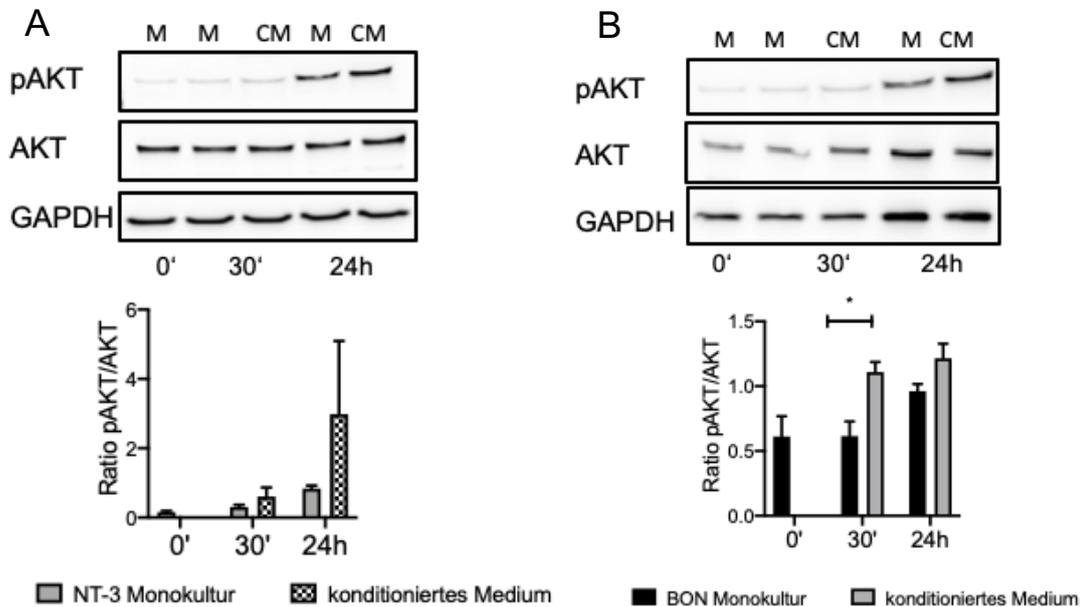


Abbildung 4.14: Western Blot zur Darstellung der AKT-Phosphorylierung bei A: NT-3 Zellen und B: BON Zellen nach Stimulation durch konditioniertes Medium, * $p < 0,05$

Der Signalweg der Raf-Serin-Threonin Kinase, *Mitogen extracellular kinase* (MEK), *extracellular signal-related kinase* (ERK) wird ebenso durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, stimuliert (Gollob et al. 2006). Nach einem Phosphorylierungsprozess der einzelnen Proteine werden Zellprozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Überleben in Gang gesetzt (Kolch 2000). Weder in NT-3 Zellen noch in BON Zellen konnte eine Aktivierung von ERK durch konditioniertes Medium beobachtet werden (Abbildung 4.15)

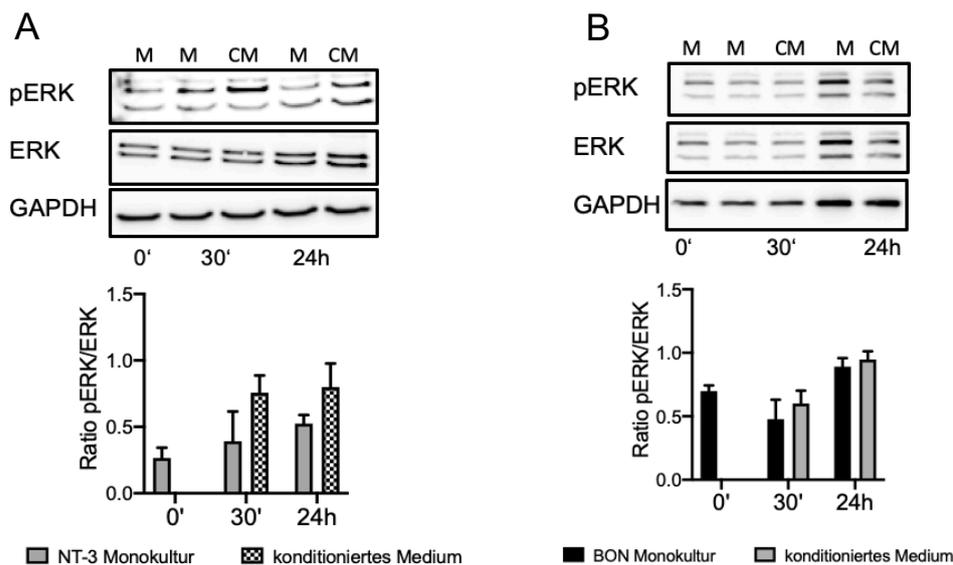


Abbildung 4.15: Western Blot zur Darstellung der ERK-Aktivierung durch konditioniertes Medium in A: NT-3 Zellen und B: BON Zellen

Nachdem Faktoren an den homodimeren Rezeptor, gp130, binden, erfolgt eine Aktivierung der rezeptorgebundenen Tyrosinkinase, Januskinase (JAK), die eine Autophosphorylierung von gp130 induziert. Moleküle, wie SHP-2, einer Protein-Tyrosin-Phosphatase und STAT3, *signal transducers and activators of transcription 3*, werden rekrutiert, die wiederum durch JAK phosphoryliert und damit aktiviert werden. So können diese in den Zellkern translozieren und zur Stimulierung von Zellproliferationsprozessen führen (Becker, Groner, and Müller 1998; Shuai et al. 1994; Ueda, Bruchovsky, and Sadar 2002).

Die Western Blot Analyse zeigte eine signifikante Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 nach Zugabe von konditioniertem Medium bei einer Inkubationszeit von sowohl 30 Minuten als auch 24 Stunden. Dieser Effekt ließ sich an beiden NET-Zelllinien, NT-3 und BON, nachweisen (Abbildung 4.16)

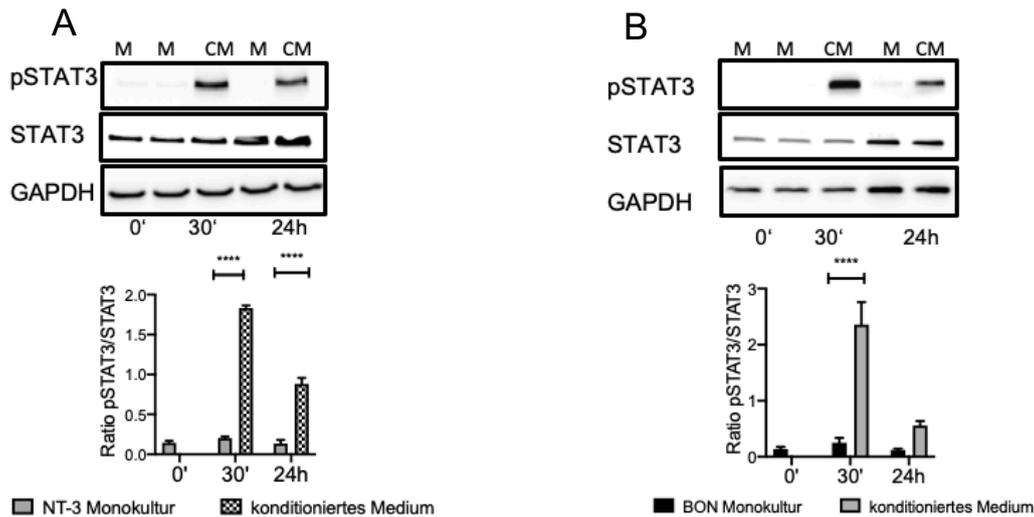


Abbildung 4.16: Einfluss des konditionierten Mediums auf die STAT3-Aktivierung in A: NT-3 und B: BON Zellen, **** p<0,0001

4.5.2 Einfluss der Ko-Kultur

Durch eine Inkubation der NT-3 Zellen in indirekter Ko-Kultur mit CAF für 24 Stunden, konnte der Effekt der erhöhten STAT3-Aktivierung wie durch konditioniertes Medium bestätigt werden. Auch hier zeigte sich kein Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT und ERK (Abbildung 4.17-A, -B).

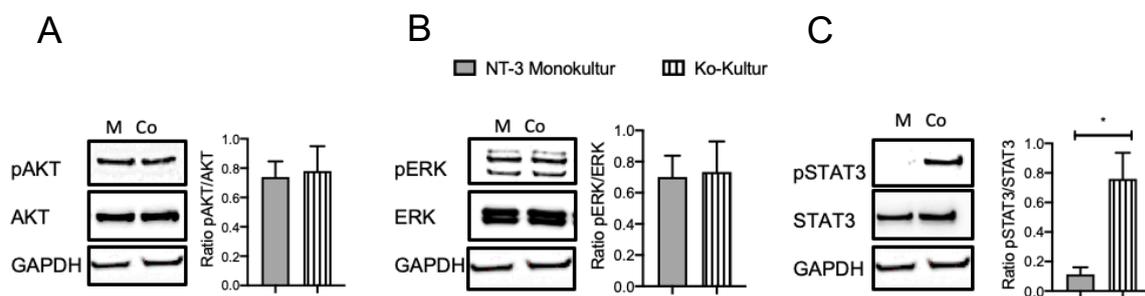


Abbildung 4.17: Einfluss der Ko-Kultur auf die A: AKT-, ERK- und STAT3-Aktivierung in NT-3 Zellen, * p<0,05

4.5.3 Einfluss von Everolimus auf die Signalwege

Nachdem eine Therapieresistenz gegen Everolimus durch Zugabe von CAF induziert und eine Stimulation von pSTAT3 durch CAF gezeigt werden konnte, gilt es, auf molekularer Ebene den Einfluss von Everolimus auf die verschiedenen Signalwege, vor allem auf STAT3, zu analysieren.

Der Einfluss von Everolimus auf die drei Signalwege wurde nach 30 Minuten sowie 24 Stunden Inkubation untersucht. Hier wurde das konditionierte Medium der CAF als Methode verwendet. Auf die Aktivierung von STAT3 und ERK konnte Everolimus keinen Einfluss üben (Abbildung 4.18-B, -C). Eine basale Hochregulierung und Aktivierung von AKT konnte durch Everolimus gezeigt werden (Abbildung 4.18-A). Dies lässt sich durch die negative Rückkopplung auf AKT nach mTOR-Inhibition erklären.

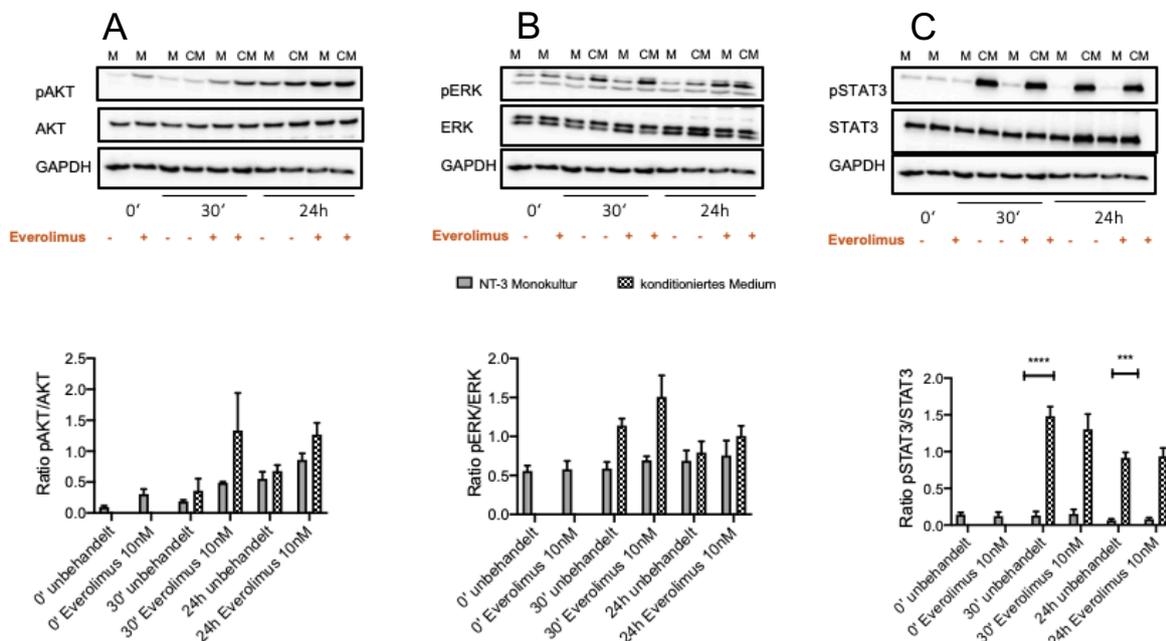


Abbildung 4.18: Western Blot zur Darstellung des Einflusses von Everolimus auf die Aktivierung von AKT, ERK und STAT3 bei NT-3 Zellen, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$

4.6 Modulation der STAT3-Aktivierung

Nachdem es zu einer signifikant erhöhten Aktivierung von STAT3 durch das konditionierte Medium und Ko-Kultur in beiden NET-Zelllinien kam, sollte die Relevanz dieses Signalweges für den Einfluss von CAF auf NET untersucht werden. Hierfür nutzten wir zum Einen STAT3-Inhibitoren, wie Napabucasin und Ruxolitinib, zum Anderen eine spezifische STAT3-siRNA.

4.6.1 Effekt der STAT3-Inhibitoren: Western-Blot

Ruxolitinib ist ein JAK 1 und 2- Inhibitor. Jak ist hierbei eine rezeptorgebundene Tyrosinkinase, die für die Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 verantwortlich ist. Dieser Inhibitor wurde in diesem Projekt zur Hemmung des

JAK/STAT3-Signalweges genutzt. Bisher wird dieses Therapeutikum im Bereich myeloproliferativer Erkrankungen eingesetzt (Harrison and Vannucchi 2012; Martí-Carvajal, Anand, and Solà 2015; Plosker 2015). Abbildung 4.19 zeigt eine Aufhebung der Phosphorylierung von STAT3 im konditionierten Medium nach Zugabe von Ruxolitinib.

Dahingegen greift Napabucasin später im JAK-STAT-Signalweg ein, indem er die Bindung des phospho-STAT3 an die DNA im Zellkern hemmt. Bisher wurde die Anwendung von Napabucasin bereits beim Adenokarzinom des Pankreas untersucht (Bekaii-Saab et al. 2018; Sonbol, Ahn, and Bekaii-Saab 2019).

Erwartungsgemäß hatte Napabucasin keinen hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 4.19).

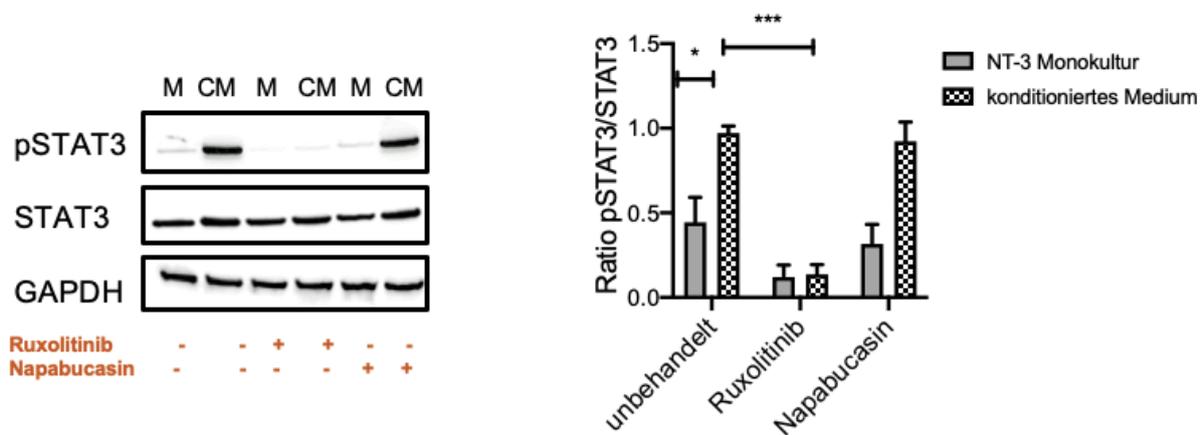


Abbildung 4.19: Western Blot zur Darstellung des Einflusses von Ruxolitinib und Napabucasin auf die Aktivierung von STAT3 bei NT-3 Zellen, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$

4.6.2 Effekt der STAT3-Inhibitoren: Proliferations-Assays

Beide Inhibitoren konnten sowohl im MTT als auch in der Ki-67-Färbung den Effekt des konditionierten CAF Mediums aufheben (Abbildung 4.20-A). Die Resistenz gegen Everolimus konnte durch die beiden Inhibitoren ebenso aufgehoben werden (Abbildung 4.20-B).

