

Einfluss epigenetischer Modulatoren auf neuroendokrine Tumorzelllinien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jan Kleilein

Betreuer: Prof. Dr. med. Patrick Michl

Prof. Dr. rer. nat. Stefan Hüttelmaier

Gutachterin/Gutachter:

Prof. Dr. med. Kerstin Lorenz, Halle (Saale)

PD Dr. med. Marcus Hollenbach, Marburg

Datum der Verteidigung: 12.12.2025

Referat

Neuroendokrine Tumore (NET) sind eine seltene Tumorentität, bei denen in fortgeschrittenen Stadien noch keine langfristige Krankheitskontrolle gelingt. Im Verlauf der Erkrankung kommt es häufig zu einem Progress aufgrund sekundärer Resistenzen. Da in diesen Tumoren Alterationen in epigenetischen Prozessen an der Tumorprogression beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit die Wirkung der epigenetischen Modulatoren Panobinostat, 5-Azacytidin und Valproat auf die pankreatischen NET-Zelllinien BON-1 und QGP-1 untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war hierbei die Untersuchung der Wirkungen auf die Zellen und die Untersuchung möglicher Synergien für Kombinationstherapien.

Zur Charakterisierung des Phänotyps unter Therapie wurden Zellviabilität, Proliferation, Apoptose und in NET wichtige Signalwege, wie zum Beispiel der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, auf Proteinebene detailliert betrachtet. Während sich unter Therapie mit Valproat und 5-Azacytidin kein Einfluss auf Zellviabilität und Wachstum zeigte, konnte durch Panobinostat bereits in niedrigen Konzentrationen ein deutlicher Effekt auf diese Parameter in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Wirkung wurde *in-vitro* durch Induktion von Apoptose erreicht. Eine Therapie mit Panobinostat ist somit ein interessanter Ansatz, der in weiteren Untersuchungen und in anderen NET-Modellen bestätigt werden sollte. Untersuchungen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs als zentralen Signalweg in pNET ließen keinen Einfluss von Panobinostat auf Synthese oder Aktivität der beteiligten Proteine erkennen. Auch bei der Untersuchung weiterer Differenzierungsmarker zeigten sich lediglich Hinweise auf eine zunehmende Tendenz der Expression von SSTR2. Ansatzpunkte für Synergien bei Kombinationstherapien ließen sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht mit ausreichender Sicherheit ableiten.

Die Wirkung von Panobinostat sollte in weiteren Modellen mit geringeren Unterschieden zu den Primärtumoren bestätigt werden, da es ein vielversprechendes Medikament für die Therapie von NET in Kombination mit weiteren Substraten darstellen kann.

Kleilein, Jan: Einfluss epigenetischer Modulatoren auf neuroendokrine Tumorzelllinien, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 58 Seiten, 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pankreatische Neuroendokrine Tumore.....	1
1.2	Epigenetik	4
1.3	Epigenetische Modulatoren.....	5
1.3.1	5-Azacytidin	6
1.3.2	Panobinostat	6
1.3.3	Valproat.....	6
2	Zielstellung.....	7
3	Material und Methodik.....	8
3.1	Material.....	8
3.1.1	Zelllinien	8
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	8
3.1.3	Antikörper	9
3.1.4	Primer.....	11
3.1.5	Kits.....	11
3.1.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
3.1.7	Software	12
3.2	Zellbiologische Methoden.....	13
3.2.1	Kultivierung humaner Zellen.....	13
3.2.2	Behandlung mit Medikamenten.....	13
3.2.3	Proliferationsanalyse mittels Zellzählung	13
3.2.4	Zellviabilitätsassay.....	14
3.3	Proteinbiochemische Methoden	14
3.3.1	Behandlung und Zellernte	14
3.3.2	Zelllyse und Proteinbestimmung	14
3.3.3	SDS-PAGE.....	14
3.3.4	Western Blot.....	15

3.4	Molekularbiologische Methoden.....	16
3.4.1	RNA-Isolation	16
3.4.2	cDNA-Synthese	16
3.4.3	Quantitative Real-Time PCR.....	16
3.5	Durchflusszytometrische Methoden	17
3.5.1	Zellzyklusanalyse.....	17
3.5.2	Apoptosenachweis mit Annexin-V-Färbung	18
3.6	Statistische Auswertung.....	19
4	Ergebnisse.....	20
4.1	Einfluss auf die Zellviabilität	20
4.2	Überprüfung der Wirkung von Panobinostat	23
4.3	Einfluss auf die Zellproliferation.....	24
4.3.1	Zellzählung	24
4.3.2	Zellzyklusanalyse.....	27
4.3.3	Proliferationsmarker auf Proteinebene	29
4.4	Untersuchung der Apoptose	32
4.4.1	Annexin-V-Färbung	32
4.4.2	Untersuchung der Apoptose auf Proteinebene.....	35
4.5	Einfluss auf den mTOR-Signalweg und Zelladhäsionsproteine.....	36
4.6	Expression der Somatostatinrezeptoren auf RNA-Ebene	39
5	Diskussion	40
5.1	Einfluss auf die Zellviabilität	40
5.2	Beurteilung der Einflüsse auf den mTOR-Signalweg und auf Zelladhäsionsproteine	42
5.3	Einfluss auf die Expression von SSTR1, 2 und 5	43
5.4	Allgemeine Bewertung und Limitationen	44
6	Literaturverzeichnis.....	47
7	Thesen	57

Abkürzungsverzeichnis

AKT	AKT Serine/Threonin Kinase 1
AML	Akute myeloische Leukämie
ATRX	<i>ATRX Chromatin Remodeler</i>
Bcl-2	BCL2 Apoptoseregulator
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	<i>Cycline Dependent Kinase</i>
CT	Computertomographie
DAPK1	<i>Death associated protein kinase 1</i>
DAXX	<i>Death Domain Associated Protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EZH2	<i>Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
FBS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie, Typ 1

<i>MEN1</i>	Menin 1 (Gen)
MLL3	Lysin Methyltransferase 2C
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
NEC	Neuroendokrines Karzinom
NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NET	Neuroendokriner Tumor
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissionstomographie
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
pNET	Pankreatischer neuroendokriner Tumor
PRRT	Peptid-Rezeptor vermittelte Radionuklid-Therapie
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SETD2	<i>SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase</i>
SSA	Somatostatinanalogon
TSC2	<i>TSC Complex Subunit 2</i>
TP53	Tumor Protein P53
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid

1 Einleitung

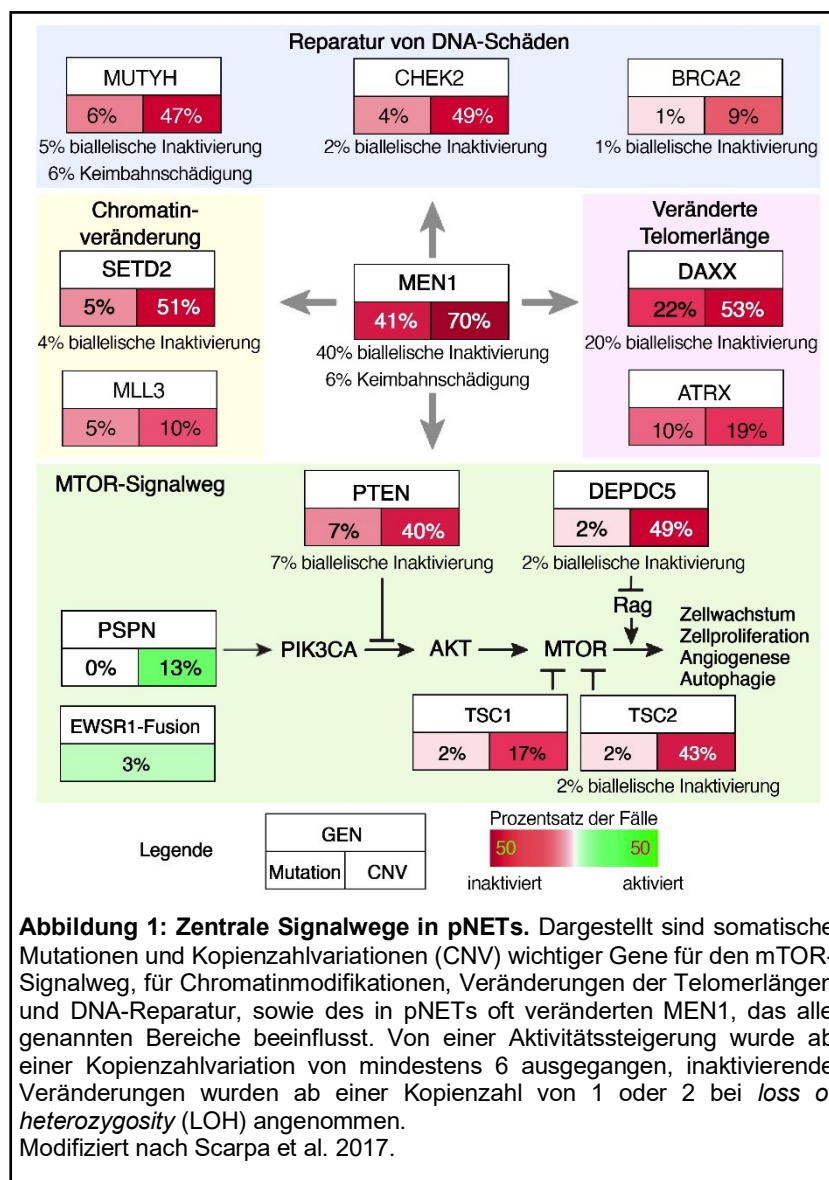
1.1 Pankreatische Neuroendokrine Tumore

Neuroendokrine Tumore (NETs) sind seltene Neoplasien, die vor allem im Magen-Darm-Trakt auftreten. Eine mögliche Tumorlokalisation ist das Pankreas, in dem gemäß einer Datenerhebung des Deutschen Registers NET von 1999 bis 2010 34,2% aller registrierten NETs festgestellt wurden (Begum et al. 2014). Sie können sowohl sporadisch als auch im Rahmen des multiple endokrine Neoplasien-Syndroms Typ 1 (MEN1) bei einer Keimbahnmutation des *MEN1*-Gens auftreten. Man unterscheidet funktionell aktive Tumoren mit Hormonsekretion von funktionell inaktiven Tumoren. Erstere können anhand des sezernierten Hormons weiter unterteilt werden. Nennenswert sind hierbei unter anderem Gastrinome, Insulinome, VIPome und Glucagonome. Während die Hormonsekretion schon frühzeitig unter anderem gastrointestinale Symptome verursachen kann, treten bei funktionell inaktiven Tumoren die Symptome erst durch das lokale Wachstum auf.

Histopathologisch müssen zunächst morphologisch schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC) von gut differenzierten NETs unterschieden werden. Das *Grading* eines NET erfolgt anhand des Ki-67-Index (World Health Organization 2019). Bei diesem wird das in proliferierenden Zellen im Nukleus nachweisbare Ki-67-Protein immunhistochemisch angefärbt, wodurch der Anteil der Zellen mit aktivem Zellzyklus bestimmt werden kann (Gerdes et al. 1983). Eine immunhistochemische Bestimmung der neuroendokrinen Marker Synaptophysin und Chromogranin A sollte erfolgen, um das Vorliegen einer neuroendokrinen Neoplasie (NEN) nachzuweisen (Perren et al. 2017). Nur bei Verdacht auf einen funktionell aktiven Tumor ist eine erweiterte Hormondiagnostik erforderlich. Nach Erstdiagnose eines pankreatischen NET (pNET) sollte ein *Staging*-CT oder -MRT durchgeführt werden und bei NET G1-G3 ein Gallium⁶⁸-PET mit Kopplung des Galliums an ein für Somatostatinrezeptoren (SSTR) spezifisches Protein erfolgen (Rinke et al. 2018).

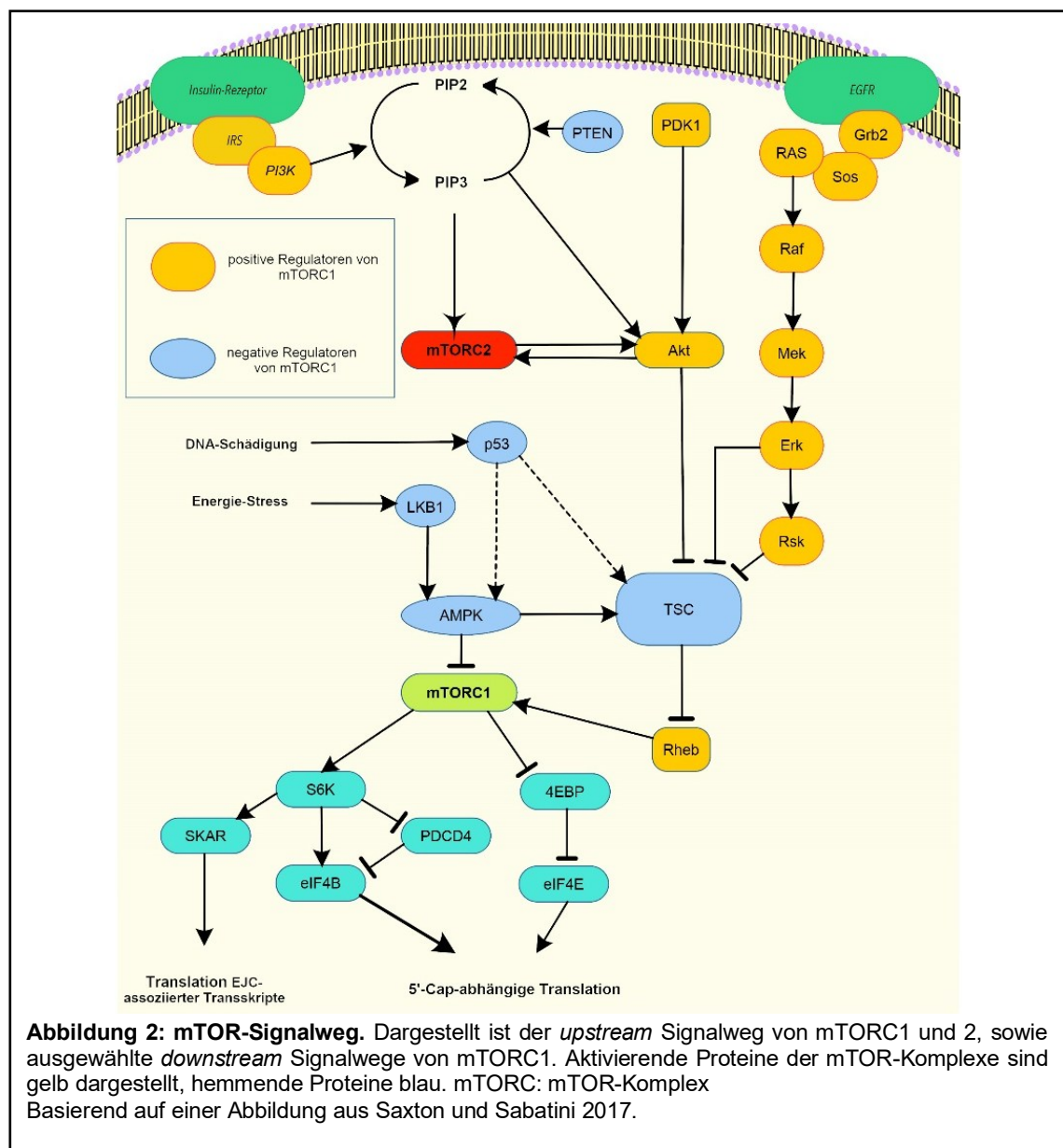
Aufgrund der Heterogenität in Lokalisation und Dignität ist die Therapie der NET komplex. Wenn die vollständige chirurgische Resektion nicht möglich ist, können abhängig von Lokalisation und Differenzierungsgrad unterschiedliche medikamentöse Therapiekonzepte angewendet werden. Hierbei unterscheiden sich die Therapieschemata von pankreatischen und intestinalen NETs teilweise. Für die Therapie von pNETs sind Somatostatinanaloga (SSA) bei gut differenzierten G1/G2 Tumoren mit einem Ki-67-Index von <10% und einem Nachweis von SSTRs von Bedeutung. Bei Progression unter Gabe von SSA oder Risikofaktoren wie einer großen Tumorlast ist eine Kombinationschemotherapie mit Streptozotocin und 5-Fluoruracil oder alternativ eine orale Therapie mit Temozolomid/Capecitabine etabliert (Kunz et al. 2023). Als *second-line* Therapie nach SSA-Gabe oder Chemotherapie bzw. als *third-line* Therapie nach SSA

und Chemotherapie stehen als systemische Optionen die Gabe des mTOR-Inhibitors Everolimus oder des Tyrosinkinaseinhibitors Sunitinib sowie eine Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie (PRRT) bei SSTR-positiven Tumoren zur Auswahl (Rinke et al. 2018). Bei der kombinierten Chemotherapie zeigten sich in neueren Studien Remissionsraten von etwa 30 – 40% bei signifikant verlängertem progressionsfreiem Überleben (Clewemar Antonodimitrakis et al. 2016; Dilz et al. 2015; Krug et al. 2015). Auch wenn das Gesamtüberleben dabei um einige Monate verlängert werden konnte, sind die Fortschritte in der Therapie der metastasierten Erkrankungen noch nicht zufriedenstellend.



Aus diesem Grund wurden NETs zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte zunehmend auf genetischer und Proteinebene erforscht. Hierbei zeigten sich vermehrt Mutationen in Genen, die eine Rolle in der Regulation der Epigenetik spielen. Zu nennen sind hier vor allem *DAXX* und *ATRX*, die bei mehr als einem Drittel der Tumoren mutiert sind (Scarpa et al. 2017; Jiao et al.

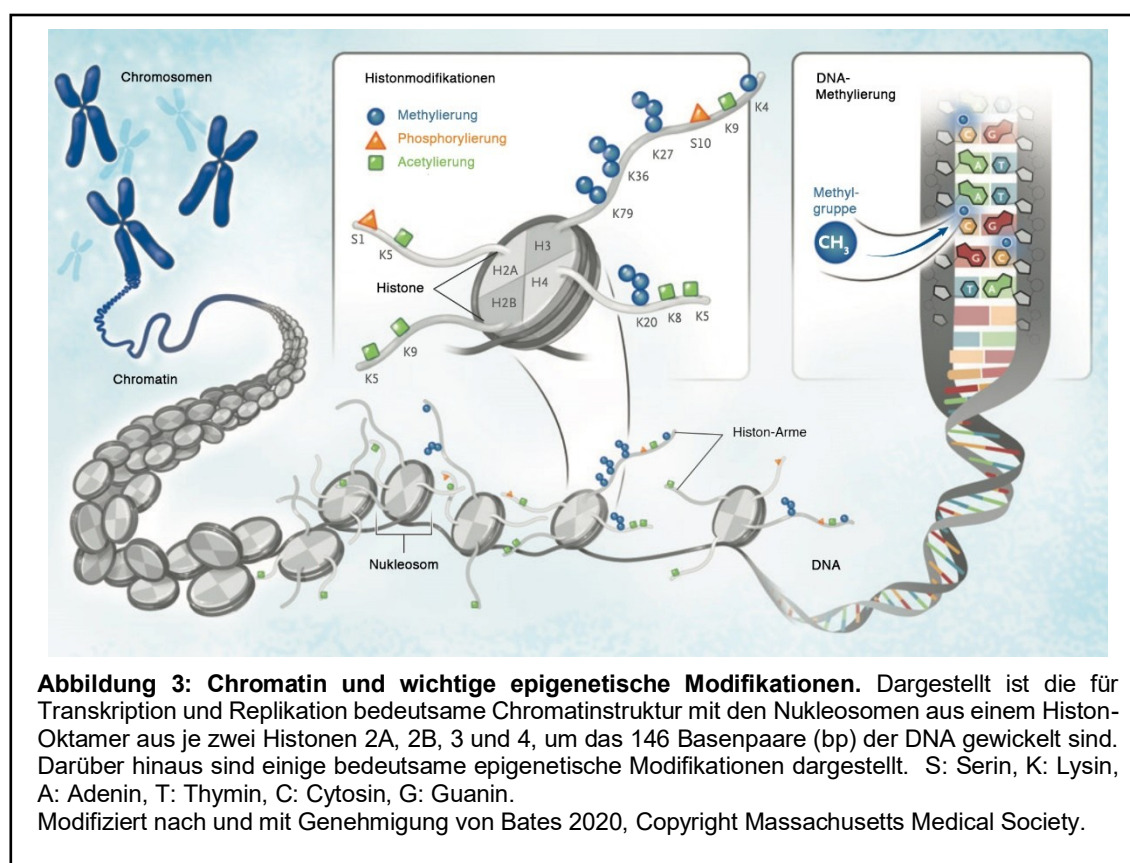
2011) und über mehrere Mechanismen unter anderem die Chromatinstrukturen beeinflussen (Dyer et al. 2017). Eines der am häufigsten inaktivierten Gene war *MEN1*, das über diverse Interaktionspartner zahlreiche Funktionen unter anderem in der Regulation epigenetischer Modifikationen übernimmt (Marini et al. 2021; Matkar et al. 2013). Auch die Proteine MLL3 und SETD2, die die Chromatinstruktur beeinflussen, wiesen Veränderungen auf (Abbildung 1) (Scarpa et al. 2017). Darüber hinaus zeigten sich in einigen Tumoren Mutationen bzw. eine verminderte Expression der Proteine PTEN und TSC2, die beide eine hemmende Funktion im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (Abbildung 2) haben (Jiao et al. 2011; Missiaglia et al. 2010). Über mTOR werden Proliferation und Proteinsynthese neben einigen weiteren Zellfunktionen gefördert (Saxton und Sabatini 2017). Auch eine vermehrte Aktivität der Histondeacetylasen (HDACs), die zu verdichteter Chromatinstruktur und verringerter Transkription führt, konnte nachgewiesen werden (Alvarez et al. 2018; Klieser et al. 2017).