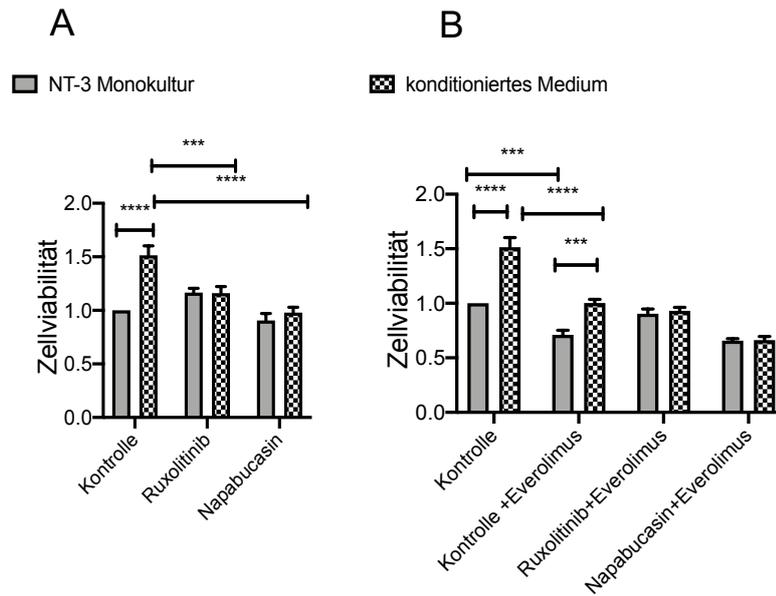
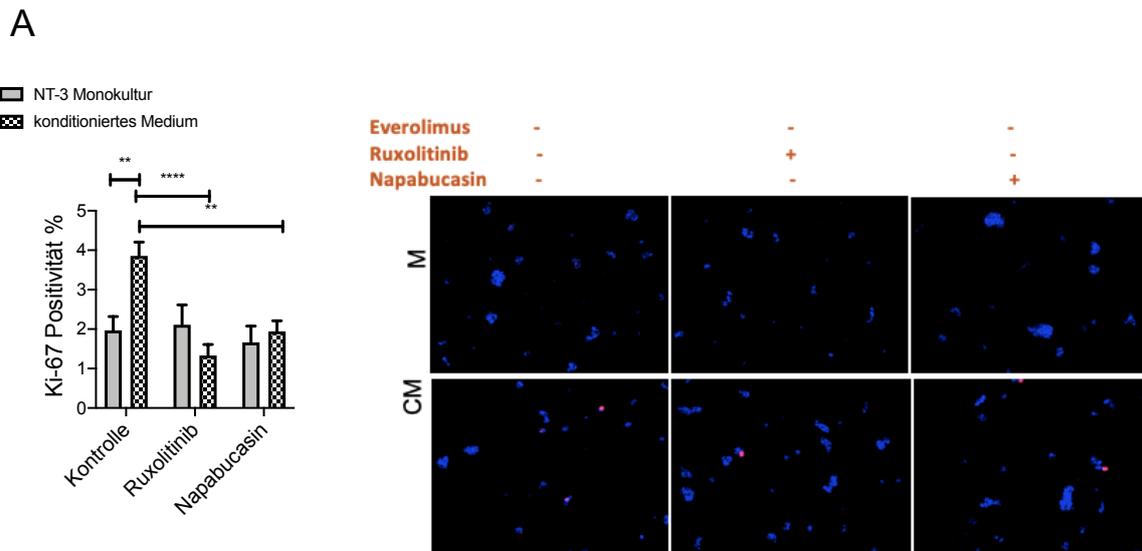


Abbildung 4.20: Einfluss von Ruxolitinib und Napabucasin auf die Zellviabilität im MTT-Assay A: ohne Behandlung, B: mit Behandlung mit Everolimus, **** p<0,0001, *** p<0,001

Die Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung zeigte einen signifikanten Rückgang der Proliferation der mit konditioniertem Medium behandelten NT-3 Zellen durch Ruxolitinib und Napabucasin (4.21-A). Ebenso hier zeigte sich eine Aufhebung der Everolimusresistenz im konditionierten Medium durch Ruxolitinib und Napabucasin (4.21-B).



B

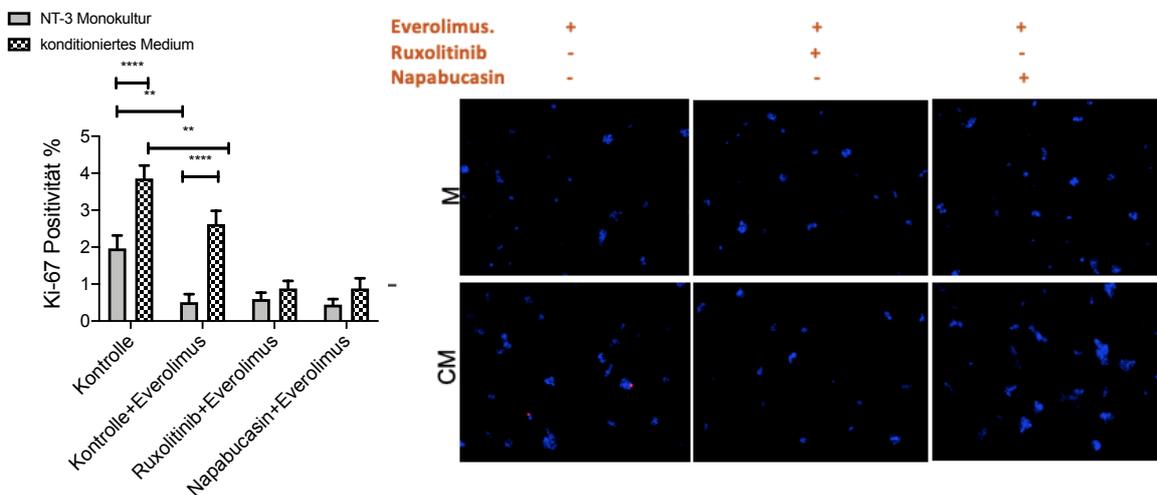


Abbildung 4.21: Einfluss von Ruxolitinib und Napabucasin auf den Ki-67-Proliferationsindex A: ohne Behandlung, B: mit Behandlung mit Everolimus, **** p<0,0001, ** p<0,01

4.6.3 Effekt der STAT3-siRNA: Western-Blot

Eine weitere Methode zur Inhibition der STAT3 Signaltransduktion in den NT-3 Zellen durch CAF, ist die Zugabe von STAT3 *small interfering RNA* (siRNA). Der Mechanismus dieser besteht in der Bindung der nicht kodierenden siRNA an die mRNA, sodass diese degradiert wird (Dana et al. 2017; Endoh and Ohtsuki 2009; Fire et al. 1998).

Zur Verifikation des STAT3-*knockdowns*, wurde zunächst die STAT3-Expression mittels Western-Blot Analyse für drei biologische Replikate der NT-3 Zellen für eine Inkubationszeit von 72 und 120 Stunden nach Zugabe der siRNA ermittelt. Es konnte unabhängig von der Inkubationszeit eine spezifische Herunterregulierung der STAT3-Expression von mehr als 50% im Western Blot gezeigt werden (Abbildung 4.22).

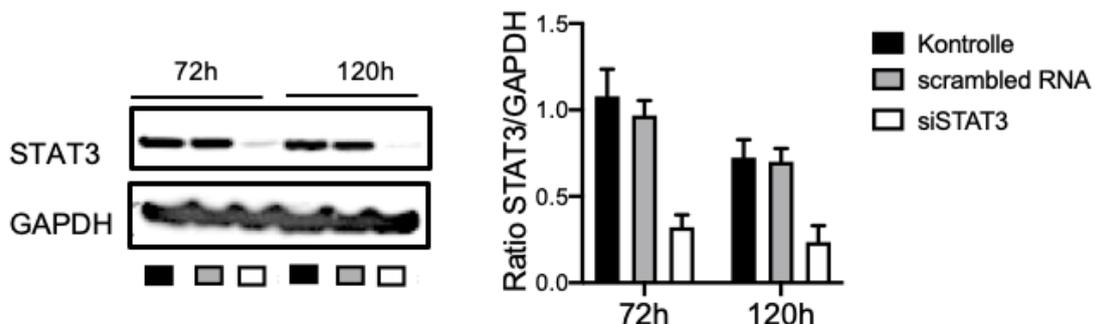


Abbildung 4.22: Western Blot zur Darstellung des Einflusses von STAT3-siRNA auf die STAT3-Expression bei NT-3 Zellen nach 72 und 120 Stunden Inkubationszeit

4.6.4 Effekt der STAT3-siRNA: Proliferations-Assays

Im MTT-Assay konnte ein signifikanter Rückgang der vitalen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowie zur mit *scrambled siRNA* behandelten Kontrolle registriert werden (Abbildung 4.23-A). Zudem wurde eine signifikant verminderte Ki-67-Positivität in den NT-3 Zellen durch siRNA beobachtet (Abbildung 4.24-A). Auch hier konnte die durch konditioniertes Medium vermittelte Resistenz gegen Everolimus durch siSTAT3 sowohl im MTT-Assay (Abbildung 4.23-B) als auch in der Ki-67-Färbung aufgehoben werden (Abbildung 4.24-B).

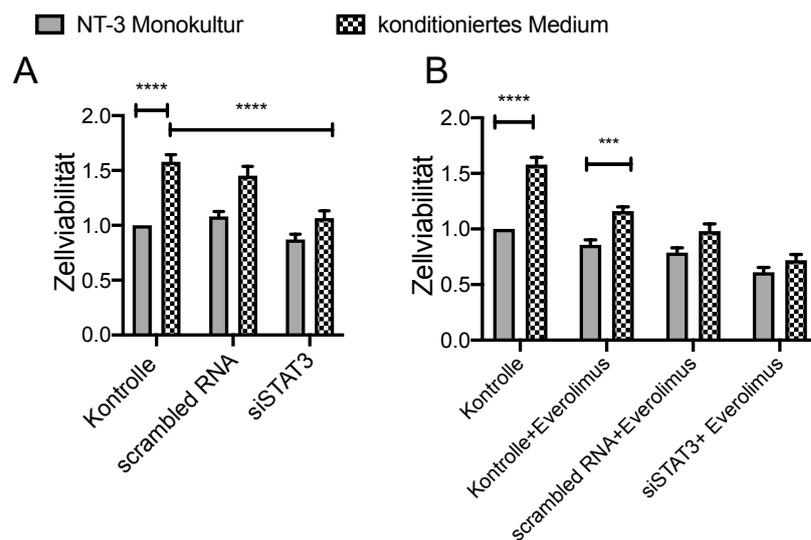
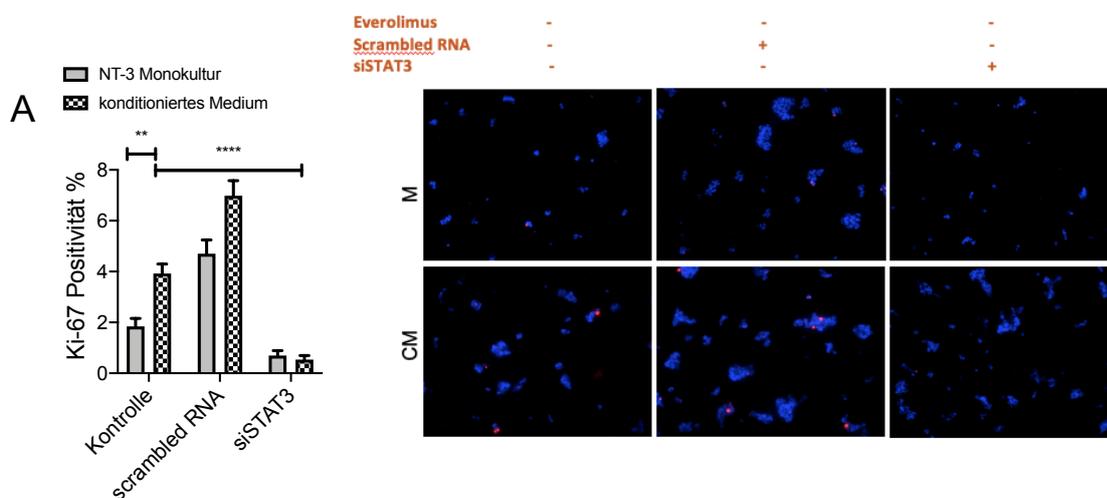


Abbildung 4.23: Einfluss von STAT3-siRNA auf die Zellzahl im MTT-Assay A: ohne Behandlung, B: mit Everolimus, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$



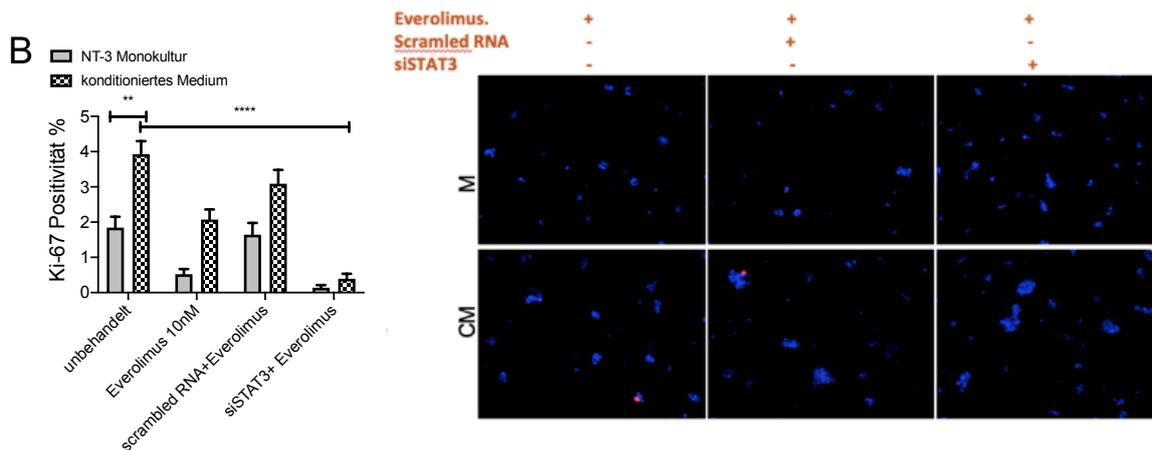


Abbildung 4.24: Einfluss von STAT3-siRNA auf den Ki-67-Proliferationsindex A: ohne Behandlung, B: mit Behandlung mit Everolimus, **** p<0,0001, ** p<0,01

4.7 TMA-Analyse

TMA-Analysen ermöglichen es, an einem großen Gewebekollektiv, Aussagen über die Expression verschiedener Proteine zu treffen und miteinander zu korrelieren. Es sind folgende NET und NEC Tumore auf dem TMA zu finden:

<u>Ursprung</u>	<u>Gesamtanzahl</u>
Lungen-NET	19
Lungen-NEC	7
Pankreas-NET	53
Pankreas-NEC	12
Ileum-NET	42
Ileum-NEC	4
NET-Metastasen	14
NEC-Metastasen	11
Ösophagus-NET	1
Ösophagus NEC	4
Magen-NET	7
Magen-NEC	1
Duodenum-NET	5
Jejunum-NET	3

Colon-NET	7
Colon-NEC	10
Rektum-NET	3
Rektum-NEC	1
Appendix-NET	22
Appendix-NEC	1
Gallenblasen-NET	1
Gallenblasen-NEC	4
Meckel-Divertikel- NET	2
Ampulla vateri-NET	1

4.7.1 CgA-Intensität in Abhängigkeit von der pSTAT3-Expression

Ergebnisse der TMA-Auswertungen zeigten eine signifikante Abhängigkeit der CgA- von der pSTAT3-Expression. CgA positive NET und NEC weisen signifikant geringere pSTAT3-positive Zellen auf als CgA-negative NET und NEC (Abbildung 4.25).

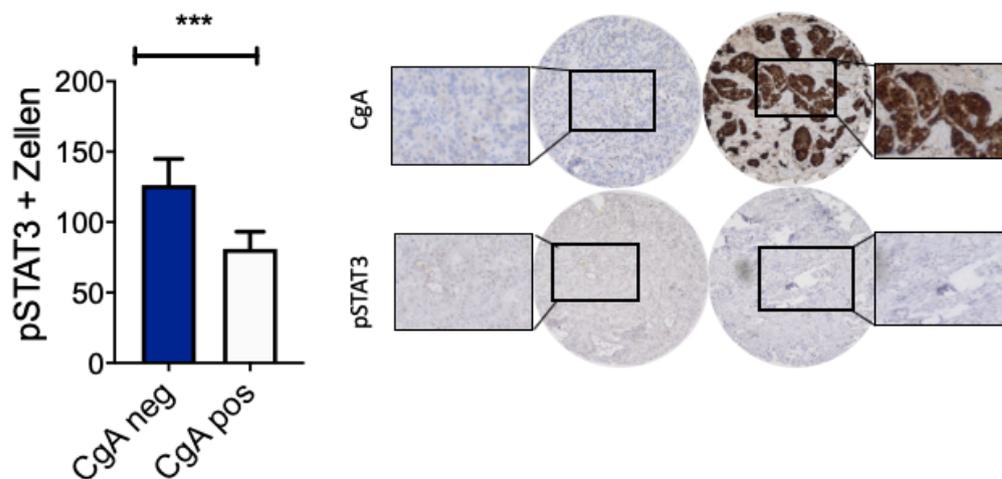


Abbildung 4.25: Auswirkung der Anzahl pSTAT3-positiver Zellen auf die CgA-Intensität, *** $p < 0,001$

4.7.2 Auswirkung der pSTAT3-Expression auf die SSTR2-Intensität

Ergebnisse der TMA-Auswertungen zeigten keine signifikante Abhängigkeit der SSTR2- von der pSTAT3-Expression, jedoch ist ein Rückgang der pSTAT3-positiven

Zellen in SSTR2-positiven Schnitten verglichen mit SSTR2-negativen Schnitten zu beobachten (Abbildung 4.26).

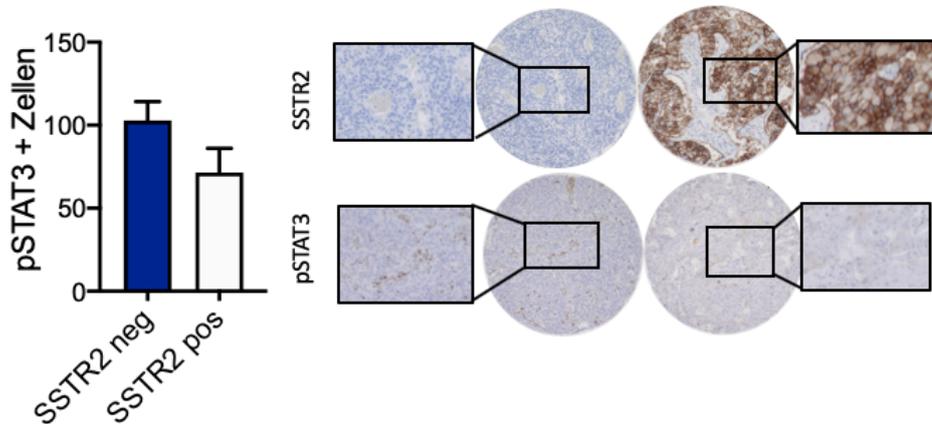
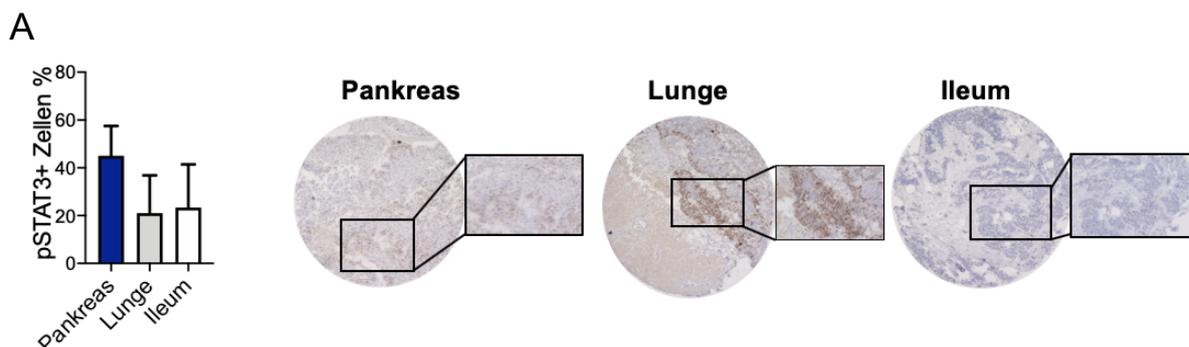


Abbildung 4.26: Auswirkung der Anzahl pSTAT3-positiver Zellen auf die SSTR2-Intensität

4.7.3 Vergleich der p-STAT3-Expression in NET und NEC der verschiedenen Organe

Betrachtet man die einzelnen Organe hinsichtlich ihrer pSTAT3-Expression, so fällt auf, dass NET von Pankreas eine höhere pSTAT3-Positivität aufweisen im Gegensatz zu NET aus dem Ileum und der Lunge (Abbildung 4.27-A). Vergleicht man die pSTAT3 Expression in den NEC der jeweiligen Organe, so lässt sich eine höhere Expression im Lungen-NEC verglichen mit Pankreas- und Ileum NEC nachweisen (Abbildung 4.27-B). Für den Vergleich standen jedoch weniger Spots aus den NEC als aus den NET zur Verfügung.



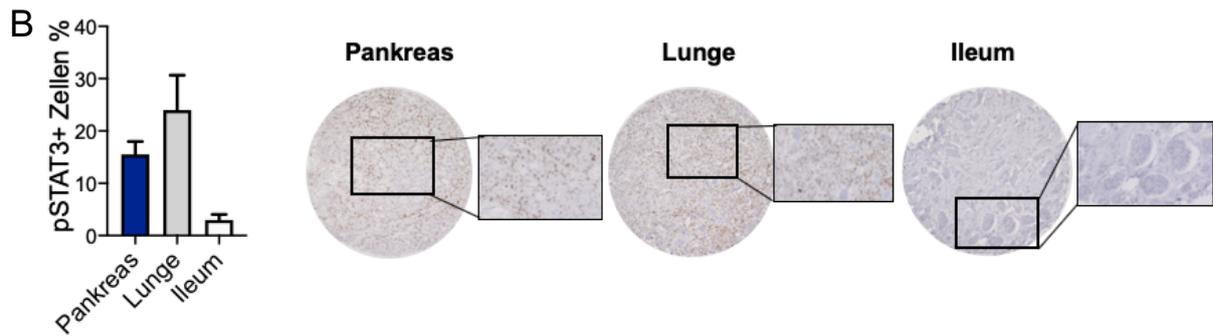


Abbildung 4.27: pSTAT3-Expression in Pankreas-, Lungen- und Ileum- A: NET und B: NEC

4.7.4 Unterschiede in der Ki-67 Positivität zwischen NET und NEC in Primarii und Metastasen

Hinsichtlich der Ki-67 Positivität konnten signifikant höhere Werte in den NEC verglichen mit den NET sowohl im Primarius (Abbildung 4.28-A) als auch in den Metastasen (Abbildung 4.28-B) erhoben werden.

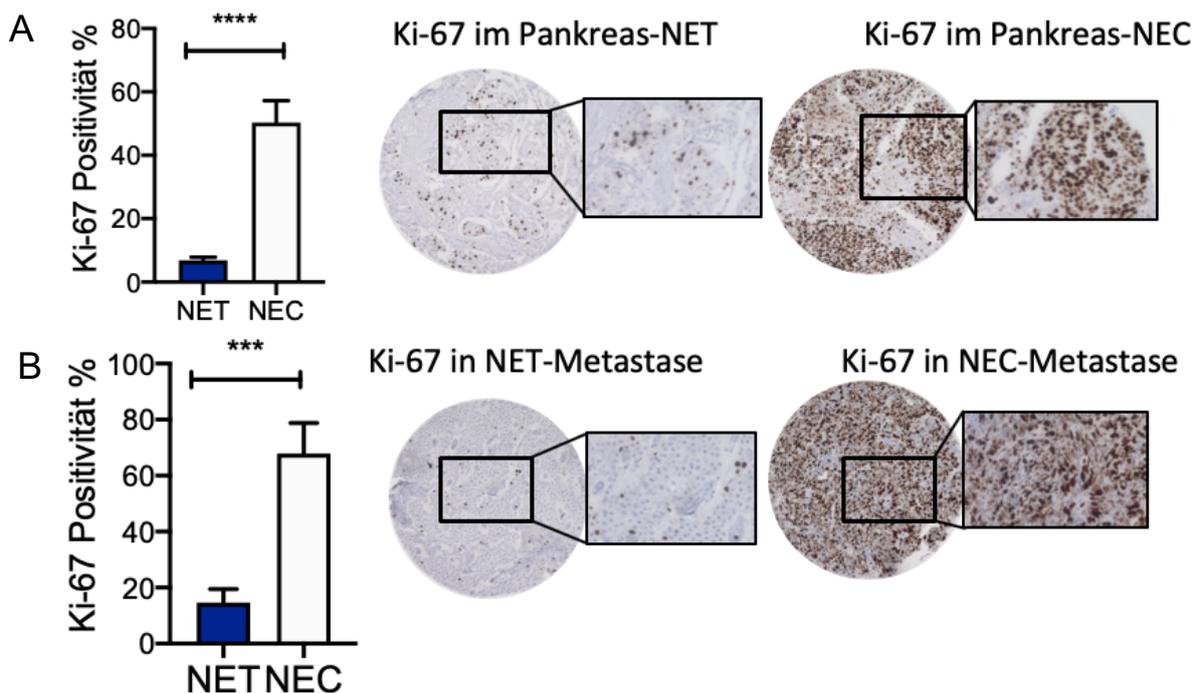


Abbildung 4.28: Ki-67-Expression zwischen NET und NEC in A: Primarii und B: Metastase, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$

4.7.5 Vergleich pSTAT3-Expression in NET und NEC-Primarii

Zunächst besteht die Frage, ob es im Allgemeinen einen Unterschied in der STAT3 und pSTAT3-Expression in allen NET und NEC gibt. Diese Analyse zeigte eine signifikant höhere nukleäre pSTAT3 Expression in NEC als in NET der einzelnen Primarii (Abbildung 4.29).

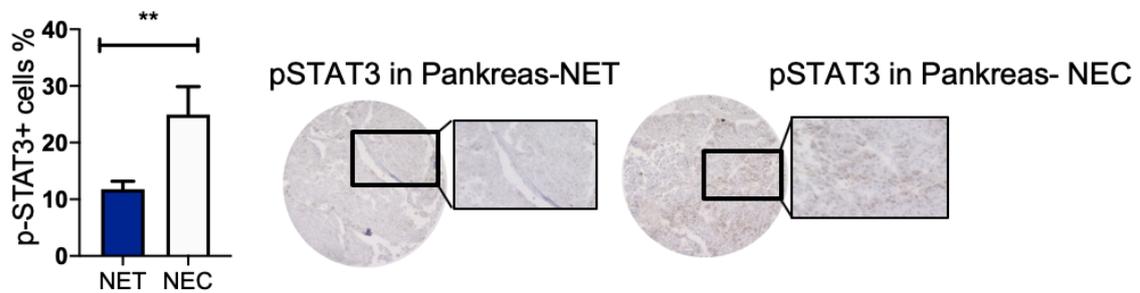


Abbildung 4.29: pSTAT3-Expression zwischen NET und NEC, ** $p < 0,01$

4.7.6 Korrelation der Ki-67- und pSTAT3-Expression in NET-Primarii

Anhand der gesammelten und ausgewerteten TMA-Ergebnisse konnte eine signifikante Korrelation zwischen Ki-67- und pSTAT3-Positivität in den NET-Primarii ermittelt werden (Abbildung 4.30).

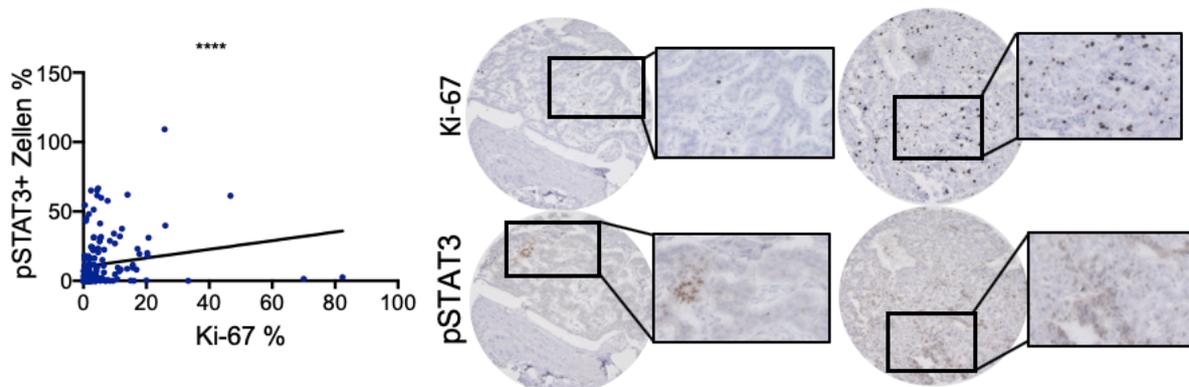


Abbildung 4.30: Korrelation zwischen Ki-67 und pSTAT3 in NET-Primarii, **** $p < 0,0001$

4.7.7 Unterschiede in der pSTAT3- Expression zwischen Primarii und Metastasen in NET und NEC

Abbildung 4.31 visualisiert die Unterschiede hinsichtlich der pSTAT3-Expression in NET- (Abbildung 4.31-A) und NEC-Primarii- und Metastasen (Abbildung 4.31-B). Während es bei den NET zu einer Erhöhung der pSTAT3-Expression in den Metastasen verglichen mit den Primarii kommt (Abbildung 4.31-A), zeigen die NEC eine geringere Expression von pSTAT3 in den Metastasen (Abbildung 4.31-B). Es lässt sich jedoch weder in NET noch in NEC ein signifikanter Unterschied in der pSTAT3-Expression zeigen.

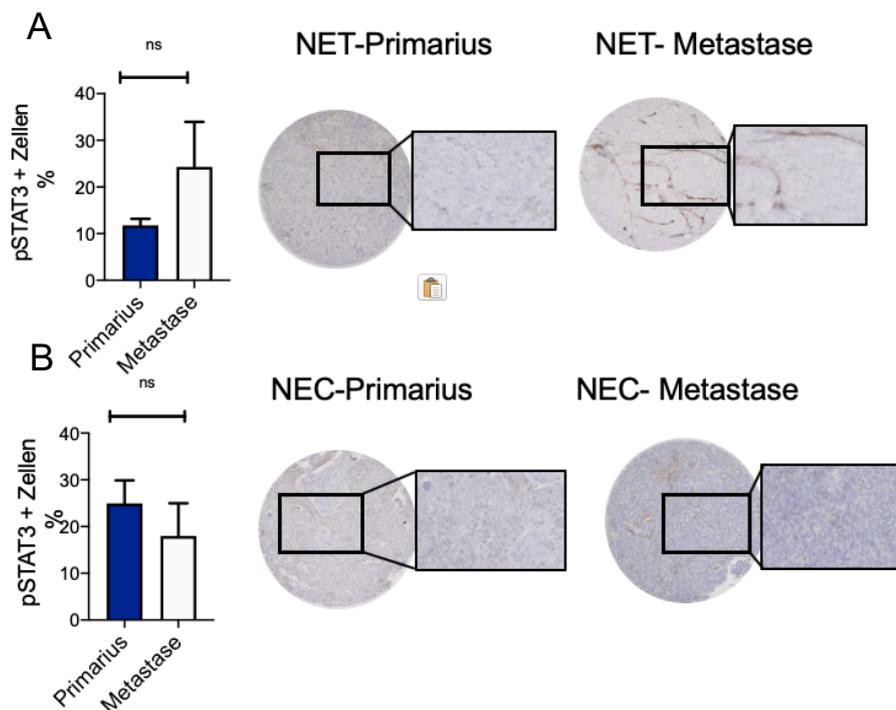


Abbildung 4.31: pSTAT3-Expression in A: NET- und B: NEC-Primarii und -Metastasen, ns= nicht signifikant

4.7.8 Unterschiede in der STAT3- Expression zwischen Primarius und Metastasen in NET und NEC

Abbildung 4.32 visualisiert die Unterschiede hinsichtlich der nukleären STAT3-Expression in NET- (Abbildung 4.32-A) und NEC-Primarii- und Metastasen (Abbildung 4.32-B). Es lässt sich bei den NET eine signifikant geringere STAT3-Expression in den Metastasen verglichen mit den Primarii zeigen (Abbildung 4.32-A).