Verbreitete Zelllinien aus pNET für Untersuchungen in Zellkulturen sind QGP-1 und BON-1. Während QGP-1 ursprünglich aus einem Primärtumor isoliert wurde (Kaku et al. 1980), entstammt die BON-1 Zelllinie einer Lymphknotenmetastase eines pNET (Townsend et al. 1993). Beide Zelllinien weisen Mutationen in *ATRX* und *MEN1* auf, wobei sich *in-silico* kein Einfluss auf die Proteinfunktion zeigte (Vandamme et al. 2015). Weiterhin zeigten sich in beiden Zelllinien Mutationen, die in pNET nur selten gefunden werden. So weisen BON-1 Zellen ein mutiertes *NRAS* und QGP-1 Zellen ein mutiertes *KRAS* auf. In beiden Zelllinien ist *TP53* verändert (Scarpa et al. 2017; Vandamme et al. 2015).

1.2 Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt Veränderungen der Chromatinstrukturen durch verschiedene Modifikationen an DNA oder Histonen. Die Basensequenz bleibt dabei unverändert. Wichtige Beispiele sind DNA-Methylierungen an Cytosin-Gruppen, sowie Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung an unterschiedlichen Aminosäureresten von Histonen (Abbildung 3).



Ein Mechanismus, über den die Expression beeinflusst wird, ist die Acetylierung der positiv geladenen Aminogruppen an Histonen. Hierdurch wird die Bindung der negativ geladenen DNA an die Histone abgeschwächt und die Chromatinstruktur in Richtung Euchromatin verschoben (Li et al. 2007; Tse et al. 1998). Dies erleichtert Transkription, Replikation und Genreparatur. Einen

meist gegenteiligen Effekt hat die DNA-Methylierung. Die Methylgruppen beeinträchtigen die Interaktion der DNA mit an der Transkription beteiligten Proteinen und mobilisieren darüber hinaus Proteine, die aktiv die Expression verringern (Keshet et al. 1986; Moore et al. 2013). Andere Modifikationen wie die Histonmethylierung haben teilweise komplexere Wirkungen. Ob die Transkription erleichtert oder erschwert wird, ist hierbei abhängig von Position und Anzahl der angehängten Gruppen (Bates 2020).

Die beteiligten Enzyme werden je nach Funktion in Gruppen eingeteilt. So unterscheidet man unter anderem *writer*, die funktionelle Gruppen ergänzen, *eraser*, die funktionelle Gruppen entfernen und *reader*, die an Modifikationen an DNA und Histonen binden und diese somit erkennen (Bates 2020; Shi und Vakoc 2014). Wichtige Vertreter der *writer* sind DNA-Methyltransferasen (DNMT) und Histon-Acetyltransferasen (HAT), wichtige Vertreter der *eraser* sind HDACs (Bates 2020). Zu den DNMTs gehören DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L, wobei nur DNMT1, DNMT3A und DNMT3B die Methylierung der DNA selbst katalysieren und in einigen Tumorarten überexprimiert sind (Cheng et al. 2019). Es werden 18 HDACs unterschieden, die in vier Klassen eingeteilt werden (Bose et al. 2014; Cheng et al. 2019). Manche HDACs wirken an spezifischen Aminosäuren der Histone, bei anderen ist der genaue Wirkort noch nicht bekannt (Cheng et al. 2019). Die Enzyme der Klasse I wirken ausschließlich im Zellkern, die anderen HDACs sind auch außerhalb des Zellkerns aktiv und können somit die Funktion weiterer Enzyme direkt beeinflussen (Bose et al. 2014; Cheng et al. 2019; Bates 2020). Während die Enzyme der Klassen I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8), II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 und HDAC10) und IV (HDAC11) die klassischen HDACs beinhalten, gehören HDACs der Klasse III zu den Sirtuinen, die bereits in primitiven Organismen vorkommen (Bose et al. 2014; Cheng et al. 2019).

In den letzten Jahren sind in zahlreichen unterschiedlichen Tumorarten epigenetische Veränderungen gefunden worden, die die Zellbiologie über diverse Signalwege beeinflussen (Mohammad et al. 2019). So kann es zum Beispiel zu einer verringerten Expression von Tumorsuppressorgen und Störungen der Zellzykluskontrolle kommen (Pfister und Ashworth 2017), wodurch die Entstehung von malignen Tumoren begünstigt wird (Hanahan und Weinberg 2011).

1.3 Epigenetische Modulatoren

Aufgrund der zunehmend bekannten epigenetischen Veränderungen ist deren therapeutische Nutzbarkeit Bestandteil aktueller Forschung. Epigenetische Modulatoren sind Wirkstoffe, die durch Inhibition oder Aktivierung von Enzymen die Chromatinkonfiguration beeinflussen. Bereits genutzte Ansatzpunkte sind die Inhibition von Histondeacetylasen, DNA-

Methyltransferasen, IDH1 und 2 oder EZH2 (Bates 2020). Während bei hämatologischen Tumorerkrankungen mehrere Wirkstoffe zugelassen sind, war der Einsatz als Monotherapie in soliden Tumoren mit den initialen Wirkstoffen bisher nicht erfolgreich (Morel et al. 2020).

1.3.1 5-Azacytidin

5-Azacytidin ist ein DNMT-Inhibitor, der bereits in der Therapie myelodysplastischer Syndrome, chronischer myelomonozytärer Leukämien und der akuten myeloischen Leukämie (AML) eingesetzt wird (Celgene Europe B.V. 2009). Die Wirkung tritt durch mehrere Mechanismen ein. 5-Azacytidin wird überwiegend in die RNA eingebaut, kann aber nach Umwandlung zu 5-Aza-2'-deoxycytidin auch in die DNA integriert werden (Stresemann und Lyko 2008). In der DNA bindet es die DNMT1 kovalent, was zum Abbau des Enzyms und längerfristig zu Hypomethylierung der DNA und DNA-Schäden führt (Stresemann und Lyko 2008; Duchmann und Itzykson 2019). Durch den Einbau des Wirkstoffs in RNA wird die Proteinbiosynthese gestört (Christman 2002). Ein weiterer Mechanismus ist die Präsentation von Tumorantigenen, die eine Immunantwort auslösen können (Duchmann und Itzykson 2019).

1.3.2 Panobinostat

Panobinostat ist ein pan-HDAC-Inhibitor, der auf alle HDACs der Klassen I, II und IV wirkt (Shao et al. 2010). In der Folge nimmt die Acetylierung der Histone und auch einiger Proteine im Zytosol zu, was sowohl zu einer erleichterten Transkription als auch zu einer veränderten Funktion einiger Proteine führt (Khan und La Thangue 2012). In Kombination mit Bortezomib und Dexamethason ist es durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) als *third-line* Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen (Secura Bio Limited 2015).

1.3.3 Valproat

Valproat ist seit langem in Neurologie und Psychiatrie vor allem zur Therapie von Epilepsien und bipolar affektiven Störungen etabliert (Chateauvieux et al. 2010). Die Wirkung entfaltet sich dabei unter anderem über eine Aktivitätserhöhung des Neurotransmitters GABA und einer Blockade von Ionenkanälen (Chateauvieux et al. 2010). Eine weitere Wirkung von Valproat ist die Hemmung von HDACs der Klassen I und IIa (Arvidsson et al. 2016). Die Aktivitäten von HDAC9 und HDAC11 werden durch Valproat jedoch erhöht, die Aktivitäten von HDAC6, HDAC8 und HDAC10 bleiben unverändert (Chateauvieux et al. 2010).

2 Zielstellung

Die Schwierigkeiten in der Therapie der NET bei fortgeschrittener Erkrankung erfordern die Entwicklung weiterer Therapieansätze. Da häufige Mutationen in pNETs Gene mit Beteiligung an der epigenetischen Regulation betreffen, sollen in dieser Arbeit die epigenetischen Modulatoren Panobinostat, 5-Azacytidin und Valproat als medikamentöser Therapieansatz für pNETs *in-vitro* an den bereits etablierten humanen Zelllinien BON-1 und QGP-1 untersucht werden.

Für die Charakterisierung des Phänotyps wurden Zellviabilitätsassays, Wachstumskurven, Zellzyklusanalyse und Apoptoseassays verwendet. Weiterhin wurde der Einfluss auf Proliferation und Apoptose in Western Blot Studien auf Proteinebene validiert. Mechanistisch erfolgte die Aufarbeitung NET-spezifischer Signalwege wie zum Beispiel dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg sowie die Evaluation relevanter Differenzierungsmerkmale mittels Western Blot bzw. quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion- (qRT-PCR-)Analyse.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Die humanen Zelllinien BON-1 und QGP-1 wurden von der gastroenterologischen Universitätsklinik der Philipps-Universität Marburg bereitgestellt. Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenbefall kontrolliert und dieser ausgeschlossen.

Tab. 1: **Zelllinien:** NET: neuroendokriner Tumor

Zelllinie	Ursprung	Lokalisation	Spezies	Kennzeichnung
BON-1	Serotonin-produzierender NET	Lymphknoten-metastase	<i>H. sapiens</i>	RRID:CVCL_3985
QGP-1	Somatostatinom	Pankreas	<i>H. sapiens</i>	RRID:CVCL_3143

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Carl Roth
Annexin V Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)	BioLegend
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford-)Assay-Reagenz	Thermo Fisher Scientific
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth
Gibco™ DMEM/F-12, Hepes	Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol absolute	Fischer Chem.
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
<i>Fetal Bovine Serum</i> (Lot Nr.: CP15-1080)	Capricorn Scientific
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Serva
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)(pH = 7,5)	Sigma-Aldrich

iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	BioRad
2-Mercaptoethanol	Carl Roth
Methanol	Fischer Chem.
Panobinostat	Cayman Chemical
Gibco™ Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4	Thermo Fisher Scientific
Propidiumiodid-Lösung (P4864)	Sigma-Aldrich
RNase A (20 mg/ml)	Qiagen
Roti®-Load 1	Carl Roth
Gibco™ RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific
Natriumdodecylsulfat-Pellets (SDS)	Carl Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Tris-Base	Serva
Tris-HCl pH 7,5	Serva
Triton X-100	Carl Roth
Gibco™ Trypsin-EDTA (0,5 %), <i>no phenol red</i>	Thermo Fisher Scientific
Tween®-20	AppliChem
Valproic acid sodium salt	Sigma-Aldrich

3.1.3 Antikörper

Tab. 2: **Primäre Antikörper für Western Blots:** mAb: monoklonaler Antikörper; pAb: polyklonaler Antikörper; MW: Molekulargewicht

Antigen	MW	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
β-Actin	48 kDa	1:10000	Maus (mAb)	Sigma-Aldrich (A1978)
AKT	60 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#9272)
p.AKT (Ser473)	60 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#9271)

Antigen	MW	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
Bcl-2	28 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#2872)
E-Cadherin	120 kDa	1:1000	Maus (mAb)	BD Biosciences (610181)
N-Cadherin	140 kDa	1:1000	Maus (mAb)	Cell Signaling (#14215)
Caspase 3	35 kDa / 17 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#9662)
Caspase 3 (cleaved, Asp175)	19 kDa/ 17 kDa	1:1000	Kaninchen (mAb)	Cell Signaling (#9664)
CDK 4	34 kDa	1:500	Kaninchen (mAb)	Santa Cruz (sc-23896)
Cyclin D1	36 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#2922)
Cyclin D3	31 kDa	1:2000	Maus (mAb)	Cell Signaling (#2936)
DAPK1	160 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#3008)
eIF4E	28 kDa	1:1000	Maus (mAb)	Santa Cruz (sc-9976)
ERK	42/44 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#9102)
p.ERK	42/44 kDa	1:1000	Kaninchen (mAb)	Cell Signaling (#4376)
Histon H3	17 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	abcam (ab1791)
Histon H3 (acetyl K9 + K14 + K18 + K23 + K27)	17 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	abcam (ab47915)
mTOR	289 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#2972)
p.mTOR (Ser2448)	289 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#2971)
PARP	116 kDa / 89 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#9542)
PCNA	36 kDa	1:1000	Maus (mAb)	Santa Cruz (sc-56)

Antigen	MW	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
PI3K	85 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#4292)
RPS6	32 kDa	1:1000	Kaninchen (mAb)	Cell Signaling (#2217)
p.RPS6 (Ser235/236)	32 kDa	1:1000	Kaninchen (pAb)	Cell Signaling (#2211)
Smad 2,3	58 kDa	1:1000	Maus (mAb)	BD Biosciences (610842)
p.Smad 2 (Ser465/467) p.Smad 3 (Ser423/425)	52 kDa, 60 kDa	1:1000	Kaninchen (mAb)	Cell Signaling (#8828)

Tab. 3: **Sekundäre Antikörper für Western Blots:** pAb: polyklonaler Antikörper

Antigen	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
ECL Anti-Mouse IgG	1:10000	Schaf (pAb)	GE Healthcare UK Ltd.
ECL Anti-Rabbit IgG	1:10000	Esel (pAb)	GE Healthcare UK Ltd.

3.1.4 Primer

Tab. 4: **Primer für die qRT-PCR:** for: *Forward-Primer*; rev: *Reverse-Primer*

Gen	Name	Typ	Sequenz
XS13	XS13-Ta _q	for	GTCGGAGGAGTCGGACGAG
		rev	GCCTTTATTTTCCTTGTTTGC AAA
SSTR1	hSSTR1_Ta _q	for	TGCGAAAGGGACGGTATCC
		rev	TCGCGCGCCTTTCTTG
SSTR2	hSSTR2_a _q	for	TGCTTCATTAATTTTCAGGCAAGTG
		rev	TCTGAGAAGTGGAACACATGAATTGA
SSTR5	hSSTR5_Ta _q	for	CAGGAGCAGAGGACGGTCAT
		rev	CCAGGGCCTGCCATTTG

3.1.5 Kits

CellTiter-Glo® *Luminescent Cell Viability Assay*

Promega

NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel
Omniscript RT Kit	Qiagen
Pierce™ <i>Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific

3.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien für Zellkulturarbeiten (Flaschen, Multiwellplatten, serologische Pipetten, Pipettenspitzen, etc.) wurden bei den Firmen Greiner, Sarstedt und Eppendorf bezogen. Zusätzlich zur Standardausrüstung eines mikro- und molekularbiologischen Labors wurden folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet:

BD LSRFortessa	BD Biosciences
7500 <i>Real Time PCR System</i>	Applied Biosystems
Fusion Fx7	Peqlab
HERAcell 150	Thermo Scientific
INTAS <i>Advanced Fluorescence Imager</i>	INTAS
Luminoskan™ <i>Ascent</i>	Thermo Scientific
Mini-PROTEAN® <i>Tetra Vertical Electrophoresis</i>	BioRad
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Scientific
NanoDrop™ 2000/2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific

3.1.7 Software

ChemoStar	INTAS
FlowJo	FlowJo, LLC
GraphPad Prism 9	GraphPad Software
ImageJ	(Rueden et al. 2017)
7500 <i>Fast Software</i>	Thermo Fisher Scientific

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung humaner Zellen

Die Zelllinie BON-1 wurde in DMEM/F-12 Medium mit 10% FBS (*fetal bovine serum*) und die Zelllinie QGP-1 in RPMI 1640 Medium mit 10% FBS als *Monolayer* kultiviert. Die Kulturbedingungen im CO₂-Brutschrank waren 37 °C, 5% CO₂, 21% O₂ und ca. 95% Luftfeuchtigkeit.

Die Passagierung der Zellen erfolgte mindestens einmal pro Woche oder beim Erreichen von 70-80% Konfluenz. Dabei wurde das Medium entfernt, die Zellen für drei bis fünf Minuten mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,5%) inkubiert und die Trypsinreaktion durch Zugabe des gleichen Volumens Kulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde drei Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer wurde eine definierte Anzahl an Zellen ausgesät. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

3.2.2 Behandlung mit Medikamenten

Die Behandlung der Zellen erfolgte 24 h nach dem Aussäen der Zellen. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe des Medikaments mit Zellkulturmedium hergestellt. Die Stammlösung mit Panobinostat hatte hierbei eine Konzentration von 94 mM in DMSO, 5-Azacythidin wurde jeweils in einer Stammlösung mit einer Konzentration von 20 mM in 50%-iger Essigsäure vorbereitet. Valproat wurde nach Bedarf direkt in Wasser gelöst und mit Kulturmedium verdünnt. Bei Behandlung mit Panobinostat oder 5-Azacytidin wurde das entsprechende Lösungsmittel zur Behandlung der Lösungsmittelkontrolle in gleichen Schritten wie die Medikamente mit Kulturmedium verdünnt. Zur Elimination von Effekten durch das Lösungsmittel wurden die weiteren Verdünnungsschritte der Medikamente nach Erreichen der höchsten Behandlungskonzentration mit in gleicher Konzentration lösungsmittelhaltigem Medium durchgeführt, wodurch die Lösungsmittelkonzentration bei allen Medikamentenkonzentrationen und der Lösungsmittelkontrolle gleich hoch war.

3.2.3 Proliferationsanalyse mittels Zellzählung

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden je 3×10^5 Zellen/*well* auf 12-*well*-Platten ausgesät. Dabei wurden je zwei technische Replikate pro Probe und Untersuchungszeitpunkt behandelt. Die Zählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer zu definierten Zeitpunkten nach Behandlungsbeginn. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, die Trypsinreaktion mit Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (3 min, 150 x g, RT). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µL Kulturmedium resuspendiert und nach Bedarf weiter verdünnt.

3.2.4 Zellviabilitätsassay

Zur Einschätzung der Zellviabilität wurden je 7500 Zellen/*well* auf einer 96-*well*-Platte ausgesät. Die Bestimmung erfolgte 48 h nach Behandlungsbeginn mit drei technischen Replikaten. Zur Messung wurde das CellTiter-Glo® *Luminescent Cell Viability Assay* von Promega nach Herstellerprotokoll mit einem Coomassie-Reagenz von Thermo Fisher Scientific und das Mikrotiterplatten-Luminometer Luminoskan™ *Ascent* von Thermo Fisher Scientific verwendet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Behandlung und Zellernte

Bei allen Versuchen zu proteinbiochemischen Methoden wurden 6×10^6 Zellen/Schale in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellernte erfolgte zu definierten Zeitpunkten nach Behandlungsbeginn. Dazu wurden die Zellen auf Eis gelagert, das Medium entfernt und nach einmaligem Waschen mit PBS in je 600 μ L PBS mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst. Die Zell-PBS-Suspension wurde zentrifugiert (5 min, 2000 x g, 4 °C), der Überstand abgenommen und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

3.3.2 Zelllyse und Proteinbestimmung

Die Zellpellets wurden in 100 μ L (BON-1) bzw. 150 μ L (QGP-1) Zelllysepuffer aufgenommen, resuspendiert und nach 10 min Inkubationszeit auf Eis durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei maximaler Umdrehungszahl und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit bestimmt. Dazu wurden neben den Proben auch *wells* für eine Eichgerade mit 1-8 μ g bovinem Serumalbumin (BSA) und Zelllysepuffer gemessen. Anhand der Eichgerade wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

Der Zelllysepuffer beinhaltet 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Natrium-desoxycholsäure und 1% Triton X-100. Vor Anwendung wurden 2 mL Zelllysepuffer mit 80 μ L Complete Protease-Inhibitor Cocktail (Roche) und 20 μ L Phosphataseinhibitor Mix I von Serva versetzt.