Diese verringerte nukleäre STAT3-Expression zeigt sich ebenso in den NEC-Metastasen, jedoch nicht signifikant geringer als in den NEC-Primarii (Abbildung 4.32-B).

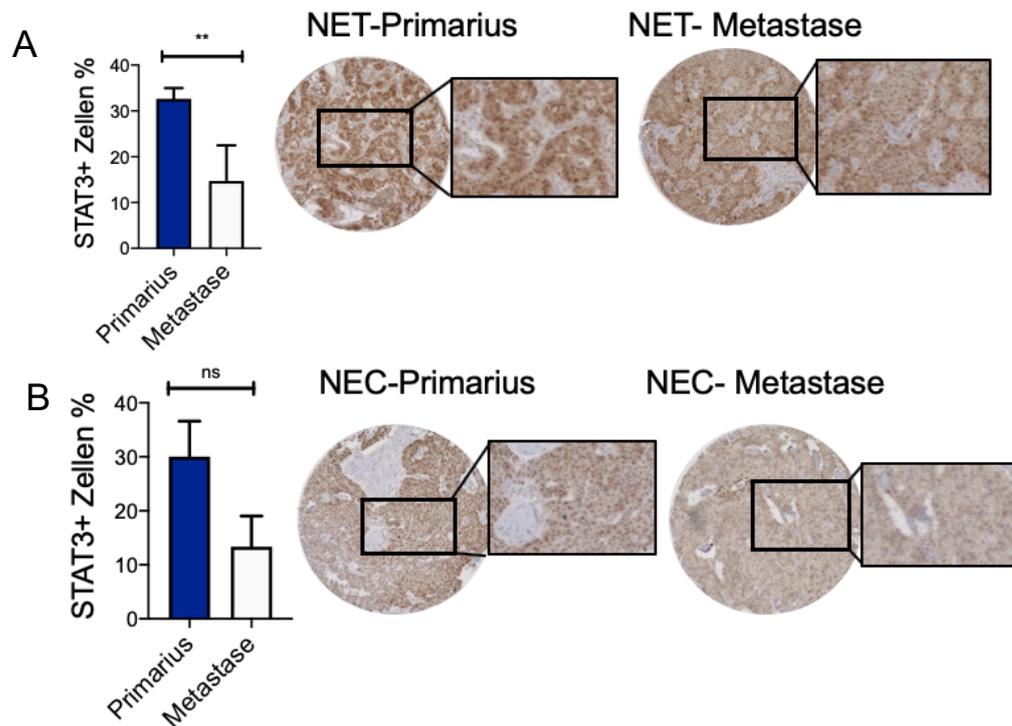


Abbildung 4.32: Nukleäre STAT3-Expression in A: NET- und B: NEC-Primarii und -Metastasen, ** $p < 0,01$, ns=nicht signifikant

4.7.9 Unterschiede in der Ki-67-Expression zwischen NET- und NEC- Primarii und -Metastasen

Abbildung 4.33 zeigt eine höhere Ki-67-Positivität in NET- und NEC-Metastasen verglichen mit den NET- und NEC-Primarii, jedoch ist dies kein signifikanter Unterschied.

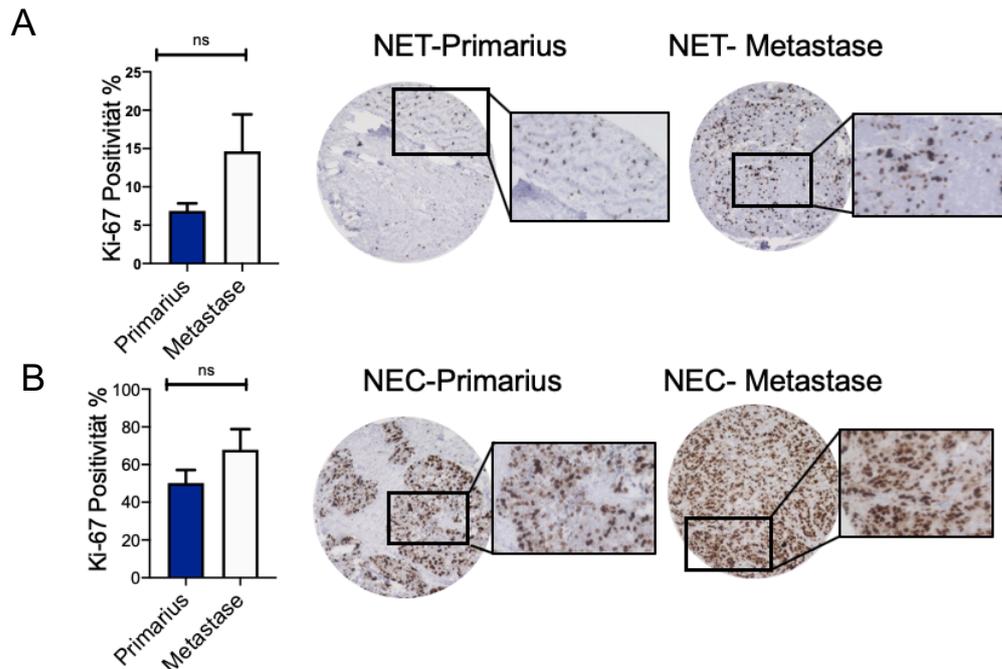


Abbildung 4.33: Ki-67-Expression in A: NET- und B: NEC-Primaria und -Metastasen, ns=nicht signifikant

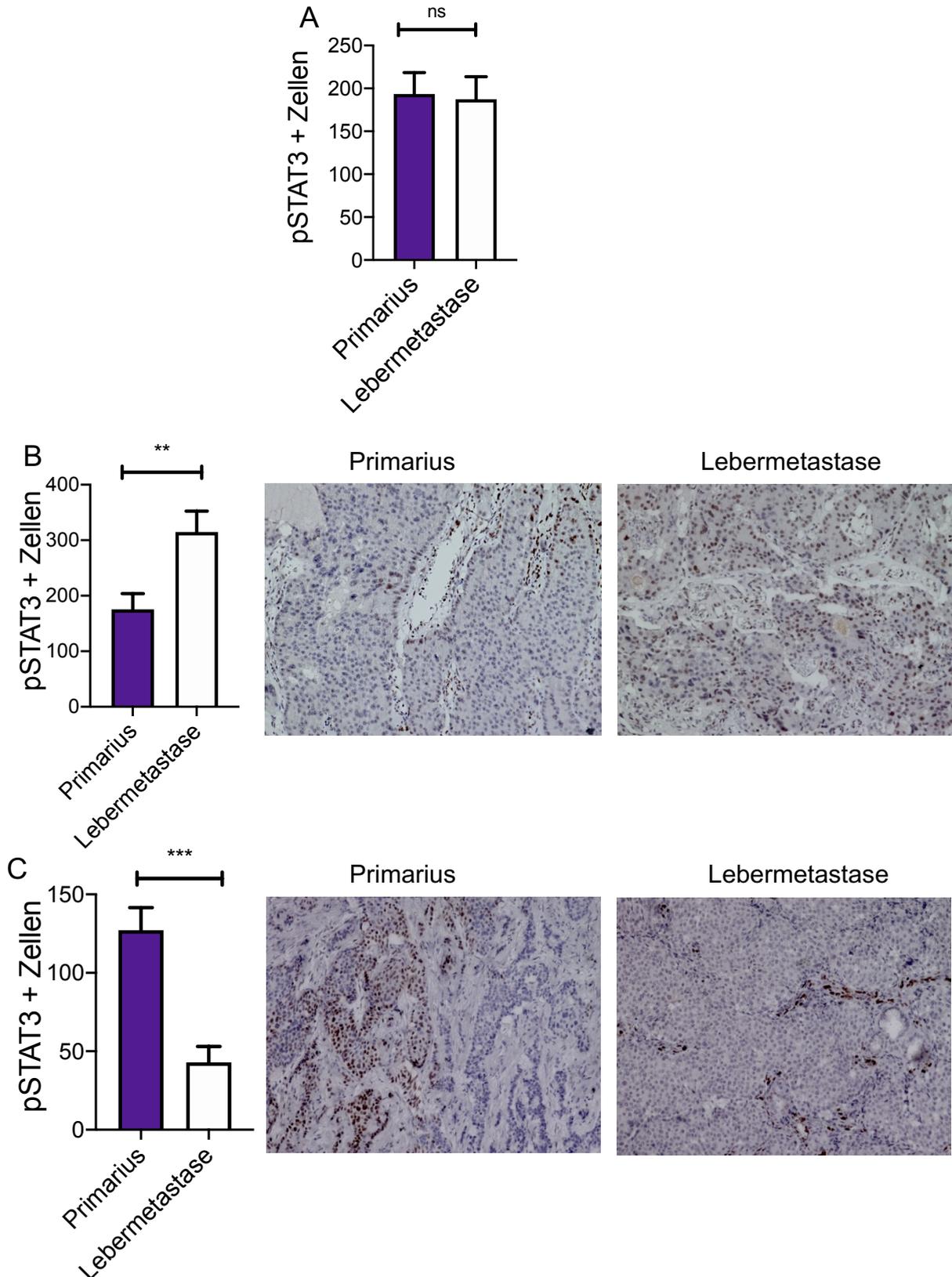
4.8 pSTAT3-Expression in der immunhistochemischen Färbung der Großflächenschnitte

Für den Vergleich der pSTAT3-Expression in Primarius und Lebermetastase eigneten sich die vom Institut für Pathologie bereitgestellten Großflächenschnitte. Hierbei handelte es sich um Schnitte von neun verschiedenen Patienten, wobei es pro Patienten Schnitte aus dem NET-Primarius sowie seiner korrespondierenden Lebermetastase gibt.

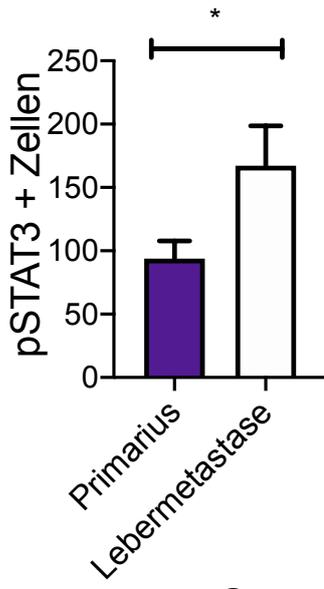
Zusätzlich zu den Fibroblastenmarkern α SMA und FSP (Abschnitt 4.1.1), wurde ebenso pSTAT3 als Antikörper in der immunhistochemischen Färbung genutzt. Hierdurch konnte ein Vergleich bei jedem Patienten hinsichtlich der pSTAT3-Expression im jeweiligen Primarius und der zugehörigen Lebermetastase gezogen werden.

Abbildung 4.34-A zeigt den Vergleich der pSTAT3-Expression zwischen allen neun Primarii und Lebermetastasen. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Expression von pSTAT3. Betrachtet man die Paare aus Primarius und Lebermetastasen im Einzelnen, zeigen sechs der neun Paare eine signifikant höhere pSTAT3-Expression, während drei Paare eine signifikant niedrigere pSTAT3-Expression in der Lebermetastase

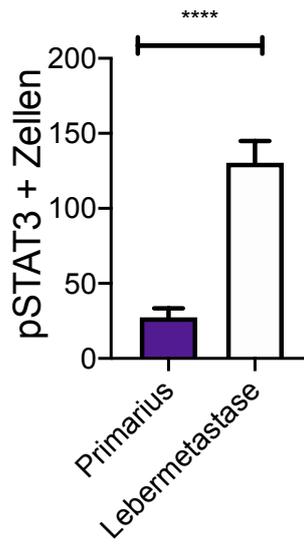
verglichen mit dem Primarius zeigen. Abbildung 4.34-B bis -J veranschaulichen den Vergleich für die einzelnen Paare. Für zwei Patienten wurden die immunhistochemischen Bilder gezeigt (Abbildung 4.34-B und C).



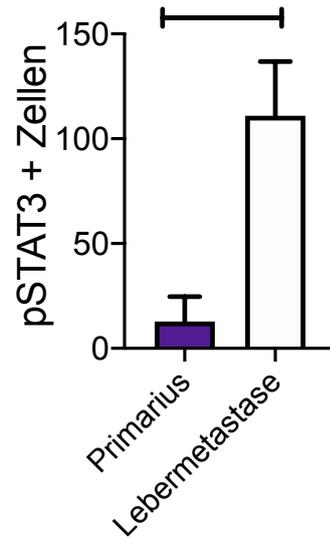
D



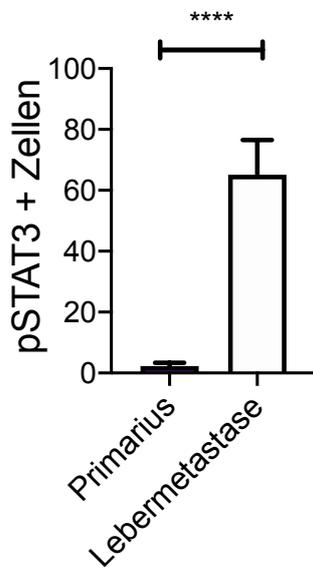
E



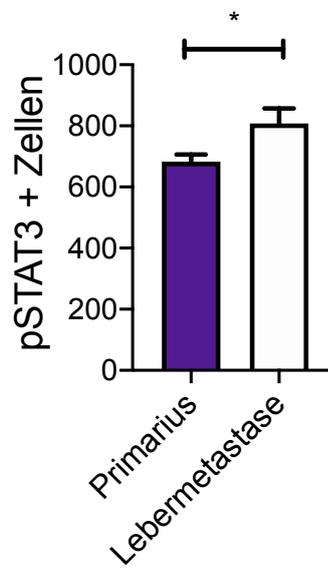
F



G



H



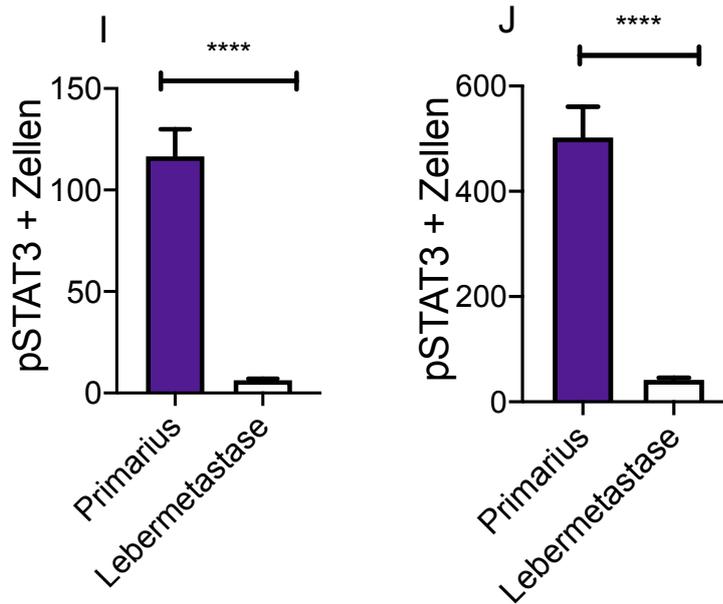


Abbildung 4.34: pSTAT3-Expression in der immunhistochemischen Färbung. Vergleich zwischen Primarius und Lebermetastase in A: allen neun Patienten. B-J: Vergleich für die einzelnen Patienten, **** p < 0,0001, *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05, ns=nicht signifikant

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmalig der Effekt von CAF auf NET untersucht. Führt man alle Ergebnisse zusammen, so kommt man zum Entschluss, dass CAF über bisher unbekannte Faktoren mit NET interagieren und dadurch eine De-Differenzierung und Proliferation in NET induzieren. Dies geschieht durch eine erhöhte STAT3-Aktivierung in den NET Tumorzellen, die ebenso zu einer Therapieresistenz gegen Everolimus führt. Durch Hemmung von STAT3 konnte die CAF-induzierte Proliferation gesenkt und die Therapiesensitivität für Everolimus erhöht werden. Passend hierzu konnte eine Korrelation zwischen STAT3 Aktivierung und Proliferation in einem größeren Patientenkollektiv in einer TMA-Auswertung gezeigt werden.

5.1 Regulation der Proliferation in NET durch CAF

Eine Hypothese dieser Arbeit besagt, dass CAF die Proliferation der NET induzieren. Diese Beeinflussung der Proliferation von NET-3 Zellen durch CAF konnte in der Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung, im MTT-Assay und in der Proteinanalyse durch Phosphorylierung von Rb sowohl durch konditioniertes Medium als auch in der Ko-

Kultur gezeigt werden (Abbildung 4.9, 4.10). Während im MTT nur die Anzahl vitaler Zellen ermittelt werden konnte, ermöglicht die erhöhte Ki-67-Positivität den Rückschluss auf eine erhöhte Proliferation dieser Zellen durch das konditionierte Medium, weniger auf eine verminderte Apoptose. Die Apoptose wurde allerdings nicht spezifisch untersucht, jedoch gab es morphologisch keinen Hinweis für eine Apoptose. Da die BON Zellen eine sehr hohe Proliferationsrate aufweisen, konnte der Effekt der CAF auf die Proliferation dieser Zelllinie nicht ermittelt werden. Bei nahezu 100%iger Ki-67-Positivität und nur minimalen Unterschieden zwischen BON Monokultur und BON in Kombination mit konditioniertem Medium, wurde dies nicht weiter untersucht. Durch die bereits basale hohe Proliferationsrate der BON Zellen ist die *in vitro* Beeinflussbarkeit durch CAF limitiert (Benten et al. 2018). Zwar haben die BON Zellen in Monokultur auf Everolimus angesprochen, eine Aufhebung des Therapieansprechens konnte durch die CAF jedoch nicht konsistent gezeigt werden. Daher wurden für die weiteren Versuche hinsichtlich Proliferation, Therapieansprechen und Aufhebung der STAT3-Aktivität nur NT-3 Zellen verwendet.

Weiterhin korreliert die STAT3-Aktivierung mit der Ki-67-Positivität im TMA, wodurch hier eine Verbindung zwischen Proliferation und STAT3-Aktivität in einem größeren Patientenkollektiv gezeigt werden konnte. Somit besteht die Frage, ob pSTAT3 zukünftig als prognostischer Marker in NET zusätzlich zu Ki-67 fungieren kann. Es ist daher sinnvoll, klinische Parameter zum Verlauf und Gesamtüberleben aus dem Patientenkollektiv des TMAs heraus zu suchen und mit der pSTAT3 Expression zu korrelieren. Auch ist eine Korrelation mit der jeweiligen TNM-Klassifikation sinnvoll, um eine mögliche prognostische Aussagekraft der STAT3- Aktivierung in den NET- Zellen zu evaluieren.

Eine Besonderheit der NET ist, dass NET keine aktivierenden Mutationen in klassischen Onkogenen besitzen. Daher sind sie wahrscheinlich weiterhin auf externe Signale zur Proliferationssteigerung angewiesen. Dieses Signal wird, laut den Ergebnissen dieser Arbeit, zumindest partiell von CAF geliefert. Als nächsten Schritt gilt es, dieses Signal zu ermitteln und als therapeutisches Ziel zu evaluieren.

5.2 Tumor-Stroma-Interaktion und De-Differenzierung der NET

Wir konnten zusätzlich den Einfluss der CAF auf die De-Differenzierung der NET in den Zellkulturversuchen nachweisen. Auch fand sich im TMA eine negative Korrelation zwischen der STAT3- Aktivierung und der Expression von Differenzierungsmarkern.

5.2.1 De-Differenzierung der NET durch STAT3- Aktivierung über CAF

Eine Hypothese dieser Arbeit bezeichnet die De-Differenzierung von NET durch CAF des Tumorstromas. Diese konnte zumindest für die BON Zelllinie (Abbildung 4.7) mit einer verminderten Expression von Chromogranin A und SSTRs gezeigt werden. Bei den NT-3 Zellen ergab sich zwar ein Trend zu einer geringeren SSTR2 Expression nach Stimulation mit konditioniertem Medium, aber dies war nicht signifikant (Abbildung 4.6). Dahingegen konnte bei den NT-3 Zellen eine erhöhte Expression von CXCR4 durch konditioniertes Medium gezeigt werden, welches sich bei den BON Zellen jedoch nur durch die Stimulation über die Ko-Kultur, nicht durch konditioniertes Medium, zeigte (Abbildung 4.7, 4.8). Betrachtet man diesen Unterschied dieser zwei Stimulationsmöglichkeiten anhand der BON Zellen, kommt man zum Entschluss, dass die Stimulation durch die Ko-Kultur einen stärkeren Effekt auf die stark proliferierende Zelllinie BON hat. Begründen kann man dies dadurch, dass durch die Nähe der CAF, die Interaktion der beiden Zelllinien vereinfacht und eine kontinuierliche Produktion der Botenstoffe gewährleistet wird, während diese im konditionierten Medium verbraucht werden. Hier kann auch eine direkte Modifizierung der CAF durch die BON Zellen postuliert werden, die wiederum die BON Zellen stimulieren (Graham, Alexander, and Miguel 1991; Merrilees and Scott 1981). Diese Hypothese trifft jedoch nicht auf die unterschiedliche Expression von SSTR2 und 5, die keinen signifikanten Unterschied in der Ko-Kultur Stimulation im Gegensatz zum konditionierten Medium zeigten, zu. Eine Begründung für die Unterschiede der beiden CAF-Stimulationsarten bezüglich CXCR4 und SST-Rezeptoren wäre eine höhere Aktivierung dieser entweder durch die kontinuierliche Sekretion der Botenstoffe in der indirekten Ko-Kultur (CXCR4) bzw. durch die zuvor von ihnen sezernierten und bereits bereitgestellten Faktoren im konditionierten Medium (SSTRs) (Tseng et al. 1996).

Einen Unterschied zwischen Ko-Kultur und konditioniertes Medium konnte nicht für die NT-3 Zellen gezogen werden. In den Vorversuchen konnte kein signifikanter Einfluss der Ko-Kultur auf das Expressionsprofil der NT-3 Zellen gezeigt werden (Daten nicht

gezeigt). Daher wurden die Wiederholungsversuche nur für die BON Zellen durchgeführt, nicht jedoch für die NT-3 Zellen.

Zusätzlich zu den Ko-Kultur-Versuchen konnte in der TMA-Auswertung eine negative Korrelation von CgA und SSTR2 mit der STAT3-Aktivität gezeigt werden (Abbildung 4.25, 4.26). Je höher die STAT3-Aktivität ist, desto weniger differenziert sind die NET. Dieses Ergebnis passt ebenso zu der Hypothese, dass CAF über eine erhöhte STAT3-Aktivierung die Proliferation und De-Differenzierung von NET stimulieren. Hier gilt es als nächsten Schritt herauszufinden, ob die NET-Zelllinien nach STAT3-Inhibition einen differenzierteren Phänotyp aufweisen. Dafür sind weitere Versuche in zukünftigen Projekten notwendig, um die Interaktion zwischen CAF und NET weiter zu untersuchen.

Eine Epitheliale-Mesenchymale-Transition ist ein häufig anzutreffendes Phänomen in verschiedenen Tumoren. Die Theorie beschreibt eine Phänotyp-Veränderung der Tumorzellen vom epithelialen zum mesenchymalen Charakter, wodurch es zur Reduktion des Zell-Zell-Kontaktes und somit zur erhöhten Migration und Gefäßinvasion mit vermehrter Metastasierung kommt (Fischer et al. 2015). Ein Kennzeichen der EMT ist die verminderte Expression von E-Cadherin, einem Protein, das dem Zell-Zell-Kontakt dient (Birchmeier and Behrens 1994) und die Hochregulation von Vimentin, einem Intermediärfilament (Ivaska 2011). Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, trifft diese Aussage auf die NT-3 Zellen nur begrenzt zu. Wie erwartet, kommt es zur Hochregulierung von Vimentin, allerdings ebenso von E-Cadherin. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die NT-3 Zellen durch konditioniertes Medium aus CAF, eine Transformation in den EMT-Zwischentyp mit epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften erfahren (Woodward et al. 1998). Jedoch ist zur Bestimmung der Expression von E-Cadherin die Proteinexpression die bessere Methode als die Genexpression, da es hauptsächlich über post-translationale Prozesse reguliert wird (Geng et al. 2012). Diesen Effekt haben wir jedoch bei reduzierter Relevanz nicht untersucht.

Für die BON Zellen konnte dahingegen eine signifikant verminderte Vimentin-Expression und eine nicht signifikant erhöhte E-Cadherin-Expression beobachtet werden, die einen epithelialen Zelltypen darstellt (Abbildung 4.7). Durch die Ko-Kultur konnten diese Effekte ebenso gezeigt werden, jedoch zeigten sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse (Abbildung 4.8).

Zusammenfassend ist den qPCR-Versuchen zu entnehmen, dass die CAF zwar eine De-Differenzierung in NET verursachen, jedoch im Gegensatz zu anderen Tumoren, wie dem Mamma- und Prostatakarzinom, nicht eindeutig für eine EMT in NET verantwortlich sind (Geary et al. 2014; Yu et al. 2014).

5.3 Beeinflussung des Therapieansprechens der NET durch CAF

Auch konnte in diesem Projekt eine Therapieresistenz gegen Everolimus in NET (Abbildung 4.12, 4.13) durch vermehrte STAT3-Aktivierung durch CAF (Abbildung 4.18) gezeigt werden. Da Everolimus ein Bestandteil der zielgerichteten Therapie bei NET, laut RADIANT-4-Studie vor allem der GEP-NET, darstellt (Yao et al. 2016) und die Resistenz gegen Everolimus in NET aktuell Bestandteil der Forschung laut Nölting et al. ist, wurde Everolimus für die Analyse des Therapieansprechens der NT-3 Zellen in diesem Projekt ausgewählt (Prada et al. 2018). Eine Modulation durch die Ko-Kultur hinsichtlich des Everolimusansprechens auf BON-Zellen konnte jedoch nicht konsistent beobachtet werden, weshalb diese für die vertiefte Analyse des Therapieansprechens nicht herangezogen wurden.

Die Resistenz gegenüber Everolimus durch CAF wurde auch durch Xu et al. beim Nierenzellkarzinom beschrieben (Xu et al. 2015). Hier konnte zunächst einmal ein Effekt der CAF auf die Proliferation in zwei verschiedenen NCC-Zelllinien, 786-O und Caki-1, beobachtet werden. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Proliferation in beiden Zelllinien durch die CAF-Ko-Kultur im Vergleich zur Monokultur (Xu et al. 2015). Zusätzlich zu Proliferations-Assays wurde das Therapieansprechen auf Everolimus, einem mTOR-Inhibitor, getestet. In diesem Zusammenhang konnte man eine reduzierte Therapiesensitivität gegenüber Everolimus in beiden mit CAF-Ko-Kultur stimulierten NCC-Zelllinien sehen.

Schließlich konnten Xu et al. mittels Western Blot die stimulierten Signalkaskaden ermitteln. Sie konnten zeigen, dass die Ko-Kultur mit CAF in beiden Zelllinien zu einer vermehrten Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK und AKT führt. In unseren Ko-Kulturen konnten wir aber keine eindeutige Aktivierung des ERK bzw. AKT Signalweges durch die CAF feststellen.

Zusätzlich zu Everolimus besteht der Bedarf zur Analyse des Einflusses von CAF auf weitere Therapeutika, wie Chemotherapie mit Streptozotocin und Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Sunitinib, welche ebenso bei PanNET verwendet werden.

Viele Studien kamen bisher zum Entschluss, dass das Tumorstroma eine Therapieresistenz durch mehrere Mechanismen verursachen kann (Brennen et al. 2012; Fidler et al. 1994; Loeffler et al. 2006). Während es in diesem Projekt zu einer eindeutigen Induktion der STAT3-Aktivierung durch CAF kam, die eine Therapieresistenz verursacht, zeigten sich bei anderen Tumoren ähnliche Induktionen weiterer Signalwege. Die STAT3-Induktion wurde in diesem Projekt dennoch erstmalig am Beispiel der NET gezeigt.

Zunächst konnten Hwang et al. zeigen, dass Pankreaskarzinom-Zellen durch aus Pankreaskarzinom-Fibroblasten stammendem konditioniertem Medium resistent gegen Gemcitabin werden. Dieser Effekt wird darauf zurück geführt, dass es zu einer erhöhten Aktivierung von ERK und AKT kommt (Hwang et al. 2008; Takebe et al. 2013).

Eine weitere Studie analysierte den Effekt von CAF auf verschiedene Zelllinien des Kolorektalen Karzinoms (CRC) bezüglich des Therapieansprechens auf 5-FU und Oxaliplatin (Gonçalves-Ribeiro et al. 2016). Gonçalves-Ribeiro et al. konnten in verschiedenen CRC-Zelllinien ein erhöhtes Überleben nach Stimulation mit konditioniertem Medium aus CAF im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigen.

Auch konnte mittels Western Blot-Analyse eine erhöhte Phosphorylierung und damit auch Aktivierung von AKT und STAT3 durch das konditionierte Medium aus CAF, trotz Therapie mit 5-FU und Oxaliplatin, ermittelt werden. Zudem konnte eine erhöhte Therapiesensitivität hinsichtlich 5-FU und Oxaliplatin nach STAT3-Inhibierung in zwei verschiedenen Zelllinien, HT29 und HTOXAR3, erreicht werden (Gonçalves-Ribeiro et al. 2016).

Es bestehen mehrere Theorien hinsichtlich der CAF-assoziierten Therapieresistenz von Tumoren. Zunächst gibt es die Theorie der „*cell adhesion mediated drug resistance*“ (CAM-DR), die vor allem bei Myelomzellen beobachtet wurde. Diese binden an Fibronectin der ECM und verursachen so eine Resistenz gegenüber Melphalan (Hazlehurst and Dalton 2001). Nicht nur in Myelomzellen, sondern auch in anderen Malignitäten, wie dem nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, dem Melanom und dem Ovarialkarzinom, konnte die CAM-DR beobachtet werden (Bérubé et al. 2005; Fukunaga-Kalabis et al. 2010; Kuzet and Gaggioli 2016; Sethi et al. 1999; Sherman-Baust et al. 2003).

Weiterhin führt der unmittelbare Kontakt zwischen Tumor- und Stromazellen zur verminderten Therapiesensitivität, beispielsweise bei Melanomzellen laut Li G et al. Hier konnte über eine Expression von N-Cadherin der Zell-Zell-Kontakt zwischen Melanom-Zellen und Fibroblasten gewährleistet werden. Dies führte über eine Aktivierung vom AKT-Signalweg zum vermehrten Überleben. Zudem konnte eine vermehrte Migration der Melanom-Zellen, die in direktem Kontakt mit Fibroblasten waren, beobachtet werden, im Gegensatz zu Melanom-Zellen, die nicht in Kontakt mit Fibroblasten waren. Durch N-Cadherin-Blockade konnte die Migration verringert werden. Dies unterstreicht den Effekt der N-Cadherin induzierten Migration der Melanom-Zellen (Li, Satyamoorthy, and Herlyn 2001). Hier ist anzustreben, auch direkte Ko-Kultur-Versuche durchzuführen, da diese den Kontakt zwischen CAF und NET-Zellen ermöglichen und so eventuell weitere Auswirkungen der NET-CAF-Interaktion zeigen.

Wachstumsfaktoren spielen ebenso eine wichtige Rolle in der Therapieresistenz von Tumoren. Diese können einerseits vom Tumor selbst sezerniert werden, andererseits auch von den umgebenden Tumorfibroblasten (Straussman et al. 2012; Wilson et al. 2012). So sorgt der Wachstumsfaktor TGF β für eine Resistenz gegenüber Multikinase-Inhibitoren, wie Crizotinib, einem ALK-Inhibitor in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellen oder Vemurafenib, einem BRAF-Inhibitor, in Melanomzellen (L. Huang et al. 2014; S. Huang et al. 2012). Auch führt der Faktor *hepatocyte growth factor* (HGF) zu einer Resistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren (Wilson et al. 2012). Hier wäre es wichtig, den löslichen Faktor zu identifizieren, der für die CAF-bedingte STAT3-Aktivierung und Therapieresistenz in der Tumor-Stroma Interaktion bei NET sorgt, um diesen, als therapeutische Option, z.B. als Kombinationstherapie, gezielt zu inhibieren.

5.4 STAT3-Aktivierung in NET durch CAF

In dieser Arbeit konnte nicht nur der stimulierende Einfluss der CAF auf die NET-Proliferation gezeigt werden, sondern es war auch möglich, den Einfluss auf die Proliferation auf molekularer Ebene nachzuvollziehen. Dadurch dass CAF die STAT3-Aktivierung in NET stimulieren, proliferieren die NET Zellen vermehrt und werden therapieresistenter gegenüber Everolimus. Durch die Hemmung von STAT3 wird eine Reduktion der durch CAF vermehrten Proliferation erreicht (Abbildung 4.9).