3.3.3 SDS-PAGE

Um einen gleichen Proteingehalt von 20 μ g in allen Proben zu erreichen, wurde ein von der Proteinkonzentration abhängiges Volumen der Zelllysate mit Zelllysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 20 μ L verdünnt. Nach Zugabe von 6,67 μ L Roti®-Load 1 (4x) wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Die Gele wurden gemäß Tab. 5 gegossen. Dabei wurden in Abhängigkeit von den zu untersuchenden Proteinen 10%-, 12%- oder 15%-Gele verwendet.

Tab. 5: **Zusammensetzung Sammel- und Trenngele:** APS: Ammoniumpersulfat, TEMED: Tetramethylethyldiamin

Bestandteil	Sammelgel	10% Trenngel	12% Trenngel	15% Trenngel
Sammel- /Trenngelpuffer [mL]	0,50	1,25	1,25	1,25
Wasser [mL]	1,28	1,84	1,50	1,00
Acrylamid (30/0,8)[mL]	0,32	1,67	2,00	2,50
Glycerol [mL]	0	0,25	0,25	0,25
10% APS [μl]	5	10	10	10
TEMED [μl]	5	10	10	10

Als Proteinmarker wurde der *Triple Color Protein Standard III* von Serva verwendet. Taschen ohne Proben wurden mit 6,67 μL Roti®-Load 1 beladen. Die Proben wurden 15 min mit 100 V Spannung im Sammelgel und ca. 1 h mit 120 V im Trenngel aufgetrennt.

Der Trenngelpuffer beinhaltet 1,5 M Tris-Base (pH 8,8) und 0,4% SDS.

Der Sammelgelpuffer besteht aus 0,5 M Tris-Base (pH 6,8) und 0,4% SDS.

Der Laufpuffer beinhaltet 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 0,1% SDS.

3.3.4 Western Blot

Der Proteintransfer fand nach der *Tank-Blot*-Methode statt. Dabei wurden die Proteine in einem Transferpuffer aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) von Carl Roth übertragen. Der Blot wurde für 1 h 30 min bei 4 °C und bei einer Stromstärke von 350 mA durchgeführt.

In der Folge wurde die Membran je nach zu untersuchendem Antikörper in Milch (5% Milchpulver in TBS-T) oder BSA (5% in TBS-T) für mindestens 1 h bei RT geblockt. In einigen Fällen wurde die Membran geschnitten und daraufhin über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am Folgetag wurde nach 3 Waschschritten mit TBS-T die Inkubation mit dem sekundären Antikörper über 1 h durchgeführt. Nach weiteren 3 Waschschritten mit TBS-T erfolgte eine Inkubation mit *Clarity Western ECL Substrate* oder bei niedriger Signalstärke mit *Clarity Max Western ECL Substrate* von Biorad über 5 min bei RT im Dunkeln. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Auswertung des Chemolumineszenzsignals im *Advanced Fluorescence Imager* von INTAS.

TBS-T besteht aus 20 mM Tris-Base, 137 mM NaCl und 0,1% Tween-20.

Der Transferpuffer beinhaltet 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 20% Methanol.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden je 3×10^5 Zellen/*well* auf einer 6-*well*-Platte ausgesät. Die weitere Behandlung und Zellernte fanden entsprechend Kapitel 3.3.1 statt.

Die RNA wurde mit dem NucleoSpin® RNA Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Bestimmung des RNA-Gehalts der Proben erfolgte mit dem NanoDrop™ 2000/2000c Spektrophotometer von Thermo Fisher Scientific. Die Proben wurden im Anschluss zu cDNA umgeschrieben und danach bei -80 °C gelagert.

3.4.2 cDNA-Synthese

Für die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) wurde die mRNA mit dem Omniscript RT-Kit von Qiagen zu cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Dabei wurden je 500 ng mRNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 6 dargestellt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Tab. 6: **Reaktionsansatz cDNA-Synthese**

Bestandteil	Volumen [μ L]
500 ng mRNA + H ₂ O	14,1
10 x Puffer	2
dNTPs (je 5 mM)	2
Olido-dT Primer (50 μ M)	0,4
RNase-Inhibitor (40U/ μ L)	0,25
Reverse Transkriptase	0,5
H ₂ O	0,75
Gesamt	20

Die cDNA-Proben wurden 1:10 mit H₂O verdünnt und bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) ermöglicht eine quantitative Analyse der Expression von mRNA. Diese muss vorher über eine reverse Transkriptase zu cDNA umgeschrieben werden. Die Quantifizierung erfolgt anhand eines Fluoreszenzsignals. Dabei wird der C_T-Wert (*threshold cycle*) bestimmt, der den Zyklus wiedergibt, ab dem sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrundsignal abhebt. Nach Normalisierung anhand des *house-keeping* Gens *XS13* erfolgte die Auswertung mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001).

Alle vorbereitenden Schritte für eine qRT-PCR wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde der Reaktionsansatz ohne cDNA auf einer 96-*well*-Platte vorgelegt. Daraufhin wurde die cDNA hinzugefügt und die PCR nach kurzer Zentrifugation gemäß

Tab. 8 gestartet.

Tab. 7: **Reaktionsansatz PCR**

Bestandteil	Volumen [μ L]
PCR Master Mix (2x)	10
Primer (forward)	0,1
Primer (reverse)	0,1
H ₂ O	8,8
cDNA	1
Gesamt	20

Tab. 8: **Reaktionsablauf PCR**

Phase	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	60 °C	30 s
Elongation	60 °C	30 s

40 Zyklen

3.5 Durchflusszytometrische Methoden

3.5.1 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse wurden im Zellzyklus fixierte und permeabilisierte Zellen mit Propidiumiodid gefärbt, das mit der DNA interkaliert. Die Signalstärke nach Stimulation mit einem 492 nm-Laser ist dabei direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle. Im Histogramm stellen sich zwei Peaks dar, die den Zellen mit einfachem Chromosomensatz in der G1/G0-Phase und denen mit doppeltem Chromosomensatz in der G2-Phase entsprechen. Die Zellen mit einer Signalstärke zwischen den Peaks entsprechen den Zellen in der S-Phase (Abbildung 13).

Im Detail wurden je 3×10^5 Zellen/*well* in 6-*well*-Platten ausgesät. 48 h nach Behandlungsbeginn folgte die Ablösung der Zellen mit Trypsin und ein Zentrifugationsschritt (10 min, 300 x g, 4 °C). Sowohl Zellen als auch Puffer wurden auf Eis gelagert. Auf die Zentrifugation folgte ein Waschschrift mit 5 mL Waschpuffer (Zentrifugation: 10 min, 300 x g, 4 °C) und eine erneute Resuspension in 500 μ L Waschpuffer. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte

durch langsame Zugabe von 5 mL vorgekühltem, 70%-igem Ethanol unter ständiger Durchmischung. Die fixierten Zellen wurden erst nach mindestens einer Woche Inkubationszeit bei 4 °C weiterbearbeitet. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 800 x g, 4 °C) erfolgten zwei Waschschrte mit 1 mL Waschpuffer. Das Zellpellet wurde daraufhin in 500 µL Propidiumiodid-Lösung (PI-Lösung) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Vor der Messung wurde jede Probe noch durch einen 30 µm Filter gegeben. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo. Durch das *Gaten* wurde der Detritus aus der Auswertung entfernt und nur einzelne Zellen integriert. Die so vorsortierten Zellen wurden nach dem Dean-Jett Fox Modell ausgewertet.

Der Waschpuffer setzt sich aus 1 x PBS mit 1% FBS und 1 mM EDTA (pH = 8,0) zusammen. Die PI-Lösung besteht aus 1 x PBS mit 10 µg/mL PI und 100 µg/mL RNase A.

3.5.2 Apoptosenachweis mit Annexin-V-Färbung

Die Untersuchung der Apoptose erfolgte mittels Lebendfärbung mit Annexin-V und PI. Annexin-V ist ein Protein, das an Phosphatidylserin bindet und für die Analyse mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) konjugiert ist, welches durch Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden kann. Phosphatidylserin liegt bei unbeeinträchtigt wachsenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran und wird erst bei Eintritt der Zelle in die Apoptose an die Außenseite der Membran verlagert. Diese Verlagerung kann durch die vermehrte Bindung von Annexin-V bei apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen werden für die Analyse zusätzlich mit PI gefärbt, das bei intakter Zellmembran nicht in die DNA interkalieren kann. Die Zellmembran bleibt bis in späte Stadien der Apoptose intakt. Eine Anfärbung mit Annexin-V und PI kann somit auf ein spätes Stadium der Apoptose hinweisen. Eine isolierte Aufnahme von PI tritt als Folge einer Membranschädigung auf, die bei Nekrose der Zellen auftritt (Pietkiewicz et al. 2015).

Dazu wurden je 3×10^5 Zellen/*well* auf einer 6-*well*-Platte ausgesät. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben und Kontrollen wurden Zellen für eine ungefärbte Kontrolle (Negativkontrolle), eine nur mit PI gefärbte Kontrolle (PI-Kontrolle) und eine Positivkontrolle ($6,57 \times 10^5$ Zellen in einer Zellkulturschale mit 60 mm Durchmesser) ausgesät. Die Positivkontrolle wurde am Vortag der Messung in PBS je nach Zelllinie für 5-7 min mit UV-Licht bestrahlt und mit neuem Medium im CO₂-Brutschrank inkubiert. 48 h nach Behandlungsbeginn wurden die Zellen nach einem Waschschrte mit PBS mit Trypsin abgelöst und zentrifugiert (1 min, 1500 x g, RT). Nach zwei Waschschrten mit PBS (Zentrifugation: 1 min, 1500 x g, RT) wurden die Zellpellets in 400 µL *Binding Buffer* resuspendiert und durch einen 30 µm Filter filtriert. Die Proben wurden daraufhin mit 10 µL Annexin-V-FITC versetzt (außer Negativkontrolle und PI-Kontrolle) und für 20 min inkubiert (im Dunkeln, RT). Anschließend wurden die Proben mit 10 µL PI-Lösung und 1 µL RNase A (20 mg/mL) versetzt (außer Negativkontrolle) und für 15 min inkubiert (im Dunkeln,

37 °C). Bei der Auswertung wurden die *Gates* so gesetzt, dass Detritus aus der Auswertung ausgeschlossen ist und nur einzelne Zellen berücksichtigt werden. Die Abgrenzung der Quadranten (Annexin-V-positiv/-negativ bzw. PI-positiv/-negativ) erfolgte anhand der Negativkontrolle (BON-1) bzw. der Kontrolle (QGP-1).

Bei der Zelllinie QGP-1 wurden die Proben erst nach den Inkubationszeiten und nach der Zugabe von weiteren 400 µL Binding Buffer durch den 30 µm Filter gegeben.

Der *Binding Buffer* besteht aus H₂O mit 10 mM HEPES (pH = 7,5), 140 mM NaCl und 2,5 mM CaCl. Die PI-Lösung enthält 100 µg/mL PI in *Binding Buffer*.

3.6 Statistische Auswertung

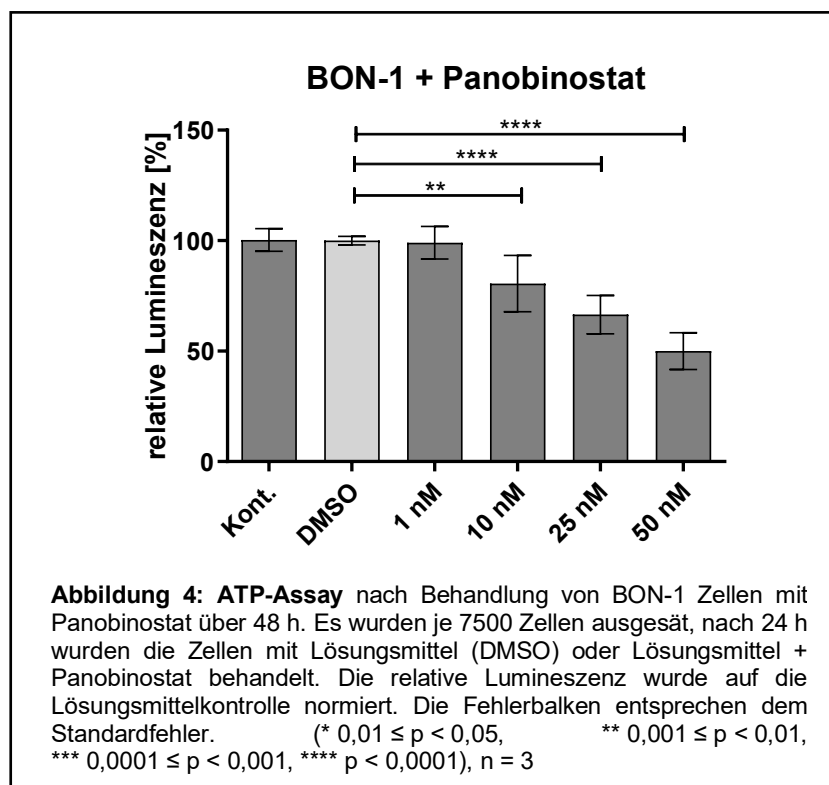
Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 9. Es wurde jeweils ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Ab einem p-Wert von $\leq 0,05$ galt ein Ergebnis als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

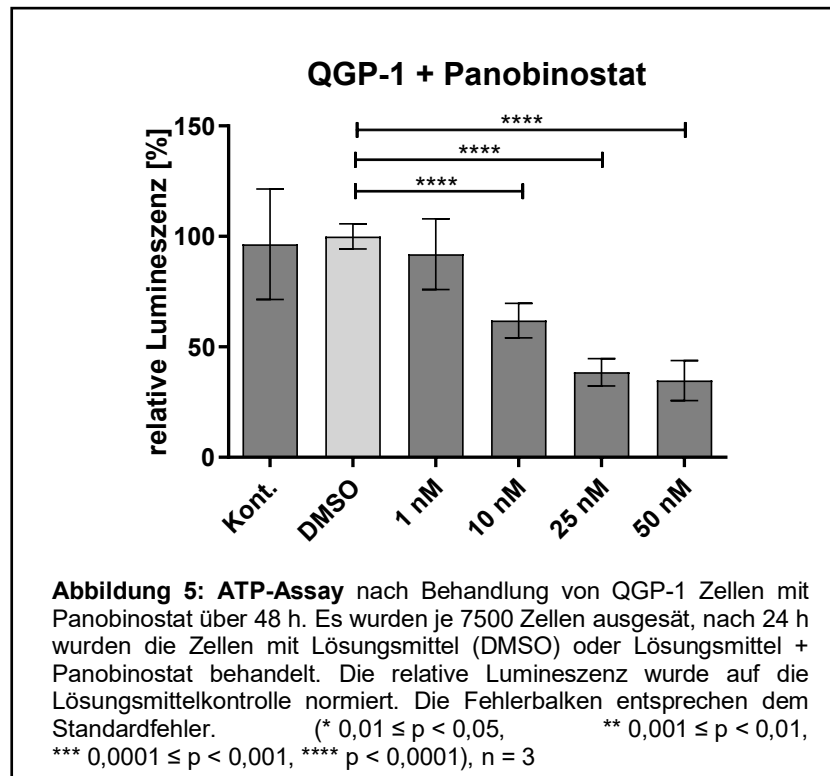
4.1 Einfluss auf die Zellviabilität

Die allgemeine Wirkung der Medikamente auf die Viabilität der Zelllinien wurde durch Messung der Lumineszenz im Rahmen eines Luciferase-basierten Zellviabilitäts-Assays bestimmt. Die Signalstärke korreliert dabei mit der ATP-Konzentration der Probe. Die Messungen wurden jeweils mit Panobinostat, 5-Azacytidin und Valproat an beiden Zelllinien durchgeführt.

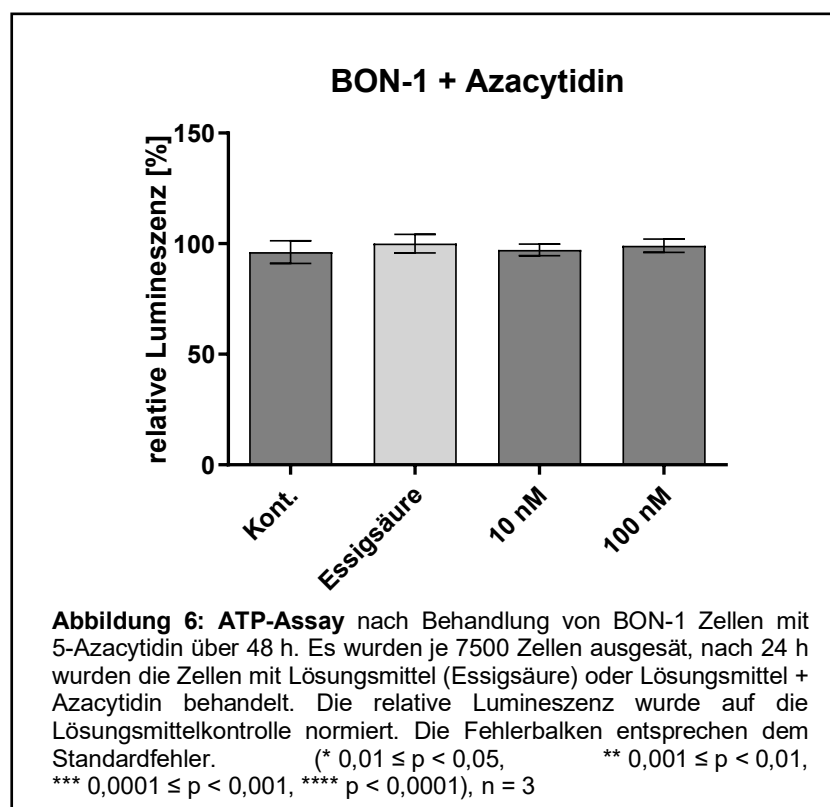
Die Viabilität von BON-1-Zellen nahm unter Therapie mit Panobinostat ab einer Konzentration von 10 nM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) ab. Während die Mittelwerte der Lumineszenz der Mediumkontrolle (Kont.), der Lösungsmittelkontrolle und der mit 1 nM Panobinostat behandelten Zellen keinen Unterschied zeigten, verringerte sich die Lumineszenz im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei einer Behandlungskonzentration von 10 nM um 19% ($p=0,0059$), bei einer Konzentration von 25 nM um 33% ($p<0,0001$) und bei einer Konzentration von 50 nM um 50% ($p<0,0001$) (Abbildung 4).



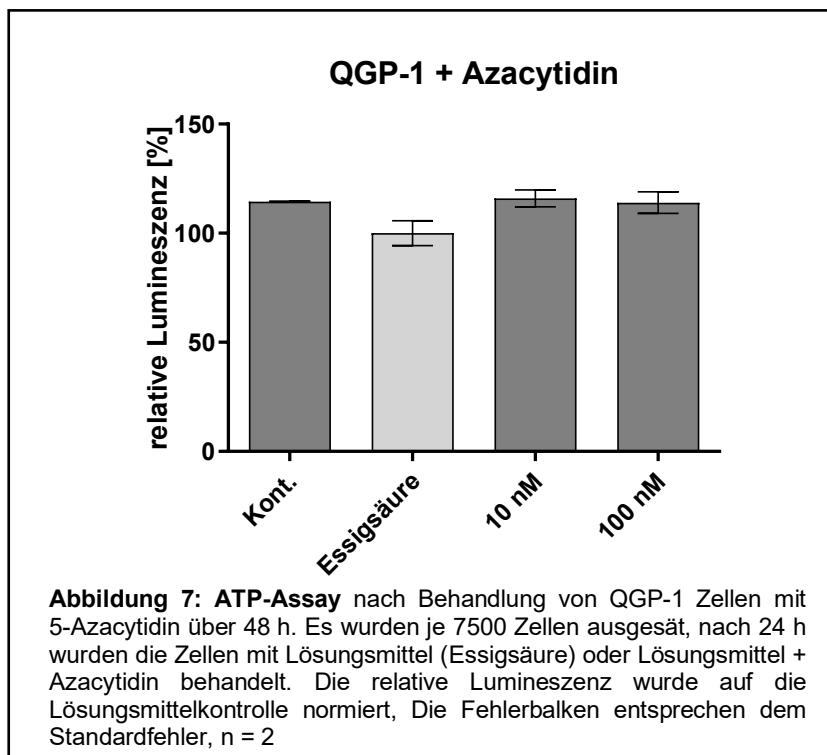
Bei QGP-1-Zellen zeigte sich unter Therapie mit Panobinostat in gleichen Konzentrationen ein ähnlicher Effekt auf die Zellviabilität. Mediumkontrolle und Therapie mit 1 nM Panobinostat zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle. Die Lumineszenz nahm im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei Behandlung mit 10 nM Panobinostat um 38,1% ($p<0,0001$), bei einer Konzentration von 25 nM um 61,5% ($p<0,0001$) und bei 50 nM um 65,2% ($p<0,0001$) ab. Auffällig war ein großer Standardfehler bei der Kontrolle. (Abbildung 5).



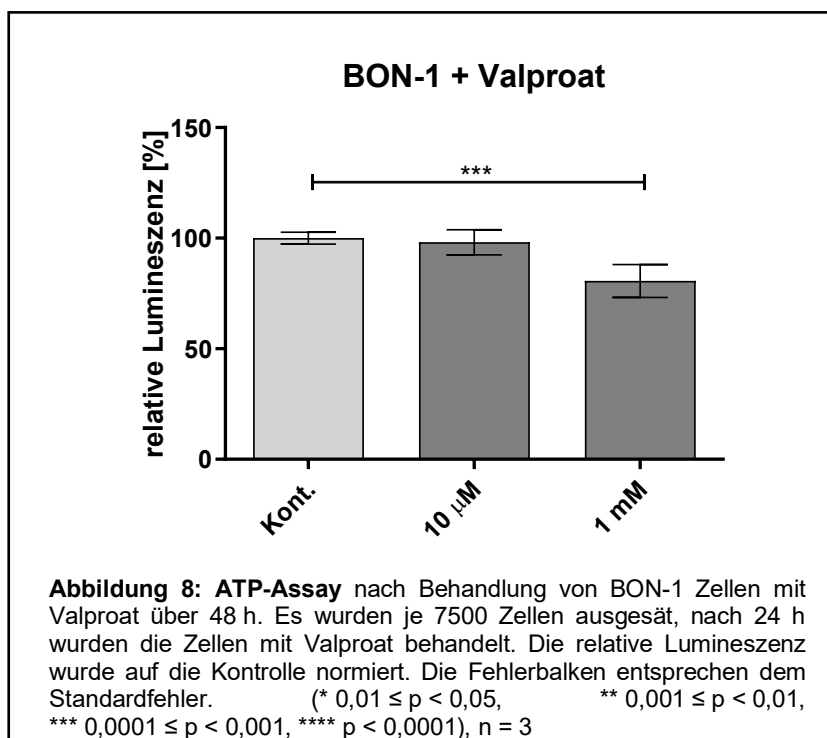
Im Gegensatz dazu zeigte sich bei BON-1 Zellen unter Therapie mit 5-Azacytidin in Konzentrationen von 10 nM und 100 nM keine signifikante Veränderung der Zellviabilität (Abbildung 6).



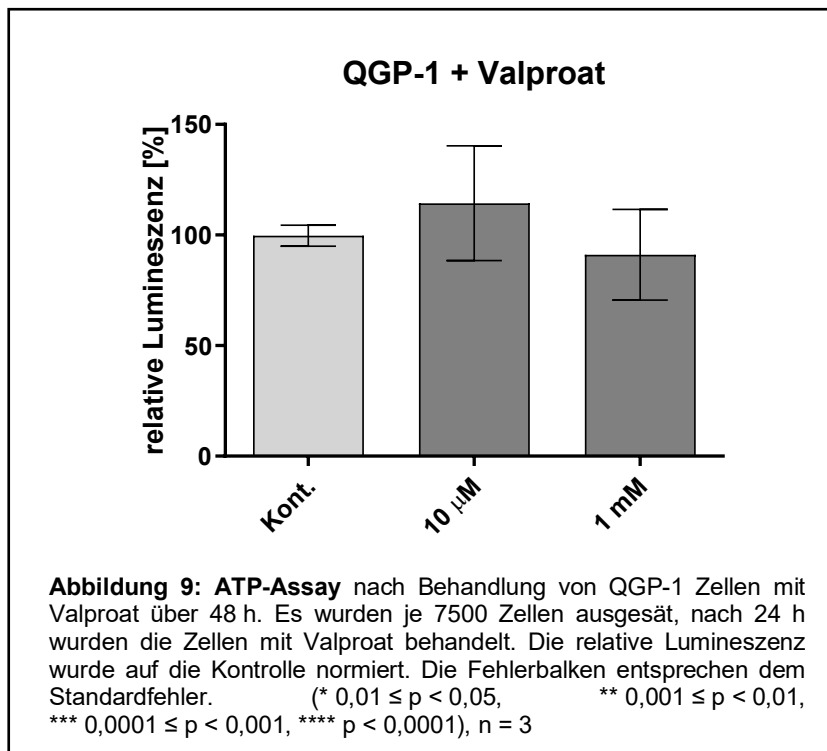
Auch bei der Zelllinie QGP-1 zeigte sich keine Abnahme der Viabilität unter Therapie mit 10 nM und 100 nM 5-Azacytidin (Abbildung 7).



Die Behandlung von BON-1 Zellen mit Valproat zeigte bei einer Konzentration von 10 μ M keine signifikante Abnahme der Zellviabilität, wohingegen bei einer Behandlungskonzentration von 1 mM die Lumineszenz signifikant um 19,4% ($p=0,0006$) gesunken ist (Abbildung 8).



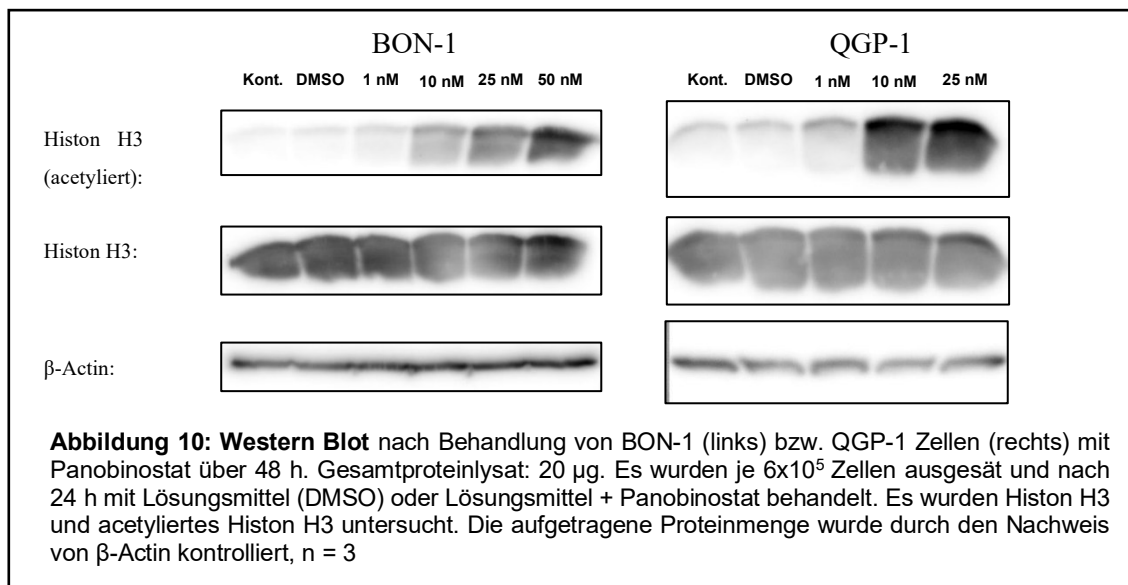
In QGP-1 Zellen zeigte sich keine Veränderung der Lumineszenz nach der Behandlung mit Valproat. Auffällig war hierbei eine relativ große Standardabweichung bei den Absolutwerten der behandelten Proben. Die relative Lumineszenz im Vergleich zur Kontrolle nahm bei einer Behandlung mit 10 μ M Valproat nicht signifikant um 14,4% zu. Bei einer Konzentration von 1 mM zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme um 8,9% (Abbildung 9).



Aufgrund des deutlich stärkeren Effekts von Panobinostat wurde der weitere Fokus auf diesen Wirkstoff gelegt. Lediglich Wachstumskurven wurden noch mit den anderen Wirkstoffen angefertigt.

4.2 Überprüfung der Wirkung von Panobinostat

Zur Überprüfung des Panobinostat-spezifischen Effektes auf die HDACs wurde auf Proteinebene Histon H3 und acetyliertes Histon H3 mit einem dafür spezifischen Antikörper untersucht. Hierbei zeigte sich reproduzierbar eine deutliche Zunahme der Acetylierung sowohl in BON-1 als auch QGP-1 Zellen (Abbildung 10).



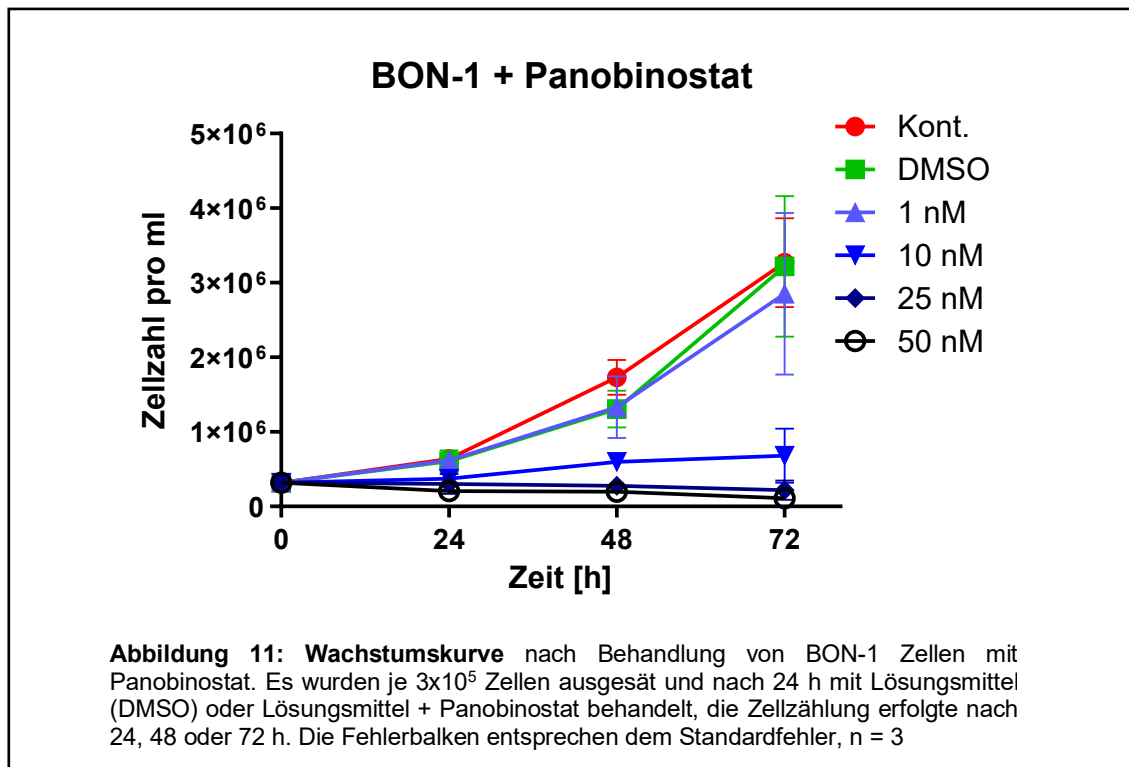
4.3 Einfluss auf die Zellproliferation

4.3.1 Zellzählung

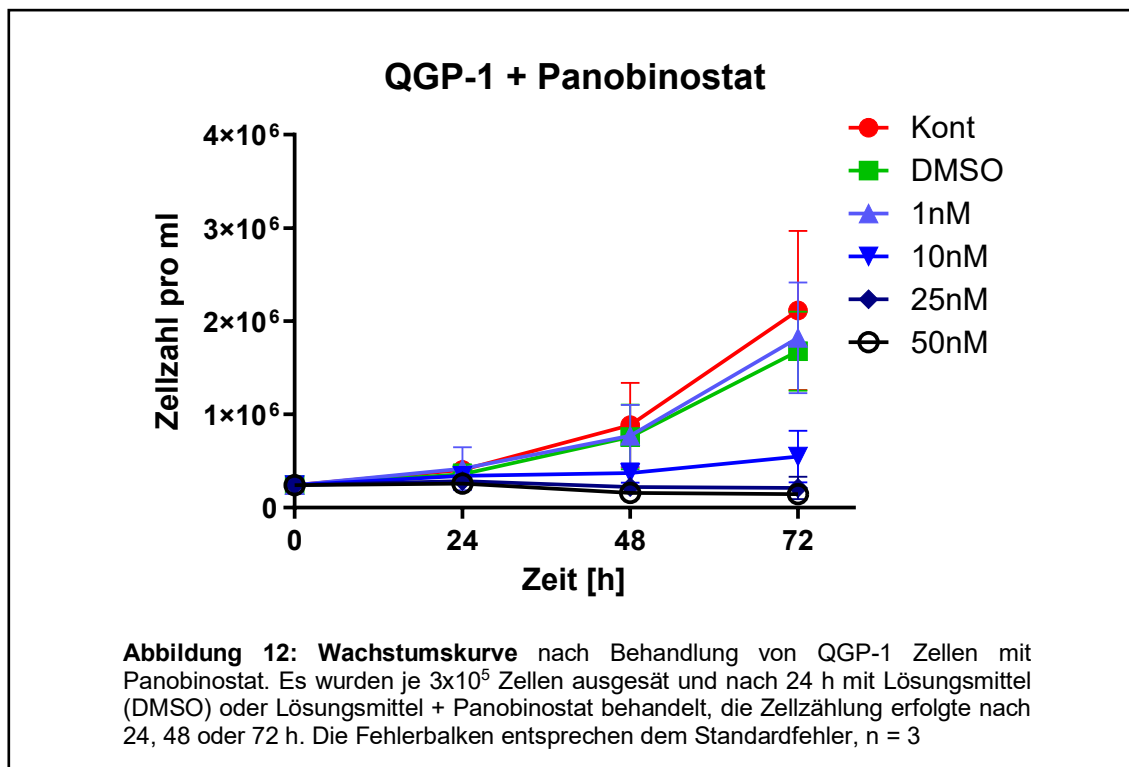
Die erste Einschätzung des Einflusses von Panobinostat, 5-Azacytidin und Valproat auf die Proliferation erfolgte durch Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer. Es wurden Proben für die Auszählung nach 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlungsbeginn mit den Medikamenten ausgesät. Bei Behandlung mit Valproat wurde die Zellzahl zusätzlich nach sieben Tagen Behandlungsdauer bestimmt.

Bei der Zelllinie BON-1 zeigte sich bei Therapie mit Panobinostat ab der untersuchten Konzentration von 10 nM eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die Zellzahlen der Lösungsmittelkontrolle (DMSO), der Mediumkontrolle (Kont.) und auch der mit 1 nM Panobinostat behandelten Zellen waren zu allen Zeitpunkten auf einem ähnlichen Niveau und zeigten keine signifikanten Unterschiede. 24 Stunden nach Behandlungsbeginn wiesen lediglich die mit einer Konzentration von 50 nM behandelten Proben eine signifikante Verringerung der Zellzahl auf. Der Mittelwert lag dabei bei 33,7% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($p=0,0174$). Die Zellzahlen unter Behandlung mit 10 nM und 25 nM zeigten eine abnehmende Tendenz auf 61,7% ($p=0,0849$) bzw. 49,6% ($p=0,0559$) der Lösungsmittelkontrolle, die jedoch nicht signifikant war. Bei den Untersuchungszeitpunkten nach 48 h und 72 h war die Verringerung der Zellzahl im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ab der untersuchten Konzentration von 10 nM signifikant. So lag die relative Zellzahl im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nach 48 h Therapie mit 10 nM Panobinostat bei 46,2% ($p=0,0107$), mit 25 nM Panobinostat bei 21,3% ($p=0,0020$) und mit 50 nM Panobinostat bei 14,9% ($p=0,0017$). Nach 72 h sank die relative Zellzahl bei Therapie mit

10 nM auf 20,1% ($p=0,0122$), mit 25 nM auf 6,4% ($p=0,0055$) und mit 50 nM auf 3,27% ($p=0,0047$). Nach Behandlung mit 10 nM Panobinostat nahmen die absoluten Zellzahlen im Zeitverlauf weiterhin zu, während sie bei den Behandlungskonzentrationen von 25 nM und 50 nM abnahmen (Abbildung 11).



Bei der Zelllinie QGP-1 ergab sich unter Behandlung mit Panobinostat ein ähnliches Bild, wobei die Mittelwerte in etwas geringerem Maß abnahmen. So zeigte sich nach 24 h noch keine signifikante Verringerung der Zellzahl, sondern lediglich eine Verringerung auf 82,8% bei 25 nM bzw. 74,3% bei 50 nM. Nach einer Behandlungsdauer von 48 h zeigte sich ab einer Konzentration von 10 nM eine deutliche Verringerung der Zellzahl auf 52,4% ($p=0,0764$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Bei relativ großer Standardabweichung der Lösungsmittelkontrolle war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. Die Behandlung mit 25 nM führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl auf 33,5% ($p=0,0242$) der Lösungsmittelkontrolle, die Behandlung mit 50 nM führte zu einer Reduktion auf 23,4% ($p=0,0137$) der Lösungsmittelkontrolle. Nach 72 h Behandlungsdauer zeigte sich weiterhin keine signifikante Änderung der Zellzahlen bei der Mediumkontrolle und den mit 1 nM Panobinostat behandelten Proben im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Unter Therapie mit 10 nM verringerte sich die Zellzahl signifikant auf 34,1% ($p=0,0044$), mit 25 nM auf 13,4% ($p=0,0006$) und mit 50 nM auf 9,1% ($p=0,0004$) jeweils im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die absoluten Zellzahlen nahmen ab einer Konzentration von 25 nM im Zeitverlauf ab (Abbildung 12).



Zur Ergänzung der Ergebnisse der Zellviabilitätsmessung wurde mit den Medikamenten 5-Azacytidin und Valproat ebenfalls eine Wachstumskurve mit der Zelllinie BON-1 erstellt.

Unter Behandlung mit 5-Azacytidin in Dosierungen von 10-100 nM zeigte sich nach 24 h und 48 h keine Tendenz bei den Zellzahlen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Essigsäure). Nach 72 h zeigte sich eine leicht abnehmende Tendenz der Zellzahl bei steigender Dosierung. So lag die relative Zellzahl im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei Behandlung mit 10 nM 5-Azacytidin bei 95,1%, mit 50 nM bei 84,4% und mit 100 nM bei 77,9%. Die Zellzahl der Mediumkontrolle lag mit 89,6% der Lösungsmittelkontrolle jedoch auch etwas niedriger. Die absolute Zellzahl nahm bei allen untersuchten Konzentrationen stets zu. Aufgrund der fehlenden Effekte auf die Zellviabilität und der nur geringen abnehmenden Tendenz der Zellzahl nach 72 h Behandlung wurde der Versuch nur einmal durchgeführt und es erfolgte keine statistische Auswertung.