Zunächst wurde mittels Western Blot Analysen nach den möglichen durch CAF stimulierten Signalkaskaden gesucht, die für die Phänomene der erhöhten Proliferation und verminderten Therapiesensitivität ursächlich wären. Hierbei konnte eine signifikante Überstimulation und Phosphorylierung von STAT3 durch konditioniertes Medium sowohl in NT-3 als auch in BON Zellen entdeckt werden, während es keinen Einfluss von CAF auf ERK und AKT gab (Abbildung 4.16). Auch hier konnte die Ko-Kultur eine signifikant erhöhte STAT3-Aktivierung in NT-3 Zellen verursachen (Abbildung 4.17).

Weiterhin konnte in den Western Blots der fehlende Effekt von Everolimus auf die STAT3-Aktivierung durch CAF gezeigt werden (Abbildung 4.18). Anders als beim Hepatozellulären Karzinom (HCC), bei dem es durch IL-6 zur Überstimulation von JAK-STAT kommt, konnte bisher kein stimulierender Faktor für NT-3, der gezielt inhibiert werden könnte, gefunden werden (Cheng et al. 2018). In einem separaten Projekt konnten wir dagegen eine Proliferationsinduktion in NT-3 Zellen vorwiegend durch FGF2 zeigen. Korrespondierend hierzu zeigten die NET Zelllinien eine vermehrte FGFR-Expression, insbesondere FGFR1, dem Hauptrezeptor von FGF2. Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass FGF2 von CAF sezerniert wird und seine Wirkung auf NT-3 Zellen ausübt. Daher ist es wichtig, die Expression von FGF2 in CAF in indirekter Ko-Kultur mit NT-3 nachzuweisen.

Um die Relevanz der STAT3 Aktivierung durch CAF für die biologischen Effekte zu zeigen, war es notwendig, in verschiedene Schritte im JAK-STAT3-Signalweg einzugreifen. So konnte Ruxolitinib, ein JAK-Inhibitor, der somit die Phosphorylierung von STAT3 verhindert, in den Versuchen angewandt werden. Bisher findet dieser Jak-Inhibitor im Bereich der Primären Myelofibrose Anwendung (Martí-Carvajal, Anand, and Solà 2015; Plosker 2015). Wie man in den Abbildungen erkennen konnte, führte Ruxolitinib sowohl zur verminderten Ki-67-Positivität (Abbildung 4.21) als auch zur verminderten Zellzahl in MTT-Assays (Abbildung 4.20). Letztlich ist eine weitere Evaluation des Inhibitors im Tiermodell anzustreben.

Dahingegen greift Napabucasin nach STAT3 Phosphorylierung in die Anbindung von pSTAT3 an die DNA an (Sonbol, Ahn, and Bekaii-Saab 2019). Daher war keine Herunterregulierung von pSTAT3 im Western Blot erkennbar (Abbildung 4.19). Beide Inhibitoren heben die durch CAF verursachte Everolimusresistenz über Ki-67-Index-Verringerung und verminderte Zellzahl im MTT-Assay auf. Somit sind auch für Napabucasin, welches bisher beim pankreatischen duktalem Adenokarzinom getestet

wird, Tiermodelle zur weiteren Evaluation bei NET zu empfehlen (Bekaii-Saab et al. 2018; Sonbol, Ahn, and Bekaii-Saab 2019).

Um die mechanistische Relevanz des STAT3-Signalweges zu bestätigen, machten wir uns das Verfahren der siRNA zu Nutze. Dieses neue Verfahren findet neben der Bekämpfung viraler Erkrankungen, wie HIV, auch Anwendung in Phase 1 Studien für verschiedene Tumore (Dana et al. 2017; Devi 2006; Haussecker 2014). Zu den ersten erforschten Therapeutika basierend auf siRNA gehört CALAA-01 in einer klinischen Studie mit 24 Patienten mit Tumoren verschiedenen Ursprungs. Hier richtet sich die siRNA gegen die R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (Zuckerman et al. 2014). Für die NET-Zelllinie konnte eine signifikant verminderte STAT3- Expression sowie der STAT3-abhängig erhöhten Proliferation der NT-3 Zellen gezeigt werden (Abbildung 4.23, 4.24). Dies ermöglicht weitere therapeutische Optionen dieser bislang gering erforschten CAF-vermittelten Therapieresistenz der NET. Mit Hilfe der siRNA kann durch gezielte Herunterregulierung der durch CAF induzierten Signaltransduktion eine verringerte Proliferation und ein besseres Therapieansprechen erreicht werden.

5.5 Unterschiede der CAF in Primarius und Metastasen

Wir haben gefunden, dass CAF über eine STAT3-Aktivierung eine De-Differenzierung in NET Zellen induzieren. Was jedoch weiterhin unbeantwortet bleibt, ist, über welche Faktoren diese Phänomene getriggert werden. Hier ist es von Bedeutung, den CAF Phänotypen hinsichtlich der Expression von CAF Markern und sezernierten Faktoren zu analysieren.

Weiterhin ist es wichtig herauszufinden, ob es einen Unterschied des CAF Phänotypen zwischen Primarius und Metastase gibt. Da wir durch die weiteren Ergebnisse zum Entschluss kamen, dass die Interaktion zwischen CAF und NET über eine STAT3-Aktivierung getriggert wird, ist es auch wichtig, die STAT3-Aktivität zwischen Primarius und Metastase zu untersuchen.

5.5.1 CAF-Phänotyp

CAF-Marker, die in den immunhistochemischen Färbungen nicht, aber in den Immunfluoreszenzfärbungen ermittelt werden konnten, sind neben α SMA und FSP auch FAP und Desmin (Abbildung 4.3). Dadurch, dass nicht genügend CAF aus den NET-Primarii zur Verfügung standen, konnten neben den qPCR- Analysen keine

Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt werden. Daher ist bei dieser Methode kein Vergleich zwischen der Expression der CAF-Marker aus Lebermetastasen und Primarius zu ziehen. Diese Methode diene schließlich nur dem allgemeinen Überblick über die vier Marker in der CAF Zellkultur. Mit der erhöhten α SMA -Positivität, kann man eine erhöhte Aktivität der CAF, wie man diese in der Wundheilung kennt, erklären. Während Desmin in der immunhistochemischen Färbung gar nicht und in der Immunfluoreszenzfärbung nur schwach positiv war, lässt sich dieser, zumindest im Rahmen der NET, nicht als CAF-Marker charakterisieren. Da in beiden Methoden die Expression dieses Antikörpers niedrig ist, kann eine verminderte Expression in den NET-CAF angenommen werden.

Im Gegensatz dazu, ließ sich FAP in der Immunfluoreszenz-Färbung der CAF aus den NET-Lebermetastasen darstellen (Abbildung 4.3), während dieser in der Immunhistochemie weder im Primarius noch in den Lebermetastasen exprimiert wurde (Abbildung nicht gezeigt). Hier sollte – neben der Möglichkeit der fehlenden Expression - ebenso ein technischer Fehler in Betracht gezogen werden.

Schließlich kann, ähnlich der Immunhistochemie, eine erhöhte Expression von α SMA und FSP ermittelt werden (Abbildung 4.3). Da als Vergleich keine normalen Fibroblasten zur Verfügung standen, konnte die Spezifität dieser beiden Marker für CAF nicht evaluiert werden. Es konnte nur eine Bestätigung der erhöhten Aktivität in CAF ohne Vergleich zu einer nicht den CAF angehörenden Fibroblastenkultur gezogen werden. Zur weiteren Charakterisierung der CAF im Rahmen der NET sollte für zukünftige Modelle ein Vergleich zwischen CAF und normalen, nicht-tumor-assoziierten Fibroblasten erfolgen, wie dies bereits im Fall des kutanen Plattenepithelkarzinom durch Commandeur et al. durchgeführt wurde (Commandeur et al. 2011).

5.5.2 α SMA Expression in Primarius und Metastasen

In den immunhistochemischen Färbungen wurden die CAF-Marker α SMA und FSP zur Detektion dieser verwendet (Abbildung 4.1, 4.2). Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, ließen sich Unterschiede hinsichtlich der α SMA-Expression feststellen. Es konnte ein wesentlicher Unterschied zwischen Primarius und Lebermetastasen, zugunsten der Lebermetastasen, ermittelt werden. Diese zeigen eine deutlich höhere Positivität für α SMA im Vergleich zum Primarius. Damit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Lebermetastasen einen größeren Einfluss von CAF erfahren. Wie in

den weiteren Ergebnissen, kamen wir zum Entschluss, dass CAF die Proliferation über eine erhöhte STAT3-Aktivierung induzieren. Dadurch, dass in den Lebermetastasen eine vermehrte Dichte an CAF ist, kann man folgern, dass diese hierdurch mehr proliferieren als der Primarius. Dies wäre eine Erklärung für die bisher von Miller et al. beschriebene Diskrepanz im Ki-67-Proliferationsindex zwischen Primarius und Metastasen (Miller et al. 2014). Auch in unserer TMA Auswertung fand sich eine höhere Ki-67 Positivität in den Metastasen als in den Primarii.

Es stellt sich die Frage, ob metastasierte NET therapieresistenter sind als nicht-metastasierte. Bisher ist der Unterschied des Therapieansprechens von Metastasen und Primarii nicht ausreichend erforscht (Shah, Rejniak, and Gevertz 2016). Der Unterschied in der Aktivität von CAF im Primarius und Lebermetastasen könnte eine höhere Therapieresistenz von metastasierten NET erklären und weitere Studien ermöglichen, die diese zuvor beschriebene Problematik erklären (Kvols et al. 1986).

5.5.3 pSTAT3-Expression in Primarius und Metastasen

Abbildung 4.34 zeigte bei sechs von neun Patienten eine signifikante Steigerung der pSTAT3-Expression in den Lebermetastasen verglichen mit dem Primarius. Dahingegen zeigte sich ein gegenteiliges Ergebnis bei den übrigen drei Patienten. Dies kann an den unterschiedlich geschnittenen Präparaten liegen, die je nach Bereich mehr oder weniger Stroma aufweisen. Jedoch ist ebenso an einen bisher nicht ausreichend untersuchten Zusammenhang zwischen unterschiedlicher Genetik der einzelnen Tumore und ihrer Signalaktivierung zu denken. Ebenso wäre eine genetische Variabilität mit Einfluss auf die Signaltransduktion zwischen Primarius und Metastasen möglich.

Im TMA-Assay konnten keine signifikanten Ergebnisse aus dem Vergleich der pSTAT3- und Ki-67-Expression zwischen NET-Primarii und -Metastasen ermittelt werden. Hierfür könnte die Ursache in der geringen Anzahl von ungefähr 20 Metastasen-Spots liegen, weshalb kein hinreichender Vergleich zwischen Primarius und Metastasen getroffen werden konnte. Ob es hier einen relevanten Unterschied gibt, muss in weiteren Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv geklärt werden.

5.5.4 Mögliche Stimulatoren der erhöhten STAT3-Aktivität durch CAF

In den qPCR Versuchen konnte im Gegensatz zur Immunfluoreszenzfärbung ein Vergleich zwischen CAF-Kulturen aus dem PanNET-Primarius und dessen Lebermetastasen gezogen werden (Abbildung 4.4, 4.5). Allerdings variierten die Expressionen der Wachstumsfaktoren nicht nur zwischen CAF aus dem Primarius und denen aus den Lebermetastasen, sondern ebenso innerhalb der beiden Rubriken. Es konnte kein einheitliches Muster hinsichtlich der Expression von Wachstumsfaktoren ermittelt werden. Betrachtet man die CAF aus dem PanNET-Primarius, so stellt man fest, dass die CAF-Kultur, NT84-P, die meisten Wachstumsfaktoren in hoher Menge exprimiert, verglichen mit den beiden weiteren CAF Kulturen aus dem Primarius, die fast einheitlich die meisten Faktoren in mittlerer oder geringer Menge aufweisen. Ähnliches gilt für die CAF der Lebermetastasen, bei denen die Kultur NT62-LM die Wachstumsfaktoren in höheren Mengen exprimiert. Somit lässt sich aus diesem Versuch schließen, dass es keinen wesentlichen Unterschied zwischen CAF aus dem Primarius und aus den Lebermetastasen gibt, diese sich aber hingegen von Kultur zu Kultur unabhängig vom Ursprung unterscheiden. Somit fand sich bei den untersuchten Wachstumsfaktoren kein einheitliches Muster mit einem dominant in allen CAF-Kulturen exprimierten Wachstumsfaktor oder Zytokin.

Zudem wurde in dem Versuch das basale Expressionsprofil der CAF unabhängig von den NET-Zelllinien untersucht, sodass kein Vergleich zwischen Mono- und Ko-Kultur gezogen werden konnte. Dahingegen konnte als Beispiel des Mammakarzinoms mittels Ko-Kultur eine Charakterisierung von CAF erfolgen. Hier wurde der Phänotyp von Fibroblasten und CAF nach Stimulation durch Zelllinien des Mammakarzinoms analysiert. Es zeigte sich eine Herunterregulierung von Genen der TGF β -Familie, die für Motilität zuständig waren. Die Interpretation des Ergebnisses führte dazu, dass die Fibroblasten durch Herunterregulierung der Motilität weiterhin in Kontakt mit den Tumorzellen verbleiben und die Interaktion dadurch bestehen bliebe (Rozenchan et al. 2009). Nichtsdestotrotz wurde der Effekt von CAF auf Tumorzellen als aussagekräftiger beschrieben, als der Effekt von Tumorzellen auf CAF.

Dementsprechend ist es sinnvoll, in einem separaten Projekt, CAF näher zu charakterisieren und ihren Phänotypen in Abhängigkeit vom Vorhandensein von NET-Zelllinien zu untersuchen. Idealerweise wäre es, die dem Tumor zugehörigen CAF für die Ko-Kultur Versuche zu verwenden. Dies war aufgrund des nicht ausreichenden Bestandes der korrespondierenden CAF-Präparation der NT-3 Zelllinie nicht möglich.

Schließlich wäre die Ermittlung eines bestimmten löslichen Faktors, der von CAF ausgeschüttet wird, von Bedeutung, um diesen eventuell gezielt zu inhibieren. Beispielsweise zeigt sich bei der Interaktion zwischen CAF und Melanomzellen eine vermehrte Sekretion von IL-6 und IL-8, deren Inhibition zur verringerten Invasivität der Melanomzellen führt (Jobe et al. 2016).

Weiterhin konnte auch im Falle des Mammakarzinoms der lösliche Faktor IL-6 in der Interaktion zwischen CAF und Tumorzellen identifiziert werden. Dieser führte laut Mao, Sun et al. durch Aktivierung der JAK/STAT- und Pi3K/AKT-Signalwege zur Resistenz gegenüber Tamoxifen. Dieser Effekt von IL-6 konnte in der Studie durch neutralisierenden Antikörpern und shRNA zur Aufhebung der Tamoxifenresistenz führen (Sun et al. 2014). Weiterhin spielt IL-6 auch eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen CAF und Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Wang et al. 2017). In diesem Projekt konnte dahingegen weder der Effekt von IL-6 (Daten nicht gezeigt) noch anderer löslicher Faktoren durch die geringe Menge an CAF-Kulturen identifiziert werden. Wie für andere Tumore ist es ebenso für die NET von Bedeutung, durch gezielte neutralisierende Antikörper in die Interaktion zwischen CAF und NET einzugreifen. Daher sollte im Rahmen zukünftiger Projekte vermehrt das Expressionsprofil von CAF sowohl in Mono- als auch in Ko-Kultur mit NET-Zelllinien untersucht werden.

5.6 STAT3-Aktivierung in verschiedenen NET

5.6.1 pSTAT3-Expression in verschiedenen Organen

Abbildung 4.27 zeigte unterschiedlich hohe pSTAT3-Expressionen in Pankreas, Lunge und Ileum. Die verminderte Expression im Ileum könnte darauf hindeuten, dass es einen anderen Mechanismus gibt, durch den Ileum-NET Chemotherapie-resistent sind (Scherübl 2010). Nachdem in diesem Projekt der Effekt der CAF auf PanNET untersucht und schließlich bestätigt wurde, ist in weiteren Projekten der Effekt von CAF auf andere NET-Primarii und insbesondere Ileum-NET zu untersuchen. Hierbei ist es von Bedeutung, Ileum-NET-Zelllinien zu kultivieren und auf eine STAT3-Aktivierung durch CAF zu untersuchen.

5.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Tumorstromas auf NET erstmals untersucht. Bisher war die Rolle von CAF bei der Progression anderer Tumorentitäten, wie dem Nierenzellkarzinom, kolorektalen Karzinom oder Pankreaskarzinom gut charakterisiert worden (Gonçalves-Ribeiro et al. 2016; Hwang et al. 2008; Xu et al. 2015). Anhand der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit kann man feststellen, dass CAF eine De-Differenzierung, eine Induktion der Proliferation und eine Verminderung des Therapieansprechens auf Everolimus durch eine STAT3-Überaktivierung in NET verursachen.

Zunächst gilt es, in zukünftigen Studien einen löslichen Faktor der CAF zu identifizieren, um diesen eventuell gezielt zu inhibieren. Hierbei sollten verschiedene Fibroblasten-Kulturen, sowohl aus dem NET-Primarius als auch aus den NET-Lebermetastasen isoliert werden und in Mono- als auch in Ko-Kultur mit NET-Zelllinien hinsichtlich der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren und Interleukine untersucht werden. Nach Identifizierung eines Faktors bietet sich seine zielgerichtete Inhibition durch Antikörper an.

Weiterhin sollten weitere Versuche mit Ko-Kulturen von NET-Zelllinien und CAF zur Evaluation einer Therapieresistenz gegen weiteren Therapien, wie Streptozotocin und 5-FU, erfolgen, um zu evaluieren, ob eine CAF-vermittelte Resistenz auch gegen andere Therapeutika vorliegt (Rougier and Mitry 2000).

Bisher wurde STAT3 im Zusammenhang mit anderen Tumoren, wie dem kolorektalen Karzinom, beschrieben (Gonçalves-Ribeiro et al. 2016). In dieser Arbeit wurde erstmalig eine relevante Rolle von STAT3 in PanNET identifiziert. Nun gilt es, seine Rolle als prognostischen Faktor in NET zu erheben. Dies kann in einem ersten Schritt anhand der Daten des Patientenkollektivs der TMA erfolgen, um klinische Parameter mit der mittels TMA ermittelten STAT3-Expression zu korrelieren.

Die Effekte auf Proliferation und Therapieansprechen konnten durch Inhibitoren gezielt aufgehoben werden. Hier sollten Ruxolitinib und Napabucasin weiter in Tiermodelle im Bereich der NET als therapeutische Optionen evaluiert werden.

Dadurch dass es Unterschiede in der STAT3- und α SMA-Expression zwischen Primarius und Lebermetastasen gibt, gilt es, die Unterschiede zwischen NET-Primarius und NET-Lebermetastasen und ggf. weiteren Metastasierungsorten zu untersuchen, um ggf. eine spezifische Therapie in Abhängigkeit von der Lokalisation der Tumormanifestation einzuleiten.

Schließlich zeigt sich in dieser Arbeit in Ileum-NET eine geringe STAT3-Aktivität verglichen mit PanNET (Abbildung 4.27). Es ist daher wichtig, die CAF-NET-Interaktion auch in weiteren NET, außer dem PanNET, zu untersuchen.

5.8 Fazit

In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von CAF auf NET untersucht und neue potentielle Therapieziele identifiziert. Grundlage dieser neuen Therapiestrategie ist eine Überaktivierung des STAT3-Signalweges in NET durch CAF-Stimulation.

6 Zusammenfassung

Einleitung: CAF machen einen großen Teil der Tumor infiltrierenden Stromazellen aus. Dabei kommt ihnen eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Tumorzellen und Tumorstroma zu. CAF zeigen Merkmale von aktivierten Fibroblasten, die auch während der Wundheilung oder Fibrosierung von Organen zu finden sind. Nach bisherigem Wissensstand fördern CAF die Proliferation, Metastasierung und Therapieresistenz in verschiedenen Tumorentitäten. Es ist jedoch unklar, welchen Einfluss CAF auf NET haben, was in dieser Arbeit erstmalig untersucht wurde.

Methoden: Zur Charakterisierung der CAF wurden Immunfluoreszenz- und Immunhistochemie-Färbungen durchgeführt. Wir nutzten Ko-Kultur-Versuche und konditioniertes Medium aus primären CAF-Kulturen von Lebermetastasen pankreatischer NET, um den Effekt auf die NET-Zelllinien, NT-3 und BON, zu untersuchen. Dabei wurde die Methode der qPCR zur Ermittlung des Expressionsprofils von CAF und NET genutzt. Der Einfluss der CAF auf die Proliferation und das Therapieansprechen der NET wurde mittels MTT- Assay und Ki-67-Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Zur Identifikation der relevanten Signalwegaktivierungen in dieser Tumor-Stroma Interaktion wurden Western Blot Analysen durchgeführt. NET-Gewebeschnitte wurden durch Immunhistochemie untersucht. Zur Ermittlung der Phänomene in einem größeren Patientenkollektiv stand ein NET-TMA zur Verfügung.

Ergebnisse: CAF waren durch eine erhöhte Expression von α SMA charakterisiert. Es fanden sich mehr α SMA positive Zellen in den NET-Lebermetastasen verglichen mit den NET-Primarii. Es fand sich sowohl in CAF aus Lebermetastasen als auch aus CAF von NET-Primarii eine Expression von FGF, Interleukin 8, VEGF-a und SDF-1, ohne dass es jedoch ein spezifisches Muster für CAF aus Lebermetastasen oder NET Primarii gab. Die Ko-Kultur-Versuche führten zu einer verminderten Expression der Differenzierungsmarker SSTR2/5 und erhöhten Expression des Stammzell-Markers CXCR4 in NT-3 und BON Zellen. Die Proliferationsassays zeigten eine Induktion der Proliferation in NT-3 durch eine erhöhte Ki-67-Positivität von 1,5% auf 3,5% sowie erhöhte Phosphorylierung von Rb. Zudem konnten CAF die Therapiesensitivität der NT-3 Zellen auf Everolimus reduzieren. Durch Western Blot konnte eine Überaktivierung von STAT3 nach Stimulation durch CAF nachgewiesen werden. Nach STAT3-Inhibition mit Ruxolitinib, Napabucasin und STAT3-siRNA konnte die Proliferation der NET gesenkt und die CAF- induzierte Therapieresistenz aufgehoben werden. Die TMA-Ergebnisse zeigten eine positive Korrelation zwischen STAT3-Aktivität und Ki-67-Positivität sowie eine negative Korrelation zwischen STAT3-Aktivität und CgA-Expression.

Schlussfolgerung: In dieser Studie wurde erstmalig gezeigt, dass CAF die De-Differenzierung, Proliferation und Therapieresistenz in NET verstärken. Dadurch, dass STAT3 als verursachenden Signalweg identifiziert wurde, bieten sich neue Therapieansätze an, die diesen Weg inhibieren, um die Proliferation in NET und die Therapieresistenz zu verringern. STAT3 kann zudem auf seine prognostische Wertigkeit in NET in weiteren Studien untersucht werden und bietet einen neuen Ansatz zur Ermittlung eines prognostischen Parameters für NET-Patienten.

7 Abstract

Introduction: Carcinoma-associated fibroblasts (CAF) have been identified as relevant contributors to cancer progression and drug resistance for many tumor entities. Although neuroendocrine tumors are often associated with a strong stromal reaction, no study has addressed whether CAF are involved in progression and therapeutic resistance in neuroendocrine tumors (NET).

Materials and methods: We established primary CAF cultures derived from NET liver metastases to study the effect on NET cell lines NT-3 and BON. CAF characterization was examined by immunofluorescence staining and immunohistochemistry of tumor tissue of NET-patients. Phenotype of CAF and NET cells were evaluated by qPCR expression profiles. MTT assay and Ki-67 staining were conducted to examine proliferation and therapeutic response to everolimus in NT-3 and BON cells. Western Blot were used to examine signaling pathways. TMA were conducted to refer the results to a higher number of patients.

Results: CAF could show a high expression of α SMA, especially in NET-liver metastases compared to NET-primary tumors. There was no specific pattern of growth factor or interleukin expression linked to CAF from primary or metastatic lesions. Stimulating NET cell cultures with conditioned media from CAF decreased expression of neuroendocrine markers SSTR2/5 and chromogranin A and induced expression of the pro-metastatic chemokine receptor CXCR-4 in BON and NT-3 cells. Co-Cultured conditioned media stimulated proliferation in NT-3 cells, indicated by an increase in Ki-67 labelling index from 1,5% to 3,5% and an induction of Rb phosphorylation. Treating NT-3 cells with everolimus reduced cell viability, which could be prevented by the addition of conditioned CAF media. Western Blot revealed an activation of STAT3 by conditioned CAF media and CAF co-cultures. STAT3 inhibition by Ruxolitinib, Napabucasin and specific STAT3 siRNA could reduce cell proliferation and restored everolimus responsiveness induced by conditioned CAF media. TMA results could show a positive correlation between STAT3-activation and Ki-67-positivity and a negative correlation between STAT3 activation and CgA-expression in NET.

Conclusion: In conclusion, we could show for the first time, that CAF directly influence proliferation and therapeutic response in neuroendocrine tumor cells. Identifying

STAT3 as the contributing pathway of this so far neglected tumor-stroma interaction has the potential to become a new therapeutic target to halt tumor growth and to restore everolimus responsiveness in NET. Furthermore, a CAF related signature and STAT3 activation have the potential to emerge as novel prognostic factors.

8 Literaturverzeichnis

- Arentz, Georgia et al. 2011. "Desmin Expression in Colorectal Cancer Stroma Correlates with Advanced Stage Disease and Marks Angiogenic Microvessels." *Clinical Proteomics*.
- Bajetta, Emilio et al. 2014. "Everolimus in Combination with Octreotide Long-Acting Repeatable in a First-Line Setting for Patients with Neuroendocrine Tumors: An ITMO Group Study." *Cancer*.
- Bartolini, Ilenia et al. 2018. "Current Management of Pancreatic Neuroendocrine Tumors: From Demolitive Surgery to Observation." *Gastroenterology Research and Practice*.
- Becker, Stefan, Bernd Groner, and Christoph W. Müller. 1998. "Three-Dimensional Structure of the Stat3 β Homodimer Bound to DNA." *Nature*.
- Bekaii-Saab, Tanios S. et al. 2018. "Phase 1b/2 Trial of Cancer Stemness Inhibitor Napabucasin (NAPA) + Nab-Paclitaxel (NPTX) and Gemcitabine (Gem) in Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (MPDAC)." *Journal of Clinical Oncology*.
- Benten, Daniel et al. 2018. "Establishment of the First Well-Differentiated Human Pancreatic Neuroendocrine Tumor Model." *Molecular Cancer Research*.
- Bérubé, Mélanie et al. 2005. "Role of the Extracellular Matrix Proteins in the Resistance of SP6.5 Uveal Melanoma Cells toward Cisplatin." *International journal of oncology*.
- Birchmeier, Walter, and Jürgen Behrens. 1994. "Cadherin Expression in Carcinomas: Role in the Formation of Cell Junctions and the Prevention of Invasiveness." *BBA - Reviews on Cancer*.
- Brennen, W. Nathaniel et al. 2012. "Targeting Carcinoma-Associated Fibroblasts within the Tumor Stroma with a Fibroblast Activation Protein-Activated Prodrug." *Journal of the National Cancer Institute*.
- Brown, Lawrence F. et al. 1999. "Vascular Stroma Formation in Carcinoma in Situ, Invasive Carcinoma, and Metastatic Carcinoma of the Breast." *Clinical Cancer Research*.
- Burns, Jennifer M. et al. 2006. "A Novel Chemokine Receptor for SDF-1 and I-TAC Involved in Cell Survival, Cell Adhesion, and Tumor Development." *Journal of Experimental Medicine*.
- Cao, Huibi et al. 2005. "Down-Regulation of IL-8 Expression in Human Airway

- Epithelial Cells through Helper-Dependent Adenoviral-Mediated RNA Interference." *Cell Research*.
- Capetanaki, Yassemi et al. 2015. "Desmin Related Disease: A Matter of Cell Survival Failure." *Current Opinion in Cell Biology*.
- Caplin, Martyn E. et al. 2014. "Lanreotide in Metastatic Enteropancreatic Neuroendocrine Tumors." *New England Journal of Medicine*.
- Cheng, Yusheng et al. 2018. "Cancer-Associated Fibroblasts Induce PDL1+ Neutrophils through the IL6-STAT3 Pathway That Foster Immune Suppression in Hepatocellular Carcinoma." *Cell Death and Disease*.
- Commandeur, Suzan et al. 2011. "Functional Characterization of Cancer-Associated Fibroblasts of Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma." *Experimental Dermatology*.
- Dana, Hassan et al. 2017. "Molecular Mechanisms and Biological Functions of SiRNA." *International journal of biomedical science : IJBS*.
- Devi, G. R. 2006. "SiRNA-Based Approaches in Cancer Therapy." *Cancer Gene Therapy*.
- Dvorak, Harold F. 2015. "Tumors: Wounds That Do Not Heal-Redux." *Cancer Immunology Research*.
- Endoh, Tamaki, and Takashi Ohtsuki. 2009. "Cellular SiRNA Delivery Using Cell-Penetrating Peptides Modified for Endosomal Escape." *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- EVERS, B. MARK, JIN ISHIZUKA, COURTNEY M. TOWNSEND, and JAMES C. THOMPSON. 1994. "The Human Carcinoid Cell Line, BON: A Model System for the Study of Carcinoid Tumors." *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Fidler, Isaiah J. et al. 1994. "Modulation of Tumor Cell Response to Chemotherapy by the Organ Environment." *Cancer and Metastasis Reviews*.
- Fire, A. et al. 1998. "Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature*.
- Fischer, Kari R. et al. 2015. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Not Required for Lung Metastasis but Contributes to Chemoresistance." *Nature*.
- Fukunaga-Kalabis, M. et al. 2010. "Tenascin-C Promotes Melanoma Progression by Maintaining the ABCB5-Positive Side Population." *Oncogene*.
- Geary, Lauren A. et al. 2014. "CAF-Secreted Annexin A1 Induces Prostate Cancer Cells to Gain Stem Cell-like Features." *Molecular Cancer Research*.

- Geng, Fei et al. 2012. "Multiple Post-Translational Modifications Regulate E-Cadherin Transport during Apoptosis." *Journal of Cell Science*.
- Gerdes, Johannes, Ulrich Schwab, Hilmar Lemke, and Harald Stein. 1983. "Production of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation." *International Journal of Cancer*.
- Gollob, Jared A., Scott Wilhelm, Chris Carter, and Susan L. Kelley. 2006. "Role of Raf Kinase in Cancer: Therapeutic Potential of Targeting the Raf/MEK/ERK Signal Transduction Pathway." *Seminars in Oncology*.
- Gonçalves-Ribeiro, Samuel et al. 2016. "Carcinoma-Associated Fibroblasts Affect Sensitivity to Oxaliplatin and 5FU in Colorectal Cancer Cells." *Oncotarget*.
- Graham, Debra J., J. Jeffrey Alexander, and Remedios Miguel. 1991. "Aortic Endothelial and Smooth Muscle Cell Co-Culture: An in Vitro Model of the Arterial Wall." *Journal of Investigative Surgery*.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell*.
- Harrison, Claire, and Alessandro M. Vannucchi. 2012. "Ruxolitinib: A Potent and Selective Janus Kinase 1 and 2 Inhibitor in Patients with Myelofibrosis. An Update for Clinicians." *Therapeutic Advances in Hematology*.
- Haussecker, D. 2014. "Current Issues of RNAi Therapeutics Delivery and Development." *Journal of Controlled Release*.
- Hay, E. D. 1995. "An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation." *Acta Anatomica*.
- Hazlehurst, Lori A., and William S. Dalton. 2001. "Mechanisms Associated with Cell Adhesion Mediated Drug Resistance (CAM-DR) in Hematopoietic Malignancies." *Cancer and Metastasis Reviews*.
- Hesselgesser, J et al. 1998. "Identification and Characterization of the CXCR4 Chemokine Receptor in Human T Cell Lines: Ligand Binding, Biological Activity, and HIV-1 Infectivity." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Hobday, Timothy J. et al. 2015. "Multicenter Phase II Trial of Temsirolimus and Bevacizumab in Pancreatic Neuroendocrine Tumors." *Journal of Clinical Oncology*.
- Holmes, David I.R., and Ian Zachary. 2005. "The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Family: Angiogenic Factors in Health and Disease." *Genome Biology*.
- Huang, Jia et al. 2011. "Frequent Genetic Abnormalities of the PI3K/AKT Pathway in

- Primary Ovarian Cancer Predict Patient Outcome.” *Genes Chromosomes and Cancer*.
- Huang, Lei et al. 2014. “Cancer-Associated Fibroblasts in Digestive Tumors.” *World Journal of Gastroenterology*.
- Huang, Sidong et al. 2012. “MED12 Controls the Response to Multiple Cancer Drugs through Regulation of TGF- β Receptor Signaling.” *Cell*.
- Hwang, Rosa F. et al. 2008. “Cancer-Associated Stromal Fibroblasts Promote Pancreatic Tumor Progression.” *Cancer Research*.
- Isella, Claudio et al. 2015. “Stromal Contribution to the Colorectal Cancer Transcriptome.” *Nature Genetics*.
- Ivaska, Johanna. 2011. “Vimentin.” *Small GTPases*.
- Jobe, Njainday Pulo et al. 2016. “Simultaneous Blocking of IL-6 and IL-8 Is Sufficient to Fully Inhibit CAF-Induced Human Melanoma Cell Invasiveness.” *Histochemistry and Cell Biology*.
- Kahounová, Zuzana et al. 2018. “The Fibroblast Surface Markers FAP, Anti-Fibroblast, and FSP Are Expressed by Cells of Epithelial Origin and May Be Altered during Epithelial-to-Mesenchymal Transition.” *Cytometry Part A*.
- Kalluri, Raghu. 2016. “The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer.” *Nature Reviews Cancer*.
- Kalluri, Raghu, and Michael Zeisberg. 2006. “Fibroblasts in Cancer.” *Nature Reviews Cancer*.
- Kelgiorgi, Dionysia, and Christos Dervenis. 2017. “Pancreatic Neuroendocrine Tumors: The Basics, the Gray Zone, and the Target.” *F1000Research*.
- Kolch, W. 2000. “Meaningful Relationships: The Regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK Pathway by Protein Interactions.” *Biochemical Journal*.
- Kramer, N. et al. 2017. “Autocrine WNT2 Signaling in Fibroblasts Promotes Colorectal Cancer Progression.” *Oncogene*.
- Kulke, Matthew H, and Hans Scherübl. 2009. “Accomplishments in 2008 in the Management of Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors.” *Gastrointestinal cancer research : GCR*.
- Kuzet, Sanya Eduarda, and Cedric Gaggioli. 2016. “Fibroblast Activation in Cancer: When Seed Fertilizes Soil.” *Cell and Tissue Research*.
- Kvols, Larry K. et al. 1986. “Treatment of the Malignant Carcinoid Syndrome.” *New England Journal of Medicine*.