Unter Therapie mit Valproat in Dosierungen von 10 μ M bis 1 mM zeigte sich nach 24 h und 48 h eine leichte Zunahme der Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle ohne dosisabhängige Tendenz. Nach 72 h nahm die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle bei Therapie mit 10 μ M auf 94,8%, bei Therapie mit 100 μ M auf 90,7% und bei Therapie mit 1 mM auf 71,1% ab. Eine Behandlung über sieben Tage führte bei Behandlung mit 10 μ M Valproat zu einer leichten Zunahme der relativen Zellzahl auf 102,3%, während die Behandlung mit 100 μ M eine Abnahme auf 91,3% und die Behandlung mit 1 mM eine Abnahme auf 70,1% zur Folge hatte. Auch bei Valproat nahmen die absoluten Zellzahlen bei allen untersuchten Konzentrationen im Zeitverlauf zu. Aufgrund der

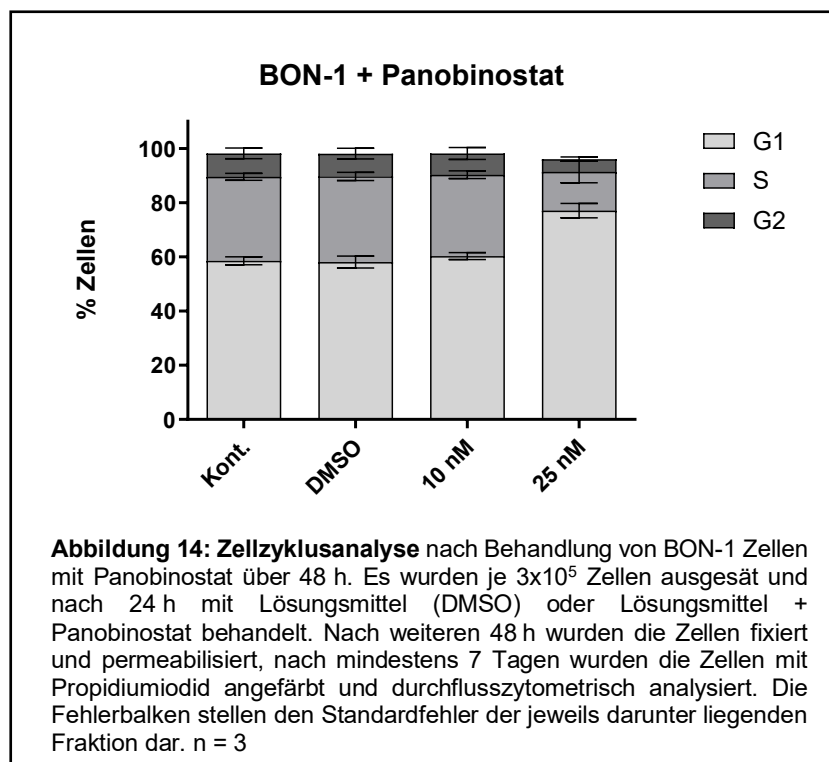
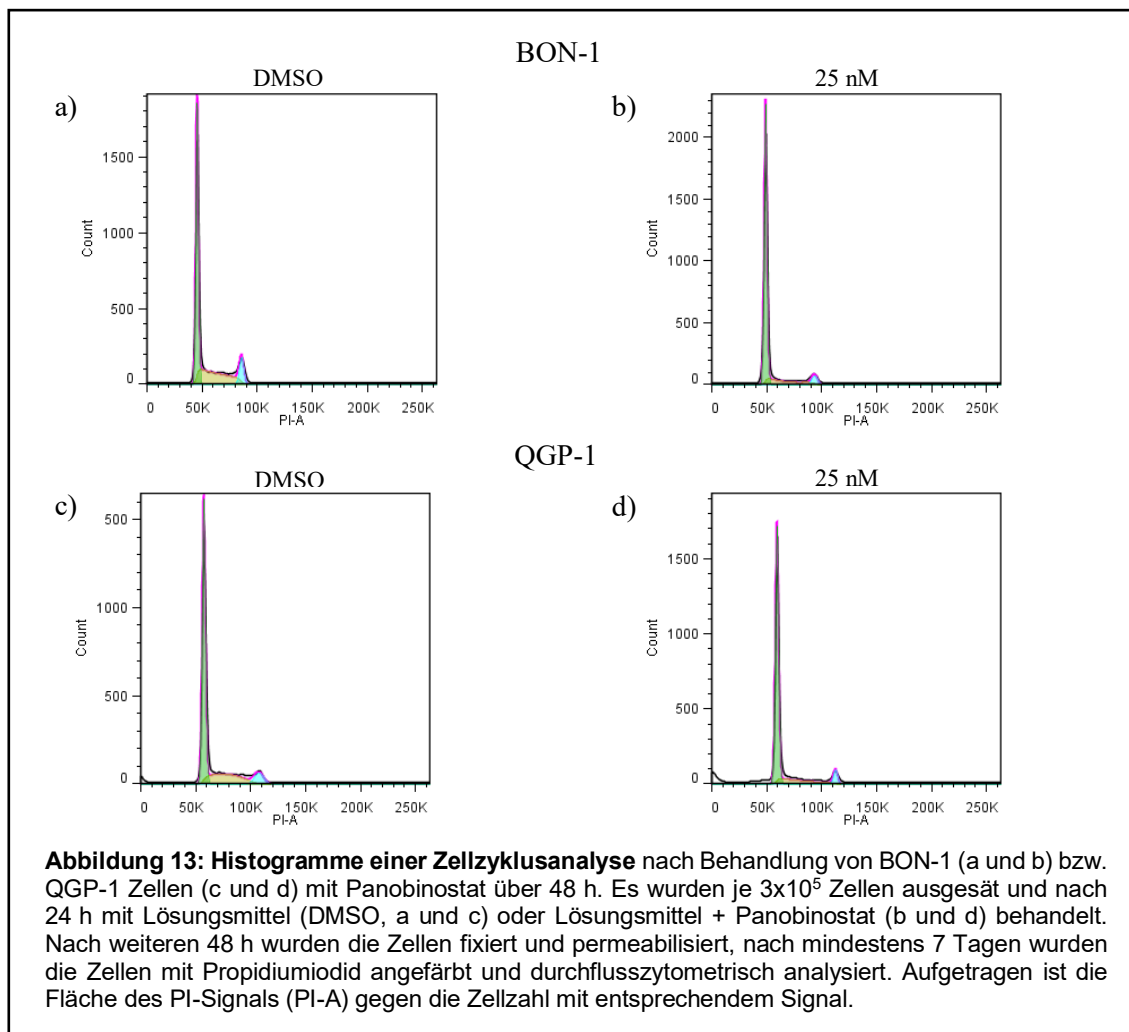
geringen Wirkung in der Zellviabilitätsanalyse und der geringen Abnahme der Zellzahl im Vergleich zu Panobinostat wurde auch dieser Versuch nur einmal durchgeführt und es erfolgte keine weitere statistische Analyse.

Zusammenfassend zeigte sich unter Panobinostat in beiden Zelllinien eine deutliche Reduktion der Zellzahlen ab der Untersuchungskonzentration von 10 nM. Die Abnahme der relativen Zellzahlen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle fielen bei BON-1 Zellen tendenziell deutlicher aus als bei QGP-1 Zellen. Ab der Untersuchungskonzentration von 25 nM nahmen die absoluten Zellzahlen bei beiden Zelllinien im Zeitverlauf ab. Bei 5-Azacytidin und Valproat zeigte sich bei der Zelllinie BON-1 nach einmaliger Erstellung einer Wachstumskurve erst nach 72 h Behandlung eine abnehmende Tendenz der Zellzahlen. Diese war deutlich geringer ausgeprägt als nach Behandlung mit Panobinostat.

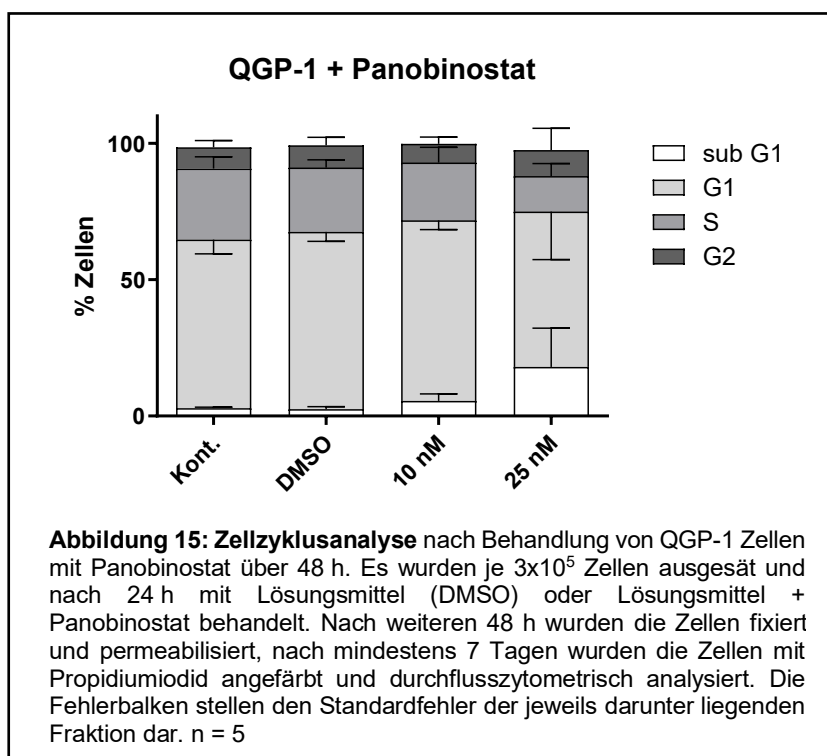
4.3.2 Zellzyklusanalyse

Zur Erörterung der Ursachen der deutlich verringerten Zellzahl unter Behandlung mit Panobinostat wurde nach einer Behandlungsdauer von 48 h eine durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus durchgeführt. Es wurden BON-1 und QGP-1 Zellen mit Panobinostat in den Konzentrationen von 10 nM und 25 nM behandelt (Abbildung 13).

Dabei zeigte sich in BON-1-Zellen keine Änderung des Anteils an Zellen in der S-Phase bei einer Behandlung mit 10 nM. Bei 25 nM zeigte sich hingegen eine signifikante Abnahme der Zellen in der S-Phase von 31,6% bei der Lösungsmittelkontrolle auf 14,3% ($p=0,0023$). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der G2-Phase. Dort sank der Anteil der Zellen nur bei den mit 25 nM behandelten Zellen signifikant von 8,4% bei der Lösungsmittelkontrolle auf 4,7% ($p=0,0406$). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Zellen in der G1-Phase ab der Behandlungskonzentration von 25 nM eine signifikante Zunahme des Anteils an den untersuchten Zellen von 58,1% bei der Lösungsmittelkonzentration auf 77,0% ($p=0,0007$). Das Gesamtbild entspricht einem Arrest der Zellen in der G1-Phase (Abbildung 14).



QGP-1 Zellen zeigten unter der gleichen Behandlung ab einer Konzentration von 25 nM ebenfalls eine signifikante Abnahme des Anteils an Zellen in der S-Phase auf 13,0% im Vergleich zu 23,6% in der Lösungsmittelkontrolle ($p=0,0025$). Bei Betrachtung von G1- und G2-Phase zeigten sich keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlung. Bei der G1-Phase fand sich lediglich eine leichte Abnahme bei Behandlung mit 25 nM von 64,5% auf 50,0% ($p=0,2869$) bei größerer Standardabweichung. Bei QGP-1 Zellen nahm dafür eine sub-G1-Fraktion deutlich zu. Die Zellen dieser Fraktion wiesen einen verringerten Gesamtgehalt an DNA auf. So zeigte sich bereits bei Therapie mit 10 nM Panobinostat eine zunehmende Tendenz der sub-G1-Fraktion von 2,9% der Zellen der Lösungsmittelkontrolle auf 6,4% ($p=0,1380$). Bei Behandlung mit 25 nM stieg der Anteil dieser Zellfraktion auf 23,6% ($p=0,0959$), was jedoch aufgrund einer hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Da Zelltrümmer durch das *Gating* nicht mit ausgewertet werden, sind diese Zellen vermutlich stark geschädigt und könnten eine apoptotische/nekrotische Zellfraktion darstellen (Abbildung 15).



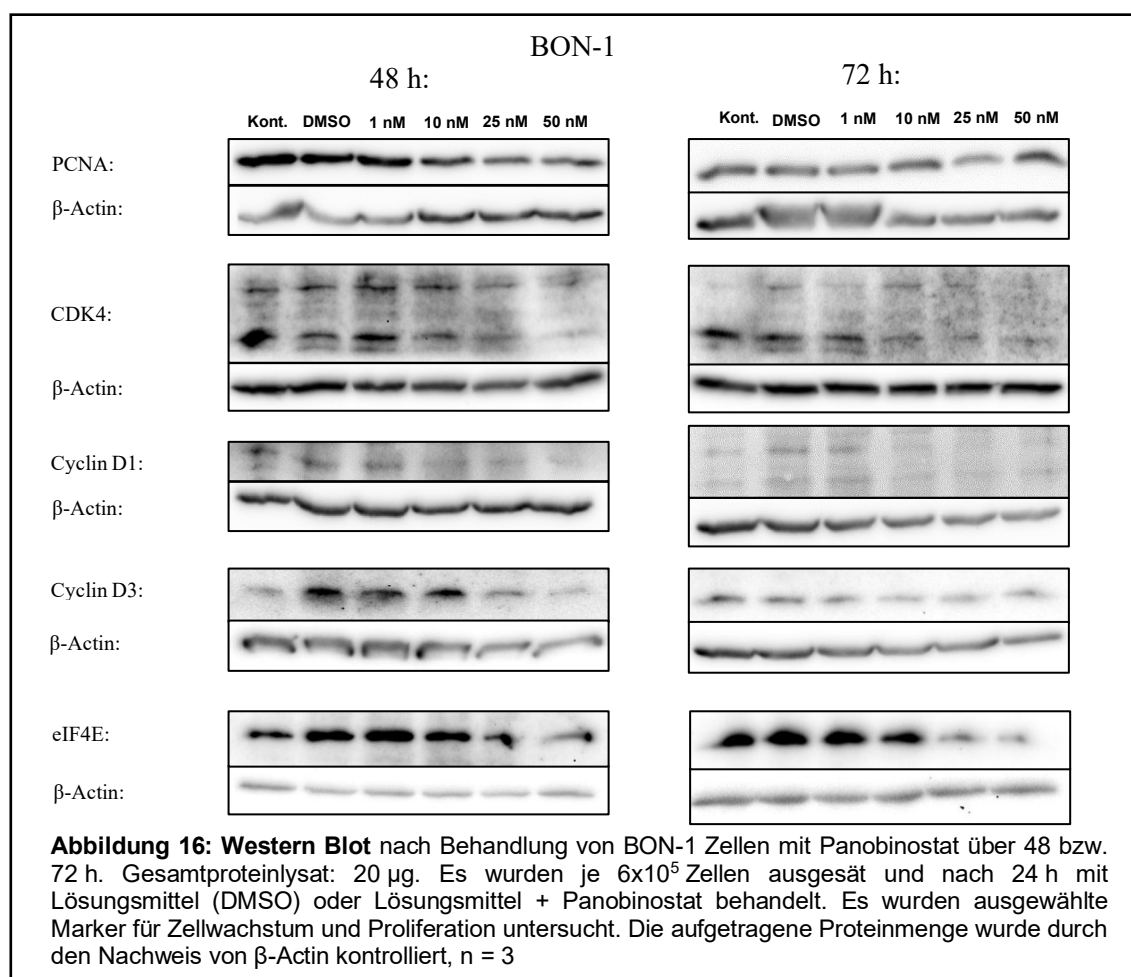
Sowohl in der Zelllinie BON-1 als auch QGP-1 zeigte sich eine Abnahme der Zellen in der S-Phase. Während bei BON-1 Zellen der Anteil der Zellen in der G1-Phase zunahm, zeigte sich bei QGP-1 Zellen vor allem eine deutliche Zunahme der Zellen einer sub-G1-Fraktion.

4.3.3 Proliferationsmarker auf Proteinebene

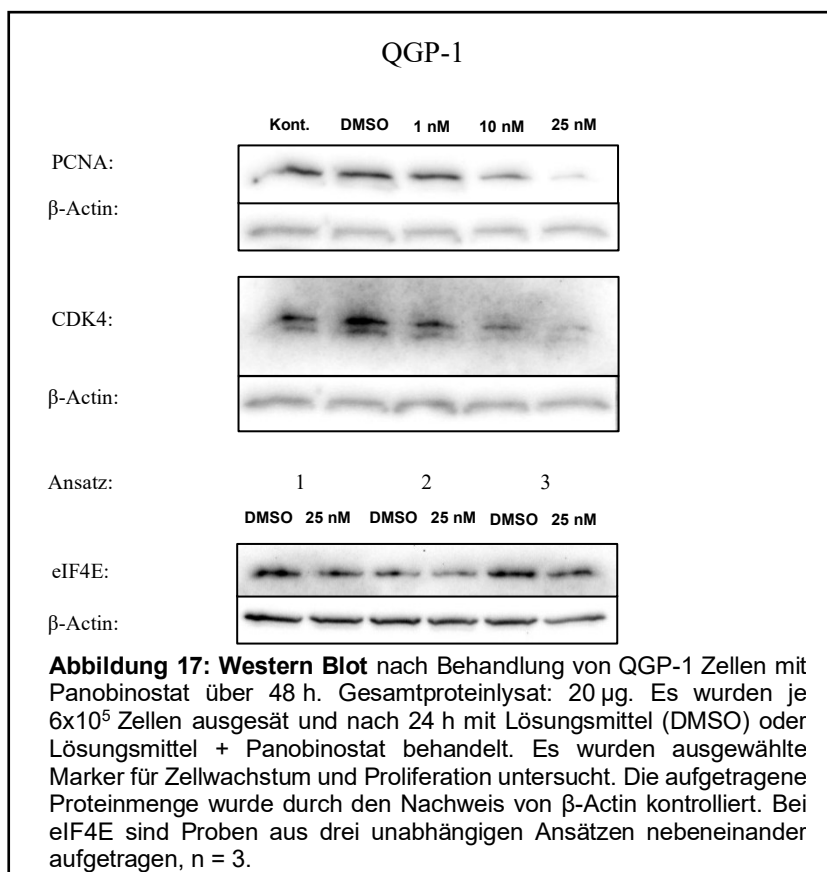
Auf Proteinebene wurden zusätzlich einige für die Zellproliferation und Zellwachstum relevante Proteine untersucht. Hierfür wurden BON-1 Zellen mit Panobinostat in Konzentrationen bis 50 nM und QGP-1 Zellen mit Konzentrationen bis 25 nM behandelt. Bei der Zelllinie BON-1

erfolgten Analysen nach 24 h, 48 h und 72 h Behandlungsdauer, bei der Zelllinie QGP-1 nach einer Behandlung über 48 h und bei einem Teil der Proteine nach einer Behandlung über 72 h. Neben dem für die Regulation der Replikation sowie von DNA-Reparaturen bedeutsamen PCNA (Naryzhny 2008) und dem für die Initiation der Proteinsynthese an den Ribosomen essentiellen eIF4E wurden die direkt am Zellzyklus beteiligten CDK4, Cyclin D1 und D3 sowie die Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 untersucht. CDK 4 und Cyclin D sind vor allem während der G1-Phase bzw. für den Übergang in die S-Phase relevant. Die CDKs können teilweise im Komplex mit den zugehörigen Cyclinen durch p21 und p27 gehemmt werden.

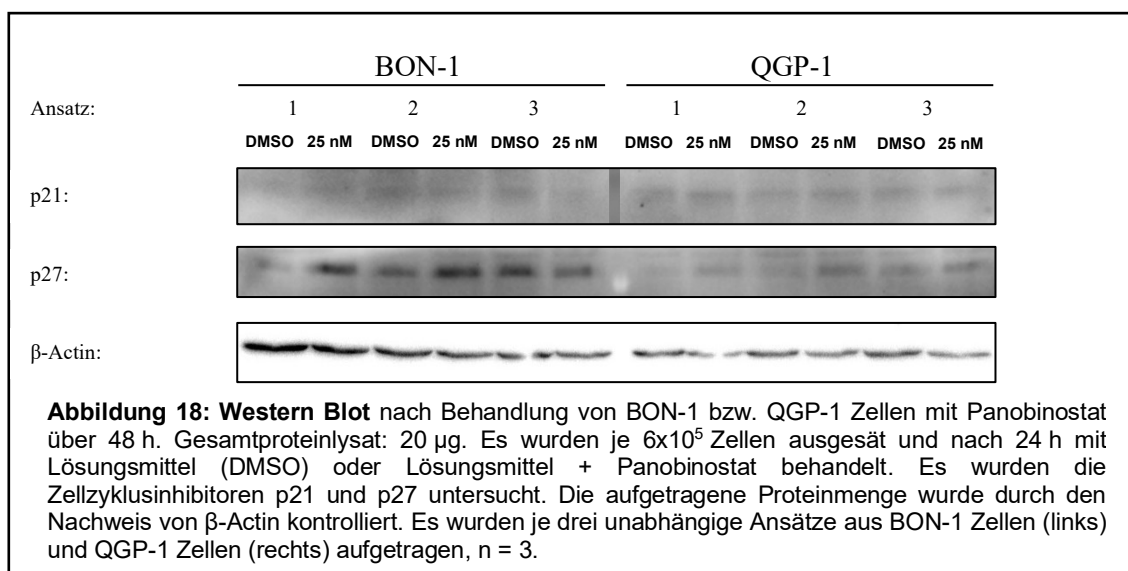
In BON-1 Zellen zeigten sich bei den Analysen nach 24 h keine relevanten, reproduzierbaren Effekte, weshalb die Ergebnisse hier nicht dargestellt sind. Bei PCNA zeigte sich nach 48 h reproduzierbar eine abnehmende Tendenz des Proteinlevels unter Therapie mit Panobinostat. Nach 72 h Behandlungsdauer war dies jedoch nur in einem der unabhängigen Ansätze vergleichbar, in den weiteren Ansätzen zeigte sich keine deutliche Tendenz. Die Proteinlevel von CDK4 und eIF4E zeigten sowohl nach 48 h als auch nach 72 h Behandlungsdauer reproduzierbar eine abnehmende Tendenz unter Therapie. Die Cycline D1 und D3 zeigten widersprüchliche Tendenzen in den verschiedenen unabhängigen Ansätzen (Abbildung 16).



In der Zelllinie QGP-1 zeigten sich nur sehr schwache Signale bei Untersuchung der Cycline D1 und D3, wodurch eine Beurteilung der Proteinlevel nicht möglich war. Die Untersuchung von PCNA und CDK4 zeigten mit den Ergebnissen in der Zelllinie BON-1 übereinstimmend eine abnehmende Expression. Diese war in 3 unabhängigen Ansätzen reproduzierbar. Bei eIF4E konnte über mehrere Ansätze hinweg eine leicht abnehmende Proteinexpression gezeigt werden (Abbildung 17).



Bei der Untersuchung von p21 waren die Proteinlevel sehr niedrig und es zeigte sich weder bei BON-1 noch bei QGP-1 eine Veränderung unter Therapie mit 25 nM Panobinostat. Bei p27 zeigten sich vor allem in der Zelllinie BON-1 höhere Proteinlevel. In zwei Ansätzen nahm die Expression auf Proteinebene zu, während in einem dritten Ansatz diese Zunahme nicht nachweisbar war. In der Zelllinie QGP-1 zeigten alle drei Ansätze eine leicht zunehmende Expression unter Therapie (Abbildung 18).

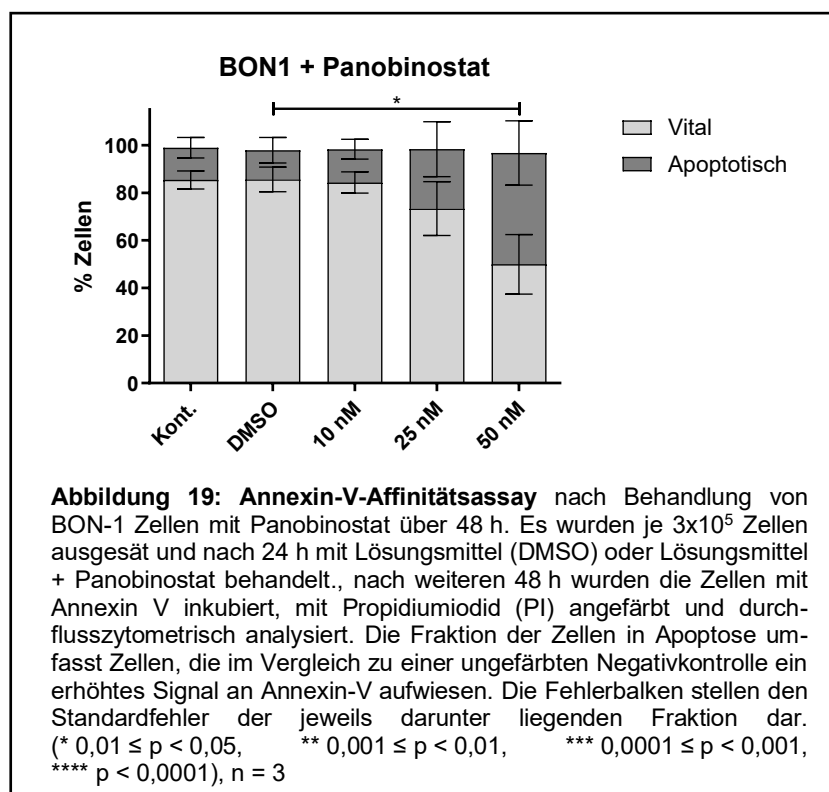


4.4 Untersuchung der Apoptose

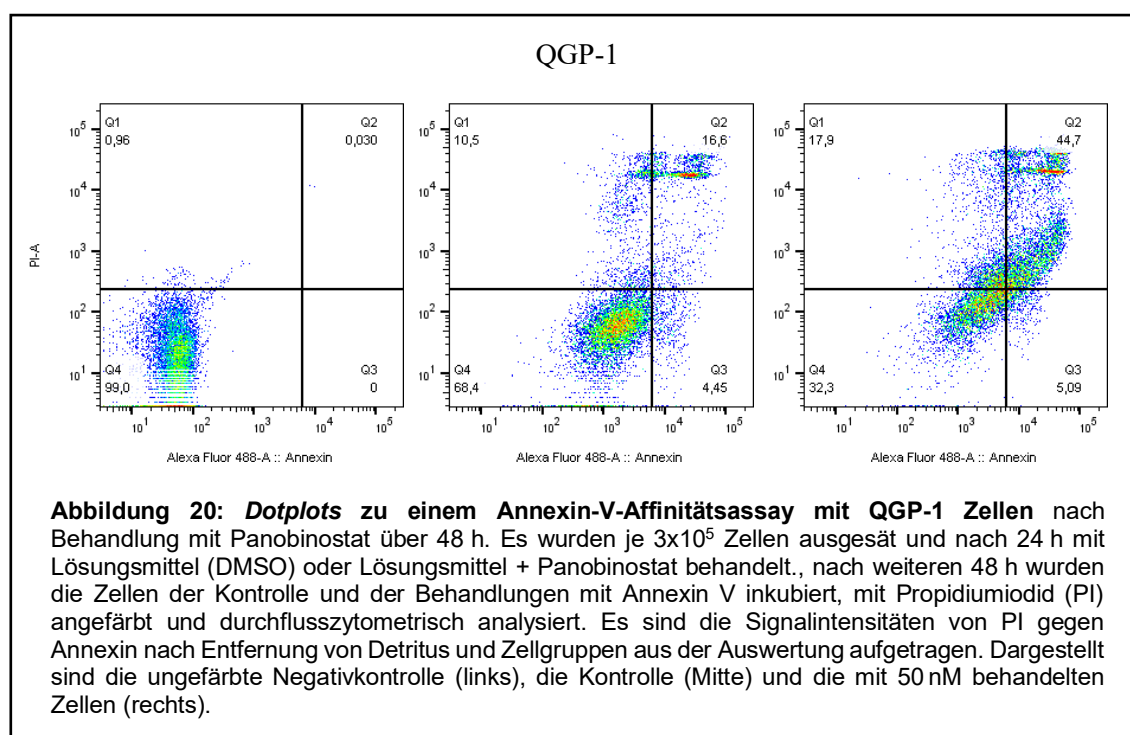
4.4.1 Annexin-V-Färbung

Zur Untersuchung, ob die Therapie mit Panobinostat im Bereich von 10 bis 50 nM Apoptose initiiert, wurde eine Annexin-V-Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch ausgewertet.

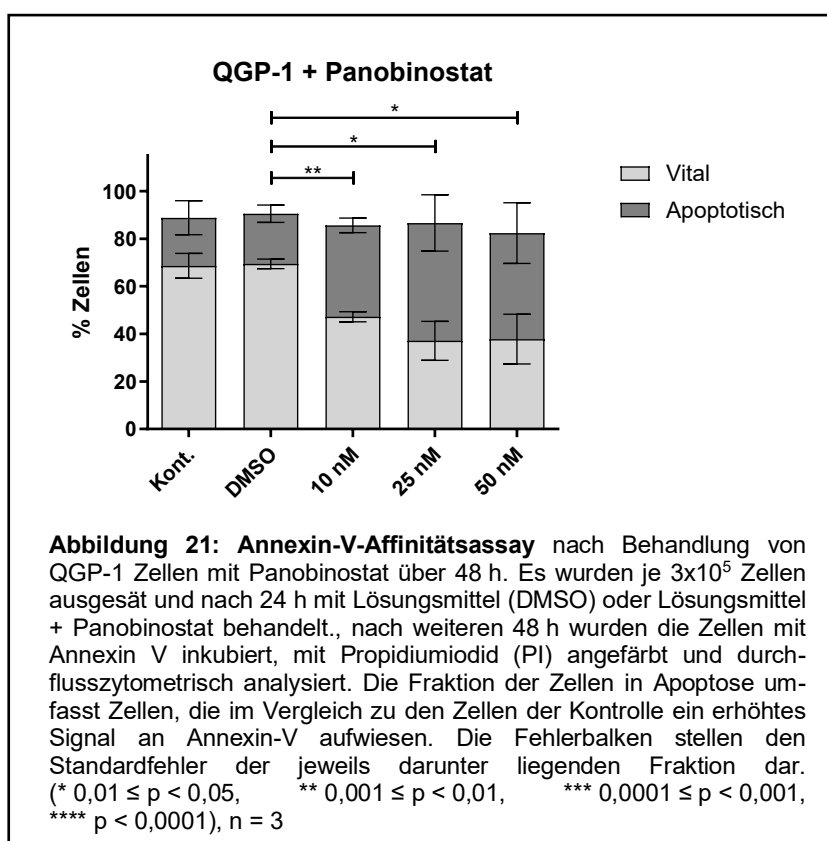
In BON-1 Zellen zeigte sich nach 48 h Therapiedauer eine Zunahme der Annexin-positiven und somit apoptotischen Zellen. Während sich bei Behandlung mit Panobinostat in einer Konzentration von 10 nM noch keine zunehmende Tendenz zeigte, erhöhte sich der Anteil der Annexin-positiven Zellen bei Therapie mit 25 nM nicht signifikant von 12,3% in der Lösungsmittelkontrolle auf 25,0% ($p=0,1593$). Nach Exposition mit 50 nM stieg dieser Zellanteil auf 46,8% ($p=0,0146$), womit eine statistische Signifikanz vorliegt (Abbildung 19). Auch bei weiterer Differenzierung anhand der PI-Aufnahme in früh- und spätapoptotische Zellen zeigte sich ein vergleichbares Bild. Neben einem bei größerer Standardabweichung nicht signifikanten Anstieg frühapoptotischer Zellen bei Behandlung mit 25 nM von 2,1% bei der Lösungsmittelkontrolle auf 8,1% ($p=0,1661$) zeigte sich bei 50 nM ein signifikanter Anstieg auf 8,3% ($p=0,0137$). Spätapoptotische Zellen machten bei Behandlung mit 25 nM einen etwas höheren Anteil von 16,9% ($p=0,1719$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 10,2% aus. Erst bei einer Behandlung mit 50 nM war der Anstieg auf 38,5% signifikant ($p=0,0156$). Es trat unter Therapie mit Panobinostat keine signifikante Zunahme der nekrotischen Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle auf.



Bei Durchführung der Versuche mit der Zelllinie QGP-1 wiesen bereits unbehandelte Zellen ein stärkeres Annexin-Signal auf als ungefärbte Zellen. Die für die Waschschritte während der Färbung verwendete Pufferlösung zeigte hierbei keinen Einfluss. Aufgrund dieser Verschiebung wurden die Quadranten zur Einteilung der Zellfraktionen anhand der Kontrolle vorgenommen. Die entsprechenden *Dotplots* sind in Abbildung 20 dargestellt.



Der Anteil an apoptotischen Zellen nahm bereits ab einer Behandlung mit 10 nM Panobinostat signifikant von 21,1% auf 38,5% zu ($p=0,0032$). Unter Therapie mit 25 nM stieg der Mittelwert auf 49,5% ($p=0,0166$). Die höchste untersuchte Dosis von 50 nM führte hingegen nur zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen auf einen Anteil von 44,5% ($p=0,0374$). Die Standardabweichungen der Proben mit 25 und 50 nM Panobinostat waren größer als die der anderen Proben (Abbildung 21). Die weitere Differenzierung anhand der PI-Aufnahme zeigte keine signifikante Veränderung der frühapoptotischen Zellfraktion. Die spätapoptotischen Zellen nahmen hingegen bereits bei einer Konzentration von 10 nM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant zu. Dabei stieg der Anteil der Zellen von 16,3% bei der Lösungsmittelkontrolle auf 31,8% ($p=0,0017$) bei 10 nM. Auch hier zeigte sich der höchste Anteil von 40,0% ($p=0,0080$) bei Behandlung mit 25 nM Panobinostat. Bei 50 nM lag der Zellanteil bei 39,4% ($p=0,0287$). Im Gegensatz zur Zelllinie BON-1 stieg die nekrotische Zellfraktion unter Therapie mit 50 nM signifikant von 9,5% bei der Lösungsmittelkontrolle auf 17,6% an ($p=0,0133$).

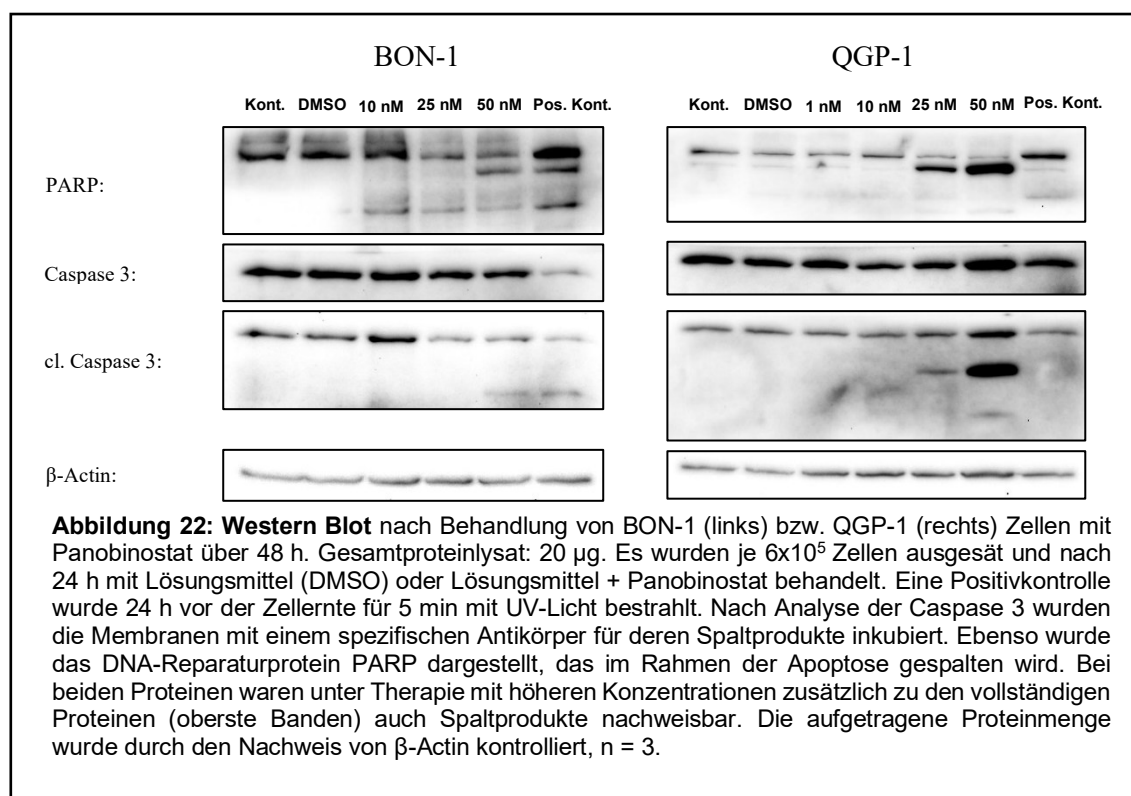


Der direkte Vergleich der Ergebnisse beider Zelllinien ist aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens bei der Färbung nur eingeschränkt möglich. Beide Zelllinien zeigen jedoch eine verstärkte Bindung von Annexin-V und eine zusätzliche Aufnahme von PI unter Therapie mit Panobinostat.

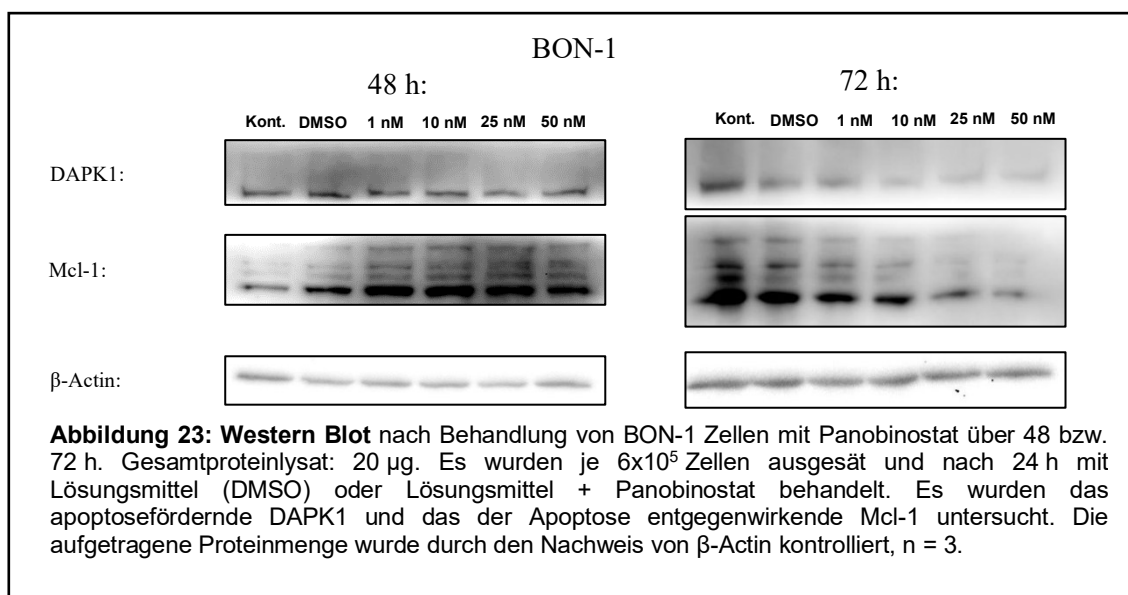
4.4.2 Untersuchung der Apoptose auf Proteinebene

Ergänzend wurde die Expression von apoptosefördernden und -hemmenden Proteinen und die Spaltung von Caspase 3 und PARP untersucht. DAPK1 ist ein proapoptotisch wirkendes Protein, das in der Regulation der Apoptose durch unterschiedliche intrinsische und extrinsische Faktoren (u.a. IFN- γ , TNF- α) eine Rolle spielt (Chen et al. 2005; Singh et al. 2016). Mcl-1 ist ein antiapoptotisch wirkendes Protein der Bcl-2-Familie, das neben weiteren Proteinen dieser Gruppe die Porenbildung in der Mitochondrienmembran durch Bax und Bak hemmt (Hervouet et al. 2013). Caspase 3 ist in der Signalkaskade der Apoptose die zentrale Effektor-Caspase, die über alle Aktivierungswege gespalten wird und weitere Effektor-Caspasen und weitere Proteine wie z.B. PARP spaltet. PARP ist ein DNA-Reparaturprotein, das im Rahmen der Apoptose durch Caspase 3 gespalten wird.

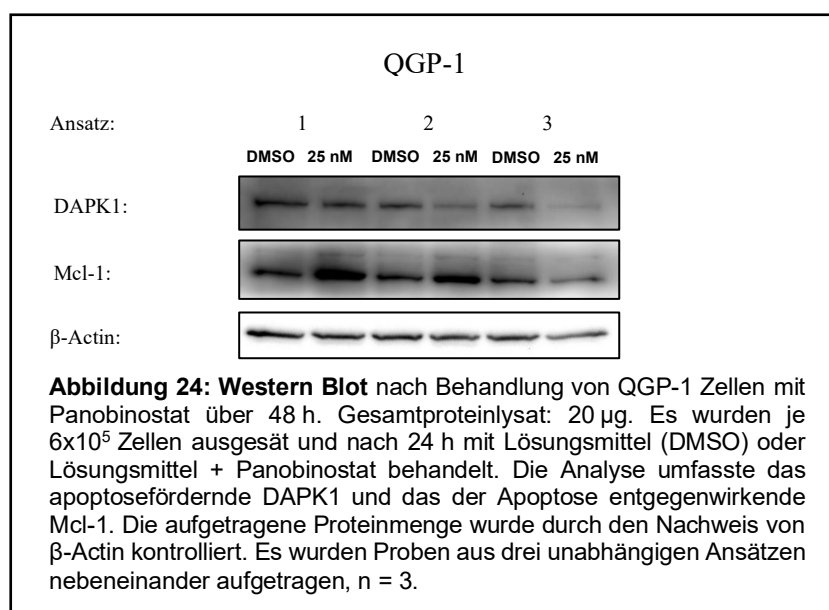
Hierbei konnte wiederholt sowohl bei QGP-1 als auch bei BON-1 Zellen eine Spaltung von Caspase 3 und die daraus resultierende Spaltung von PARP mit einem 89 kDa großen Fragment nachgewiesen werden (Abbildung 22).



Bei Betrachtung von Mcl-1 und DAPK1 zeigte sich hingegen kein eindeutiges Bild. In der Zelllinie BON-1 nahm der Proteingehalt an Mcl-1 in zwei Ansätzen bereits ab einer Behandlungsdauer von 48 h deutlich ab, im hier dargestellten Ansatz trat dies erst nach einer Behandlungsdauer von 72 h auf. DAPK1 zeigte in BON-1 Zellen keine deutlichen, reproduzierbaren Tendenzen (Abbildung 23).



In QGP-1 Zellen zeigte sich bei Betrachtung nach 48 h Behandlungsdauer eine Abnahme von DAPK1 auf Proteinebene und kein eindeutiges Bild bei Mcl-1 mit einer Zunahme in zwei Ansätzen und einer Abnahme im Dritten (Abbildung 24).

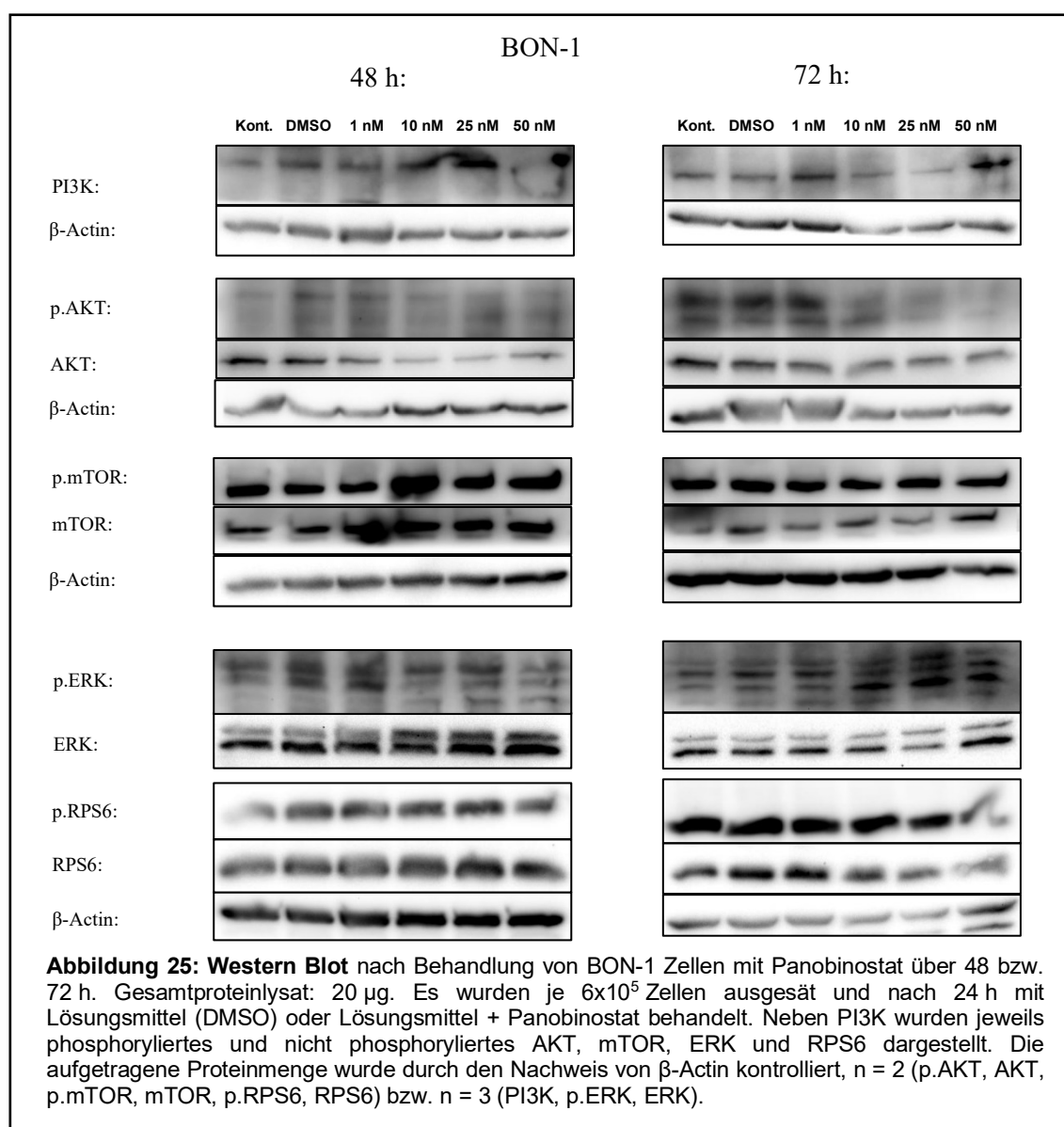


4.5 Einfluss auf den mTOR-Signalweg und Zelladhäsionsproteine

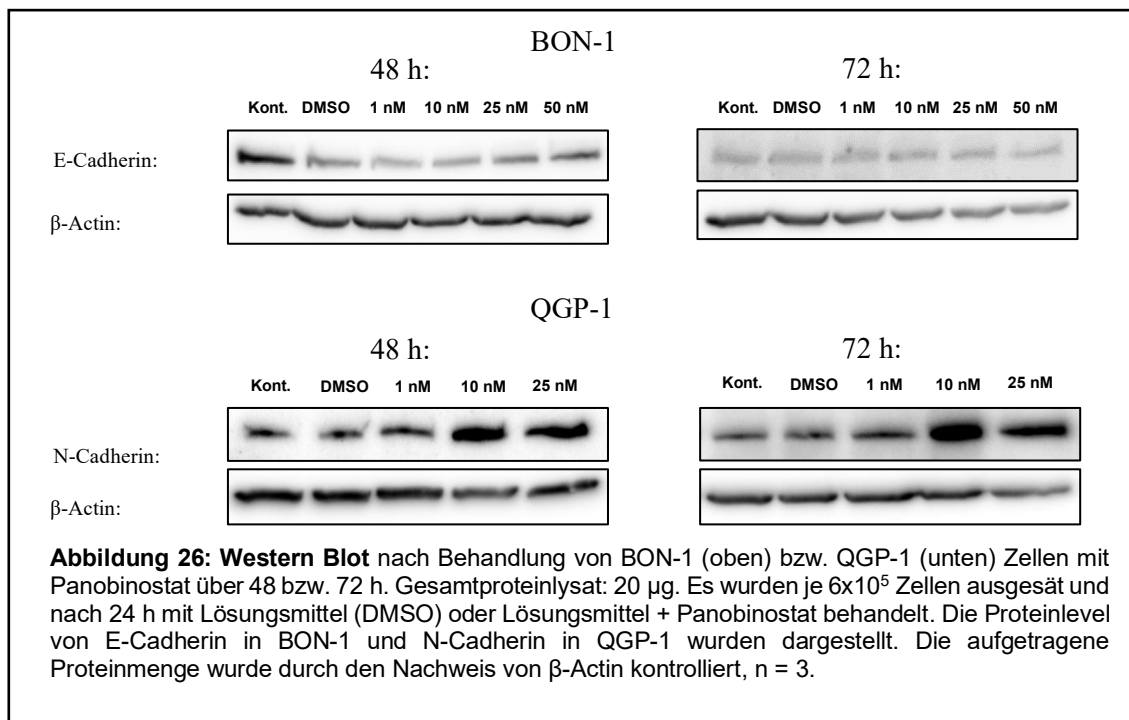
Zur weiteren Einschätzung der Wirkung einer Behandlung mit Panobinostat auf die Zellbiologie wurden ausgewählte Proteine in der Zelllinie BON-1 mittels Western Blots untersucht. Da in etwa 15 % der pNET Mutationen im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vorliegen (Jiao et al. 2011) und die bereits etablierte Gabe von Everolimus in diesem ansetzt, wurden einige Proteine aus diesem Signalweg und deren Phosphorylierung betrachtet. Der Signalweg spielt eine große Rolle in der Vermittlung von Wachstumssignalen. Darüber hinaus wurde ERK betrachtet, welches eine Verbindung vom EGFR-Signalweg zum PI3K/AKT/mTOR-Signalweg herstellt. Darüber hinaus

wurden in BON-1 und QGP-1 Zellen die Zelladhäsionsproteine E- und N-Cadherin als Marker für die epithelial-mesenchymale Transition im Western Blot betrachtet.

Bei den Proteinen PI3K, AKT, mTOR, ERK und RPS6 zeigten sich keine reproduzierbaren Veränderungen der Proteinexpression unter Therapie mit Panobinostat. Auch bei der Phosphorylierung von AKT, mTOR und ERK ließen sich keine deutlichen Tendenzen erkennen und bei Wiederholung der Versuche ergaben sich teils uneindeutige Ergebnisse. RPS6 zeigte in einzelnen Ansätzen beinahe keine Phosphorylierung unter Therapie, in anderen Ansätzen war keine Tendenz erkennbar (Abbildung 25).

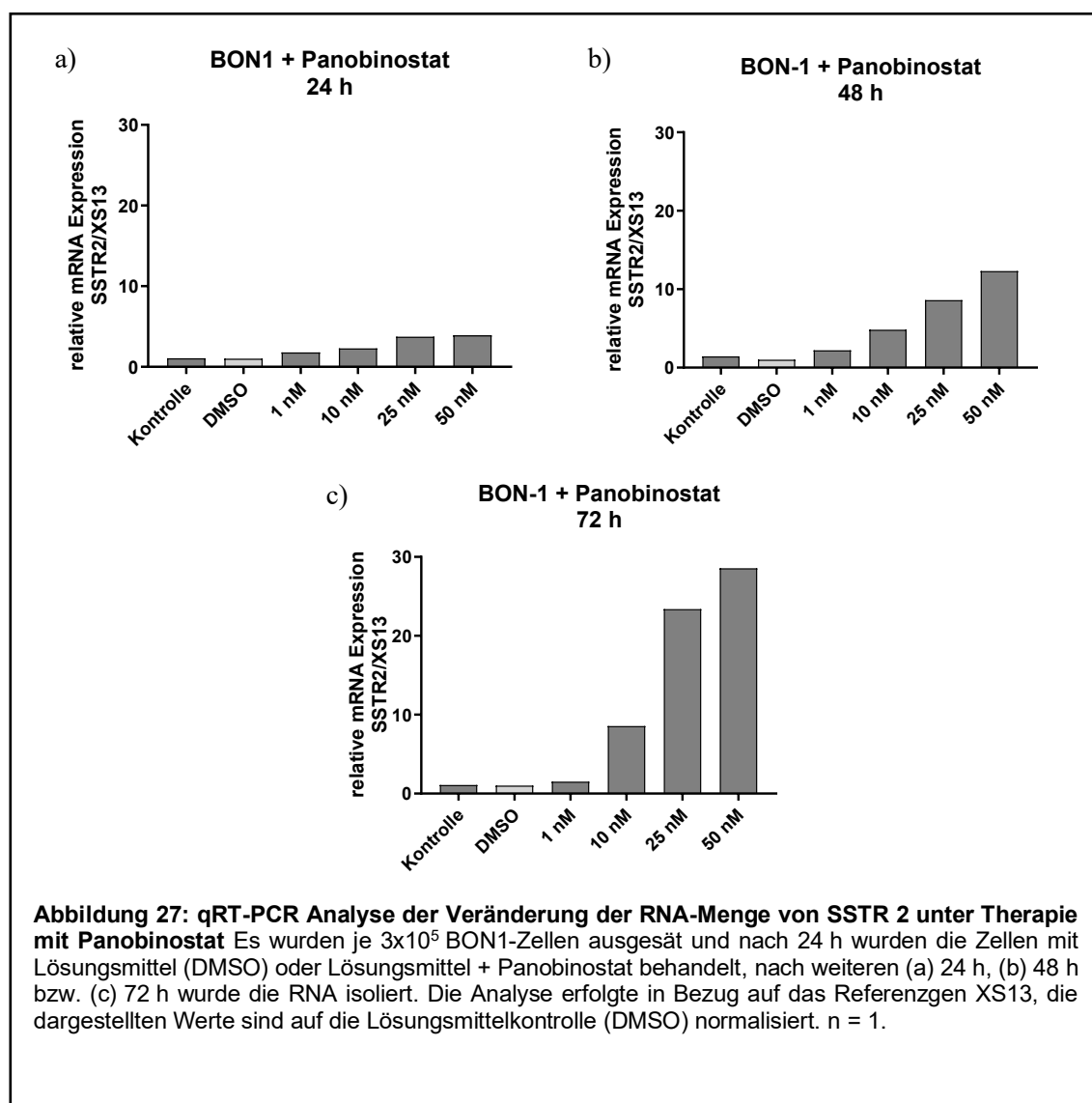


In der Untersuchung der Zelladhäsionsproteine zeigte sich nicht reproduzierbar einmalig eine Zunahme von E-Cadherin in BON-1 Zellen. N-Cadherin hingegen war nur in sehr geringer Konzentration nachweisbar. In QGP-1 Zellen war N-Cadherin nachweisbar und unter Therapie mit Panobinostat zeigte sich reproduzierbar eine Zunahme des Proteinlevels (Abbildung 26).



4.6 Expression der Somatostatinrezeptoren auf RNA-Ebene

Im Hinblick auf eine mögliche Kombinationstherapie mit Somatostatinanaloga wurde der Einfluss von Panobinostat auf die Expression der Somatostatinrezeptoren (SSTR) untersucht. Mittels einer qRT-PCR wurden SSTR 1,2 und 5 in BON-1 Zellen betrachtet. Hierbei zeigten sich jedoch jeweils hohe Ct-Werte von 25 - 33,5. Bei somit nur geringer Expression der untersuchten RNAs in den Zelllinien wurde die Messung nach einmaliger Durchführung nicht fortgesetzt. Bei SSTR 1 und 5 zeigten sich Schwankungen der RNA-Menge ohne erkennbare Tendenz. Bei SSTR 2 zeigte sich in der qPCR bei der einmaligen Durchführung eine Vervielfachung der RNA-Menge unter Therapie im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 27).



In einem Probedurchlauf, in dem bei hohen Behandlungskonzentrationen nicht ausreichend RNA gewonnen werden konnte, zeigte sich - soweit darstellbar - ein vergleichbares Bild.

5 Diskussion

Die Therapie fortgeschrittener pankreatischer neuroendokriner Tumore gestaltet sich bis heute schwierig und keine der etablierten medikamentösen Therapien führt zu einer zufriedenstellenden Verbesserung der Prognose. Da häufige Mutationen in neuroendokrinen Tumoren wichtige Regulatoren der Epigenetik betreffen, stellen epigenetische Modulatoren einen vielversprechenden Ansatz dar. In dieser Arbeit konnte eine ausgeprägte Hemmung der Proliferation und eine Induktion von Apoptose in den neuroendokrinen Tumorzelllinien BON-1 und QGP-1 durch den HDAC-Inhibitor Panobinostat bereits in klinisch erreichbaren Dosierungen gezeigt werden.

5.1 Einfluss auf die Zellviabilität

Durch die Gabe von 5-Azacytidin und Valproat in den untersuchten Konzentrationen konnten in dieser Arbeit keine relevanten Effekte auf die Zelllinien bezüglich Zellviabilität sowie in einer einmalig bestimmten Wachstumskurve gezeigt werden. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Analysen mit diesen Substanzen bezüglich der Induktion von Apoptose durchgeführt.

Während bei Valproat eine Wirkung auf die Viabilität intestinaler NET erst bei Konzentrationen mit wahrscheinlich hoher Toxizität *in vivo* auftrat (Arvidsson et al. 2016; Li et al. 2005), erscheint eine Wirkung von 5-Azacytidin bei Exposition mit höheren Konzentrationen möglich (Alexander et al. 2010; Venturelli et al. 2013). Auch eine länger andauernde Behandlung mit Konzentrationen im nanomolaren Bereich konnte bei diversen hämatologischen und soliden Tumoren die Expressionsmuster beeinflussen (Tsai et al. 2012).

Bei Exposition mit Panobinostat zeigte sich hingegen sowohl in BON-1 als auch in QGP-1 Zellen ein signifikanter Einfluss auf die Zellviabilität. Weitere Analysen ergaben hierbei neben einer direkten Abnahme der Proliferation eine Induktion von Apoptose als wesentlichen Mechanismus. Dabei traten die deutlichen Effekte bei den meisten Untersuchungen ab Konzentrationen von 25 bis 50 nM auf. Auch in anderen Tumorentitäten konnten vergleichbare Effekte nachgewiesen werden. Die hierfür erforderlichen Konzentrationen lagen überwiegend in ähnlichen Größenordnungen (Wasim und Chopra 2016; Woods et al. 2013; Ouaïssi et al. 2012; Dias et al. 2018). Lediglich beim Mamma-Karzinom zeigte sich eine deutliche Differenz der IC₅₀ zwischen verschiedenen Zelllinien von 6,25 nM bis >2 µM (Qin et al. 2019).

Die funktionelle Charakterisierung in Zelllinien aus pNET erfolgte anhand direkter Zellviabilitätsmessung, Wachstumskurven, Western Blot Analysen und durchflusszytometrischen Analysen des Zellzyklus und der Annexinbindung. Hierbei zeigte sich zunächst ein übereinstimmendes Bild einer reduzierten Proliferation mit verringerter Zellviabilität, deutlich verringertem Wachstum in den Wachstumskurven, einem verringerten Anteil an Zellen in der S-Phase mit dem Bild eines G1-Arrests in BON-1-Zellen und unter anderem einer tendenziellen

Abnahme von CDK4 und eIF4E, sowie einer geringen Zunahme von p27 im Western Blot. Die Untersuchung der Apoptose als möglichem relevanten Auslöser ergab einen Nachweis einer zunehmenden Annexinbindung und einer Spaltung von PARP und Caspase 3 beginnend ab einer Behandlungskonzentration von 25 nM. Dabei ist Annexin-V ein Protein, das an Phosphatidylserin bindet, welches bei intakten Zellen auf der Innenseite der Zellmembran vorliegt und im Rahmen der Apoptose auch an der äußeren Membran nachweisbar ist. Caspase 3 ist als Effektorcaspase Teil der Endstrecke des Signalwegs der Apoptose und PARP ist ein Zellreparaturprotein, das im Rahmen der Apoptose durch Caspasen gespalten wird.

Diese Ergebnisse stimmen mit vergleichbaren *in-vitro* Analysen bei Pankreaskarzinomen, Melanom-Zelllinien und Zervixkarzinomen überein (Ouaïssi et al. 2012; Woods et al. 2013; Wasim und Chopra 2016). In anderen Arbeiten wurde hingegen die Induktion von Autophagie betrachtet. In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte in BON-1 und QGP-1 Zellen nach Behandlung mit 10 nM Panobinostat elektronenmikroskopisch die Bildung von Autophagosomen und darüber hinaus eine vermehrte Expression des in der Regulation von Autophagie involvierten p62 gezeigt werden, wobei diese Veränderung auf Proteinebene nur in QGP-1 Zellen signifikant war. Elektronenmikroskopisch zeigten sich in der Arbeit keine Hinweise auf Apoptose (Matrood et al. 2021). Da der Nachweis von gespaltenen Caspase 3, gespaltenem PARP und einer zunehmenden Annexin-V Bindung erst bei Konzentrationen von 25 – 50 nM gelang, scheint die Induktion von Apoptose erst ab diesen höheren Konzentrationen einzusetzen, wobei bei QGP-1 Zellen diese Veränderungen bereits bei niedrigeren Konzentrationen nachweisbar waren.

Auch die leichte Zunahme der Expression von p27 auf Proteinebene konnte bereits in Zelllinien aus Prostatakarzinomen nachgewiesen werden (Vallo et al. 2013), während sich in den Leukämie-Zelllinien NK4 und K562 eine Zunahme der mRNA unter Therapie zeigte (Mosleh et al. 2020). Da p27 den Übergang von der G1-Phase zur S-Phase blockiert, ist der Anstieg gut mit dem G1-Arrest vereinbar. Als Ursachen kommen neben der Aufhebung einer verringerten Expression aufgrund einer epigenetisch bedingten Repression in Tumoren (Livingston et al. 2019) auch eine vermehrte Expression durch den Wegfall von Wachstumssignalen in Frage.

Der bei der Zellviabilitätsmessung beobachtete große Standardfehler in der unbehandelten Kontrolle ist Folge eines niedrigeren Wertes in einer Versuchsdurchführung. Bei den drei technischen Replikaten zeigen sich in dieser Durchführung keine relevanten Unterschiede. Eine sichere Ursache wurde dafür nicht gefunden, am wahrscheinlichsten ist ein Wechsel der Kulturmediumflasche bei der Behandlung der Zellen. Die bei QGP-1 Zellen auftretende sub-G1-Fraktion ließe sich durch einen stärkeren Zelluntergang durch Panobinostat erklären.

Darüber hinaus zeigte sich in QGP-1 Zellen bereits in unbehandelten Zellen eine höhere Annexin-V-Bindung im Vergleich zu ungefärbten Zellen. Die Quadranten wurden aus diesem

Grund anhand der Kontrolle und nicht der ungefärbten Negativkontrolle festgelegt. Durch das höhere Grundniveau der Annexin-V-Bindung war ein exaktes *Gating* und die genaue Quantifizierung der Zellen in Apoptose nur eingeschränkt möglich. Die Zunahme der Bindung von Annexin-V und auch PI konnte jedoch gezeigt werden.

5.2 Beurteilung der Einflüsse auf den mTOR-Signalweg und auf Zelladhäsionsproteine

Der PI3K/AKT/mTOR Signalweg wird durch den Insulinrezeptor, aber auch durch andere Wachstumssignale über EGFR aktiviert. In pNETs spielt der Signalweg eine bedeutende Rolle, da in hemmenden Proteinen des Signalwegs in einigen Fällen Mutationen nachgewiesen wurden (Scarpa et al. 2017). Missiaglia et al. (2010) konnten zeigen, dass die Aktivität dieser Proteine in einem noch größeren Anteil der pNETs verringert ist. Auch therapeutisch ist der mTOR-Inhibitor Everolimus bei pNETs etabliert. Als wesentlicher Faktor für ein Therapieversagen werden sekundäre Resistenzen im Verlauf beschrieben, primäre Resistenzen treten jedoch ebenso auf (Terracciano et al. 2021; Beyens et al. 2019). Hierfür werden mehrere Mechanismen in Betracht gezogen. Während mTORC1 durch Everolimus inhibiert wird, ist mTORC2 weiterhin aktiv. Dies führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von AKT mit konsekutiver Aktivierung anderer Signalwege (Santoni et al. 2014). Das verringerte negative Feedback auf PI3K bewirkt eine weitere Zunahme dieses Effekts. Insgesamt kommt es in der Folge zu einer zunehmenden Aktivierung weiterer Signalwege, wie dem RAS-RAF-MAPK-Signalweg (Carracedo et al. 2008). Ein weiterer Mechanismus ist eine verringerte Konzentration des Zellzyklusinhibitors p27 durch mTORC2, da die Ubiquitinierung und der Abbau von p27 über diesen Komplex beeinflusst wird (Santoni et al. 2014). Von Dilling et al. (2002) konnte in Zellen mit einer Therapieresistenz gegen mTOR-Inhibitoren ein verringerter Spiegel an 4EBP und damit verringerter Inhibition von eIF4E nachgewiesen werden. Da die Therapieresistenz durch eine Normalisierung des 4EBP-Gehalts behoben werden konnte, wurde eine bedeutende Rolle für das Verhältnis von 4EBP zu eIF4E angenommen, wobei ein niedriger Quotient eine Resistenz fördert (Dilling et al. 2002). In einer aktuellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Ausbildung einer sekundären Resistenz gegen Everolimus in BON-1 Zellen und in Lebermetastasen von pNET *MYC* hochreguliert wird, während QGP-1 Zellen eine primäre Resistenz aufweisen (Terracciano et al. 2021). Zu beachten ist hierbei, dass von Dilling et al. (2002) ebenfalls eine vermehrte Expression von c-Myc beschrieben wurde, die jedoch nach erneuter Sensibilisierung weiterhin vorlag. Es wurden einige Proteine des Signalweges mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigten sich weder bei Phosphorylierung noch Gesamtproteinlevel eine reproduzierbare Tendenz. Auch eine Fortsetzung geringfügiger Veränderungen der Phosphorylierung zeigte sich nicht in der Phosphorylierung der weiteren Proteine der Signalkaskade. Es fand sich hierbei kein Hinweis auf eine erneut

zunehmende Expression hemmender Proteine in der Signalkaskade oder einen möglichen synergistischen Effekt bei einer Kombinationstherapie. Aufgrund konstanter Aktivitätslevel des in den Tumoren übermäßig aktivierten Signalweges erscheint eine kombinierte Gabe weiterhin als mögliche Therapieoption, die in weiteren Arbeiten untersucht werden müsste.

Um einen Eindruck bezüglich möglichen Metastasierungsverhaltens und Zellmigration zu erhalten, wurden die Zelladhäsionsmoleküle E- und N-Cadherin untersucht. Während in Epithelien normalerweise ausschließlich E-Cadherin exprimiert wird, kann bei Tumoren im Rahmen einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) stattdessen N-Cadherin exprimiert werden. Während funktionell aktives E-Cadherin starke Zell-Zell-Kontakte ausbildet und es Hinweise dafür gibt, dass es einer Metastasierung entgegenwirkt (Na et al. 2020), ist die Expression von N-Cadherin in Karzinomen allgemein mit einer schlechteren Prognose verbunden (Araki et al. 2011; Gravdal et al. 2007; Hazan et al. 2004). Während in BON-1 Zellen E-Cadherin nachweisbar war, zeigten QGP-1 Zellen eine Expression von N-Cadherin. In beiden Zelllinien war jeweils nur eines der beiden Proteine nachweisbar. Unter Exposition zeigte sich in BON-1 Zellen keine relevante Änderung des E-Cadherins, während in QGP-1 Zellen eine Zunahme des Proteinlevels von N-Cadherin auftrat. Es ergab sich somit kein Hinweis auf eine Redifferenzierung in Bezug auf die Cadherinexpression. Während in einer anderen Arbeit bei intestinalen NET eine verringerte Expression von E-Cadherin und Cateninen mit größeren Tumoren und höheren transmuralem Wachstum korrelierte (Li et al. 2002), sollte die Expression von N-Cadherin in pNET untersucht werden. Zhou et al. (2021) zeigten einen Verlust von E-Cadherin bei der Hälfte der untersuchten pNET sowie eine schlechtere Prognose durch den Verlust des Proteins. Die Expression von N-Cadherin wurde dabei nicht untersucht.

5.3 Einfluss auf die Expression von SSTR1, 2 und 5

Da insbesondere bei gut differenzierten, langsam wachsenden pNETs der Einsatz von gut verträglichen Somatostatin-Analoga eine große Rolle spielt und SSTRs jedoch nicht in allen pNET gleichermaßen exprimiert sind, wäre es denkbar, dass eine vermehrte Expression der Somatostatinrezeptoren durch eine epigenetisch wirksame Therapie das Therapieansprechen verbessert (Klomp et al. 2021b). Als erster Überblick zu möglichen Effekten auf die Transkription wurde eine qRT-PCR für die klinisch relevantesten Somatostatinrezeptoren (SSTR1, 2 und 5) durchgeführt. Hierbei zeigten sich sehr niedrige mRNA-Level in beiden Zelllinien, sodass trotz der deutlichen Zunahme der mRNA-Expression des SSTR2 die Analyse nur einmalig durchgeführt wurde. Aus dieser Arbeit kann somit alleinstehend keine weitere Schlussfolgerung bezüglich einer Wirkung von Panobinostat auf die Expression der SSTRs gezogen werden.

Es gibt bereits weitere Untersuchungen mit anderen DNMT- und HDAC-Inhibitoren in BON-1 und QGP-1 Zellen, die eine deutliche Zunahme der mRNA von SSTR2 durch Behandlung mit

Panobinostat zeigen konnten, während die Ergebnisse auf Proteinebene nur in BON-1 Zellen einen bedeutenden Anstieg aufwiesen (Wanek et al. 2018; Guenter et al. 2020; Veenstra et al. 2018). Die Aufnahme von ^{68}Ga -DOTATOC - einem Radionuklid mit hoher Affinität für SSTR2 – in BON-1 Zellen konnte durch DNMT- und HDAC-Inhibitoren erhöht werden, wobei Panobinostat einen geringeren Effekt als mehrere andere HDAC-Inhibitoren hatte (Taelman et al. 2016; Klomp et al. 2021a). In der Folge konnte eine vermehrte Internalisierung von ^{111}In -DOTATATE gezeigt werden (Klomp et al. 2021a). Interessanterweise fand sich in vergleichenden Untersuchungen von u.a. BON-1 und QGP-1 Zellen mit Primärtumoren eine deutlich verringerte Expression von SSTRs auf RNA-Ebene und immunhistochemisch auf Proteinebene im Vergleich zu Primärtumoren, was zu einer ausbleibenden Wirkung von Octreotid führte (Exner et al. 2018; Moreno et al. 2008). Die Octreotidaufnahme konnte durch Exposition mit 5-Aza-2-deoxycytidin oder Valproat in BON-1 Zellen signifikant gesteigert werden (Veenstra et al. 2018). Aus diesem Grund sollte eine Validierung dieser auf niedrigem Level gezeigten Tendenz in weiteren Modellen erfolgen. Hierfür erscheint die neu etablierte, gut differenzierte Zelllinie NT-3 mit erhaltener Expression von SSTR2 vielversprechend (Benten et al. 2018). In Zelllinien aus Pankreaskarzinomen konnte durch Gabe von hochdosiertem 5-Azacytidin eine verstärkte Transkription von SSTR 2, 4 und 5 sowie von SST selbst gezeigt werden (Gailhouse et al. 2018).

5.4 Allgemeine Bewertung und Limitationen

Im Gesamtbild konnte eine starke Einschränkung der Proliferation sowie die Induktion von Apoptose in BON-1 und QGP-1 Zellen bei Exposition mit Panobinostat in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Eine wichtige Limitation dieser Arbeit sind die Unterschiede in der Tumorbilogie zwischen den etablierten *in-vitro* Zellmodellen BON-1 und QGP-1, welche eine hohe Proliferationskapazität im Bereich von G3 NEN haben, und den in klinischen Situationen häufig gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas mit niedrigen Proliferationsraten. Die Zelllinien stammen aus einem Primärtumor und einer Lymphknotenmetastase und wurden aus pNETs bzw. deren Metastasen isoliert. Zu beachten ist jedoch, dass in den Zelllinien Mutationen vorliegen, die in pNETs normalerweise nicht auftreten. Hier sind vor allem die Mutationen in *TP53*, *RBI* und *KRAS* bzw. *NRAS* und die wesentlich höheren Wachstumsraten der Zelllinien zu nennen (Vandamme et al. 2015; Scarpa et al. 2017). Aus diesem Grund ist eine Überprüfung der Ergebnisse an neuer generierten, gut differenzierten Zelllinien, wie z.B. NT-3 und NT-18LM (Benten et al. 2018; Viol et al. 2022; Luley et al. 2020), sowie im Verlauf in *in-vivo*-Modellen empfehlenswert. Diese Übertragungen auf weitere Zelllinien wurden in der Arbeitsgruppe in der Folge bereits durchgeführt (Schmitz et al. 2021). Auch in diesen Modellen sind jedoch bei Monokulturen Einflüsse durch Immunzellen und Tumorstroma nicht darstellbar. Das RIP1Tag2-

Mausmodell, in dem durch Kombination des *rat insulin II*-Gens mit dem viralen Onkogen *large-T-antigen* Tumoren in β -Zellen entstehen, führt zur Bildung von meist mehreren Insulinomen, aber auch von schlecht differenzierten NET (Hanahan 1985; Hunter et al. 2013). Andere Arten von NET, insbesondere nicht funktionale, gut differenzierte NET, die häufiger erst in fortgeschrittenen Stadien auffallen, können auch mit diesem Modell nur eingeschränkt untersucht werden. Ein Mechanismus der Tumorentstehung ist hierbei die Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 und Rb (Hunter et al. 2013).

Bei Anwendung am Menschen zeigten sich gemäß eines Reviews der Pharmakokinetik aus verfügbaren klinischen Phase I und II Studien bei einer oralen Therapie mit 20 mg Panobinostat Plasmaspiegel von 21,6 ng/mL (van Veggel et al. 2018), was umgerechnet etwa 60 nM entspricht. In einer klinischen Phase II Studie mit Panobinostat zeigten sich bei einer höheren Dosierung von 40 mg dreimal pro Woche ausgeprägte Nebenwirkungen, was eine Dosisreduktion auf 20 mg dreimal pro Woche zur Folge hatte (Cassier et al. 2013). Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen sind somit auch *in vivo* mit akzeptablen Nebenwirkungen erreichbar. Es wurde bisher eine Phase II Studie mit einer oralen Monotherapie mit Panobinostat mit 13 Probanden mit gut differenzierten NETs durchgeführt, in der in einer Interimsanalyse bei allen Patienten eine stabile Erkrankung festgestellt wurde (Jin et al. 2016). Da als Kriterium für eine weitere Patientenrekrutierung eine Remission festgelegt wurde, wurde die Studie vorzeitig beendet.

Es zeigen sich jedoch auch mehrere mögliche Ansätze für Kombinationstherapien.

Aufgrund der Bedeutung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges in der Tumorentstehung als auch bei der etablierten Therapie wurde dieser auf Proteinebene betrachtet. Trotz der guten initialen Wirksamkeit des mTOR-Inhibitors Everolimus ist in einigen Fällen eine Resistenzentwicklung der therapielimitierende Faktor. In dieser Untersuchung zeigten sich in der Zelllinie BON-1 keine relevanten Wirkungen auf diesen Signalweg. Dennoch erscheint eine Kombinationstherapie weiter als mögliche Option, ein Hinweis auf einen synergistischen Effekt mit mTOR-Inhibitoren lässt sich aus dieser Arbeit jedoch nicht ableiten. In der Kombinationstherapie zeigte sich in klinischen Studien (Phase I und II) bei anderen Tumorentitäten eine deutliche Toxizität bei einer täglichen Gabe von 10 mg Everolimus und 20 mg Panobinostat dreimal pro Woche (Islam et al. 2021; Oki et al. 2013), sodass die Anwendung dieser Kombination bei pNET nur bei ausreichender Wirkung bei niedrigeren Dosierungen sinnvoll erscheint.

Eine mögliche synergistische Wirkung mit einer PRRT durch eine verstärkte Expression der Somatostatinrezeptoren – insbesondere SSTR2 – wurde bereits in anderen Arbeiten untersucht (Klomp et al. 2021a). Die in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR unterstützt diese Ergebnisse.

Ein weiterer therapeutischer Aspekt ist eine Kombinationstherapie mit Immuntherapien. Obwohl klassische Immuntherapien bei pNETs *in-vitro* und *in-vivo* bisher nur geringe Ansprechraten

gezeigt haben (Garcia-Alvarez et al. 2022), könnte eine Kombination mit epigenetischen Modulatoren das Ansprechen verbessern. In Mausmodellen mit Pankreaskarzinomen konnte ein synergistischer Effekt von Panobinostat und T-Zelltherapien nachgewiesen werden (Ali et al. 2021). Da zelluläre Marker für ein Ansprechen der Immuntherapien in pNET bisher nicht sicher bekannt sind und die Zelllinien als Monokultur kultiviert wurden, ist für die Untersuchung einer entsprechenden Kombinationstherapie ein *in-vivo* Modell erforderlich.

6 Literaturverzeichnis

Literatur

(2019) WHO classification of tumours; Digestive system tumours. World Health Organization (WHO), Lyon

Alexander VM, Roy M, Steffens KA, Kunnimalaiyaan M, Chen H (2010) Azacytidine induces cell cycle arrest and suppression of neuroendocrine markers in carcinoids. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 3:95–102

Ali AI, Wang M, Scheidt B von, Dominguez PM, Harrison AJ, Tantalo DGM, Kang J, Oliver AJ, Chan JD, Du X, Bai Y, Lee B, Johnstone RW, Darcy PK, Kershaw MH, Slaney CY (2021) A Histone Deacetylase Inhibitor, Panobinostat, Enhances Chimeric Antigen Receptor T-cell Antitumor Effect Against Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 27:6222–6234. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-1141

Alvarez MJ, Subramaniam PS, Tang LH et al (2018) A precision oncology approach to the pharmacological targeting of mechanistic dependencies in neuroendocrine tumors. *Nature Genetics* 50:979–989. doi:10.1038/s41588-018-0138-4

Araki K, Shimura T, Suzuki H, Tsutsumi S, Wada W, Yajima T, Kobayahi T, Kubo N, Kuwano H (2011) E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *British Journal of Cancer* 105:1885–1893. doi:10.1038/bjc.2011.452

Arvidsson Y, Johanson V, Pfragner R, Wängberg B, Nilsson O (2016) Cytotoxic Effects of Valproic Acid on Neuroendocrine Tumour Cells. *Neuroendocrinology* 103:578–591. doi:10.1159/000441849

Bates SE (2020) Epigenetic Therapies for Cancer. *The New England journal of medicine* 383:650–663. doi:10.1056/NEJMr1805035

Begum N, Maasberg S, Plöckinger U, Anlauf M, Rinke A, Pöpperl G, Lehnert H, Izbicki JR, Krausch M, Vashist YK, Raffel A, Bürk CG, Hoffmann J, Goretzki P, Pape UF (2014) Neuroendokrine Tumoren des Verdauungstrakts - Daten des deutschen NET-Registers. *Zentralblatt für Chirurgie - Zeitschrift für Allgemeine, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie* 139:276–283. doi:10.1055/s-0032-1315199

Benten D, Behrang Y, Unrau L, Weissmann V, Wolters-Eisfeld G, Burdak-Rothkamm S, Stahl FR, Anlauf M, Grabowski P, Möbs M, Dieckhoff J, Sipos B, Fahl M, Eggers C, Perez D, Bockhorn M, Izbicki JR, Lohse AW, Schrader J (2018) Establishment of the First Well-

differentiated Human Pancreatic Neuroendocrine Tumor Model. *Molecular Cancer Research* 16:496–507. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0163

Beyens M, Vandamme T, Peeters M, van Camp G, Beeck K op de (2019) Resistance to targeted treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrine-related cancer* 26:R109–R130. doi:10.1530/ERC-18-0420

Bose P, Dai Y, Grant S (2014) Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. *Pharmacology & Therapeutics* 143:323–336. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.04.004

Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP (2008) Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 118:3065–3074. doi:10.1172/JCI34739

Cassier PA, Lefranc A, Amela EY, Chevreau C, Bui BN, Lecesne A, Ray-Coquard I, Chabaud S, Penel N, Berge Y, Dômont J, Italiano A, Duffaud F, Cadore A-C, Polivka V, Blay J-Y (2013) A phase II trial of panobinostat in patients with advanced pretreated soft tissue sarcoma. A study from the French Sarcoma Group. *British Journal of Cancer* 109:909–914. doi:10.1038/bjc.2013.442

Celgene Europe B.V. (Hrsg) (2009) Vidaza | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vidaza>. Zugegriffen: 12. Februar 2021

Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M (2010) Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010. doi:10.1155/2010/479364

Chen C-H, Wang W-J, Kuo J-C, Tsai H-C, Lin J-R, Chang Z-F, Chen R-H (2005) Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *The EMBO Journal* 24:294–304. doi:10.1038/sj.emboj.7600510

Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, Han J, Wei X (2019) Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 4:62. doi:10.1038/s41392-019-0095-0

Christman JK (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21:5483–5495. doi:10.1038/sj.onc.1205699

Clewemar Antonodimitrakis P, Sundin A, Wassberg C, Granberg D, Skogseid B, Eriksson B (2016) Streptozocin and 5-Fluorouracil for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine

Tumors: Efficacy, Prognostic Factors and Toxicity. *Neuroendocrinology