- Larue, Lionel, Mami Ohsugi, Jens Hirschhausen, and Rolf Kemler. 1994. "E-Cadherin Null Mutant Embryos Fail to Form a Trophoblast Epithelium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Lesurtel, Mickaël et al. 2015. "When Should a Liver Resection Be Performed in Patients with Liver Metastases from Neuroendocrine Tumours? A Systematic Review with Practice Recommendations." *HPB*.
- Leung, David W. et al. 1989. "Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen." *Science*.
- Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn. 2001. "N-Cadherin-Mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells." *Cancer Research*.
- Loeffler, Markus, Jörg A. Krüger, Andreas G. Niethammer, and Ralph A. Reisfeld. 2006. "Targeting Tumor-Associated Fibroblasts Improves Cancer Chemotherapy by Increasing Intratumoral Drug Uptake." *Journal of Clinical Investigation*.
- De Marco, Paola et al. 2016. "GPER Signalling in Both Cancer-Associated Fibroblasts and Breast Cancer Cells Mediates a Feedforward IL1 β /IL1R1 Response." *Scientific Reports*.
- Martí-Carvajal, Arturo J., Vidhu Anand, and Ivan Solà. 2015. "Janus Kinase-1 and Janus Kinase-2 Inhibitors for Treating Myelofibrosis." *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Merrilees, M. J., and Lesley Scott. 1981. "Interaction of Aortic Endothelial and Smooth Muscle Cells in Culture Effect on Glycosaminoglycan Levels." *Atherosclerosis*.
- Miller, H. C. et al. 2014. "Role of Ki-67 Proliferation Index in the Assessment of Patients with Neuroendocrine Neoplasias Regarding the Stage of Disease." *World Journal of Surgery*.
- Muise-Helmericks, Robin C. et al. 1998. "Cyclin D Expression Is Controlled Post-Transcriptionally via a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Pathway." *Journal of Biological Chemistry*.
- Murphy, M. Stephen. 1998. "Growth Factors and the Gastrointestinal Tract." In *Nutrition*.
- Nakamura, Toshikazu, and Shinya Mizuno. 2010. "The Discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and Its Significance for Cell Biology, Life Sciences and Clinical Medicine." *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and*

Biological Sciences.

- Nobels, Frank R.E. et al. 1997. "Chromogranin A as Serum Marker for Neuroendocrine Neoplasia: Comparison with Neuron-Specific Enolase and the α -Subunit of Glycoprotein Hormones." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
- Nurmik, Martin et al. 2019. "In Search of Definitions: Cancer-Associated Fibroblasts and Their Markers." *International Journal of Cancer*.
- Öhlund, Daniel, Ela Elyada, and David Tuveson. 2014. "Fibroblast Heterogeneity in the Cancer Wound." *Journal of Experimental Medicine*.
- Orimo, Akira et al. 2005. "Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion." *Cell*.
- Ornitz, D., and P. Sannes. 2006. "Fibroblast Growth Factors." In *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set*,.
- Paraiso, Kim H.T., and Keiran S.M. Smalley. 2013. "Fibroblast-Mediated Drug Resistance in Cancer." *Biochemical Pharmacology*.
- Plosker, Greg L. 2015. "Ruxolitinib: A Review of Its Use in Patients with Myelofibrosis." *Drugs*.
- Prada, Elke Tatjana Aristizabal et al. 2018. "The Role of GSK3 and Its Reversal with GSK3 Antagonism in Everolimus Resistance." *Endocrine-Related Cancer*.
- Raj, Nitya, and Diane Reidy-Lagunes. 2018. "The Role of 68Ga-DOTATATE Positron Emission Tomography/Computed Tomography in Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors: A Case-Based Approach Illustrates Potential Benefits and Challenges." *Pancreas*.
- Raymond, Eric et al. 2011. "Sunitinib Malate for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors." *New England Journal of Medicine*.
- Rock, Jason R. et al. 2011. "Multiple Stromal Populations Contribute to Pulmonary Fibrosis without Evidence for Epithelial to Mesenchymal Transition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Rodemann, H. Peter, and Gerhard A. Müller. 1991. "Characterization of Human Renal Fibroblasts in Health and Disease: II. In Vitro Growth, Differentiation, and Collagen Synthesis of Fibroblasts From Kidneys With Interstitial Fibrosis." *American Journal of Kidney Diseases*.
- Rønnov-Jessen, L, and O W Petersen. 1993. "Induction of Alpha-Smooth Muscle

- Actin by Transforming Growth Factor-Beta 1 in Quiescent Human Breast Gland Fibroblasts. Implications for Myofibroblast Generation in Breast Neoplasia.” *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*.
- Roskoski, Robert. 2007. “Sunitinib: A VEGF and PDGF Receptor Protein Kinase and Angiogenesis Inhibitor.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Rougier, Philippe, and Emmanuel Mitry. 2000. “Chemotherapy in the Treatment of Neuroendocrine Malignant Tumors.” In *Digestion*,.
- Roviello, Giandomenico et al. 2016. “Role of Targeted Agents in Neuroendocrine Tumors: Results from a Meta-Analysis.” *Cancer Biology and Therapy*.
- Rozenchan, Patricia Bortman et al. 2009. “Reciprocal Changes in Gene Expression Profiles of Cocultured Breast Epithelial Cells and Primary Fibroblasts.” *International Journal of Cancer*.
- “S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore.” 2018. *Zeitschrift für Gastroenterologie*.
- Sánchez-Tilló, E. et al. 2010. “ZEB1 Represses E-Cadherin and Induces an EMT by Recruiting the SWI/SNF Chromatin-Remodeling Protein BRG1.” *Oncogene*.
- Sappino, A. -P et al. 1988. “Smooth-muscle Differentiation in Stromal Cells of Malignant and Non-malignant Breast Tissues.” *International Journal of Cancer*.
- Sawyers, Charles. 2004. “Targeted Cancer Therapy.” *Nature*.
- Scherübl, Hans. 2010. “Neuroendocrine Tumors of the Small Bowels Are on the Rise: Early Aspects and Management.” *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy*.
- Sethi, Tariq et al. 1999. “Extracellular Matrix Proteins Protect Small Cell Lung Cancer Cells against Apoptosis: A Mechanism for Small Cell Lung Cancer Growth and Drug Resistance in Vivo.” *Nature Medicine*.
- Shah, Ami B., Katarzyna A. Rejniak, and Jana L. Gevertz. 2016. “Limiting the Development of Anti-Cancer Drug Resistance in a Spatial Model of Micrometastases.” *Mathematical Biosciences and Engineering*.
- Shao, Zhi Ming, Mai Nguyen, and Sanford H. Barsky. 2000. “Human Breast Carcinoma Desmoplasia Is PDGF Initiated.” *Oncogene*.
- Sherman-Baust, Cheryl A. et al. 2003. “Remodeling of the Extracellular Matrix through Overexpression of Collagen VI Contributes to Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells.” *Cancer Cell*.
- Shuai, Ke et al. 1994. “Interferon Activation of the Transcription Factor Stat91 Involves Dimerization through SH2-Phosphotyrosyl Peptide Interactions.” *Cell*.

- Shukla, Sanjeev et al. 2007. "Activation of PI3K-Akt Signaling Pathway Promotes Prostate Cancer Cell Invasion." *International Journal of Cancer*.
- Sonbol, Mohamad B., Daniel H. Ahn, and Tanios Bekaii-Saab. 2019. "Therapeutic Targeting Strategies of Cancer Stem Cells in Gastrointestinal Malignancies." *Biomedicines*.
- Stenger, Anya-Maria, A. Frilling, and C. E. Broelsch. 1997. "Somatostatinrezeptorsubtypen Bei Endokrinen Tumoren." In *Chirurgisches Forum '97 Für Experimentelle Und Klinische Forschung*,.
- Straussman, Ravid et al. 2012. "Tumour Micro-Environment Elicits Innate Resistance to RAF Inhibitors through HGF Secretion." *Nature*.
- Strutz, Frank et al. 2000. "Basic Fibroblast Growth Factor Expression Is Increased in Human Renal Fibrogenesis and May Mediate Autocrine Fibroblast Proliferation." In *Kidney International*,.
- Sugimoto, Hikaru, Thomas M. Mundel, Mark W. Kieran, and Raghu Kalluri. 2006. "Identification of Fibroblast Heterogeneity in the Tumor Microenvironment." *Cancer Biology and Therapy*.
- Sun, X et al. 2014. "IL-6 Secreted by Cancer-Associated Fibroblasts Induces Tamoxifen Resistance in Luminal Breast Cancer." *Oncogene*.
- Takebe, Naoko et al. 2013. "Review of Cancer – Associated Fibroblasts and Therapies That Interfere with Their Activity." *Tumor Microenvironment and Therapy*.
- Tamura, M. et al. 1993. "Enhancement of Human Hepatocyte Growth Factor Production by Interleukin- 1 α and -1 β and Tumor Necrosis Factor- α by Fibroblasts in Culture." *Journal of Biological Chemistry*.
- Thiery, Jean Paul. 2002. "Epithelial–Mesenchymal Transitions in Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer*.
- Tomasek, James J. et al. 2002. "Myofibroblasts and Mechano: Regulation of Connective Tissue Remodelling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Tseng, Scheffer C.G., Friedrich E. Kruse, Jenifer Merritt, and De Quan Li. 1996. "Comparison between Serum-Free and Fibroblast-Cocultured Single-Cell Clonal Culture Systems: Evidence Showing That Epithelial Anti-Apoptotic Activity Is Present in 3T3 Fibroblast-Conditioned Media." *Current Eye Research*.
- Tunggal, Judith A. et al. 2005. "E-Cadherin Is Essential for in Vivo Epidermal Barrier Function by Regulating Tight Junctions." *EMBO Journal*.

- Ueda, Takeshi, Nicholas Bruchovsky, and Marianne D. Sadar. 2002. "Activation of the Androgen Receptor N-Terminal Domain by Interleukin-6 via MAPK and STAT3 Signal Transduction Pathways." *Journal of Biological Chemistry*.
- Vélez-Cruz, Renier, and David G. Johnson. 2017. "The Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor: Pushing Back against Genome Instability on Multiple Fronts." *International Journal of Molecular Sciences*.
- Wang, Limin et al. 2017. "Cancer-Associated Fibroblasts Enhance Metastatic Potential of Lung Cancer Cells through IL-6/STAT3 Signaling Pathway." *Oncotarget*.
- Wilson, Timothy R. et al. 2012. "Widespread Potential for Growth-Factor-Driven Resistance to Anticancer Kinase Inhibitors." *Nature*.
- Woodward, T. L. et al. 1998. "Deficient Epithelial-Fibroblast Heterocellular Gap Junction Communication Can Be Overcome by Co-Culture with an Intermediate Cell Type but Not by E-Cadherin Transgene Expression." *Journal of Cell Science*.
- Xu, Yunze et al. 2015. "RETRACTED ARTICLE:Cancer-Associated Fibroblasts Promote Renal Cell Carcinoma Progression." *Tumor Biology*.
- Yao, James C. et al. 2008. "One Hundred Years after 'Carcinoid': Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States." *Journal of Clinical Oncology*.
- . 2011. "Everolimus for Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors." *New England Journal of Medicine*.
- . 2016. "Everolimus for the Treatment of Advanced, Non-Functional Neuroendocrine Tumours of the Lung or Gastrointestinal Tract (RADIANT-4): A Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Study." *The Lancet*.
- Yu, Y. et al. 2014. "Cancer-Associated Fibroblasts Induce Epithelial-Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells through Paracrine TGF- β Signalling." *British Journal of Cancer*.
- Zeisberg, Elisabeth M. et al. 2007. "Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts." *Cancer Research*.
- Zuckerman, Jonathan E. et al. 2014. "Correlating Animal and Human Phase Ia/Ib Clinical Data with CALAA-01, a Targeted, Polymer-Based Nanoparticle Containing siRNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America.

9 Publikationsliste

9.1 Posterbeitrag und Abstract

Cancer associated fibroblasts stimulate proliferation and induce resistance to everolimus in Neuroendocrine Tumor Cells

Amin T., Viol F., Eggers C., Izbicki J., Lohse A., Schrader J.; Neuroendocrinology 2019; 108: 1-273, Basic Science- in vitro models, tumor growth, CTC (B01) „ENETS 2019“, Travel grant ENETS 2019

9.2 Ko-Autorenschaft

Homogeneous MMR Deficiency Throughout the Entire Tumor Mass Occurs in a Subset of Colorectal Neuroendocrine Carcinomas

Fraune C, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, Amin T, Viol F, Fehrle W, Dum D, Höflmayer D, Burandt E, Clauditz T, Perez D, Izbicki J, Wilczak W, Sauter G, Steurer S, Schrader J.; Endocrine Pathology (2020)

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich jedem Menschen danken, der mir bei der Durchführung dieser experimentellen Arbeit jederzeit beigestanden hat. Diese Menschen waren mir stets eine Hilfe beim praktischen Arbeiten im Labor, beim Verfassen der Dissertation sowie Anfertigung meiner ersten Erstautorenschaft einer Publikation.

An vorrangiger Stelle möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD. Dr. Jörg Schrader für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas und des Arbeitsplatzes mit optimalen Arbeitsbedingungen herzlich danken. Jederzeit stand er mir mit wertvollen Ratschlägen zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen. Er förderte mich stets und unterstützte mich an der Teilnahme an der ENETS-Konferenz im März 2019. Das Durchführen dieses Projektes hat mein Studium bereichert und die Wahl meiner Facharztausbildung beeinflusst.

Mein ausdrücklicher Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Ansgar W. Lohse sowie Herrn Prof. Dr. Samuel Huber für die Durchführung der Promotion in der Klinik. Außerdem bedanke ich mich bei PD. Dr. Daniel Benten für die fachliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gebührt Martina Fahl für die hervorragende Einarbeitung in die Laborarbeit und für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe. Mein Dank gilt auch Fabrice Viol für die umfassende Unterstützung in der Auswertung und Darstellung der Ergebnisse. Herzlichen Dank an Corinna Eggers für die Einweisung in die Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Färbungen. Bei dieser Gelegenheit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der I. Medizinischen Klinik für die Beantwortung meiner Fragen.

Ganz besonders möchte ich meinen Dank auch meinen Freunden Fayez Awwad und Sajeda Kailani für den privaten Rückhalt, motivierenden Worte und in der Unterstützung der statistischen Auswertung aussprechen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Samira und Saad Amin, sowie meinen Schwestern, Dina und Roua Amin, für die Rücksichtnahme, unaufhörliche Unterstützung in aller Hinsicht und für die uneingeschränkten Aufmunterungen bedanken.

11 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: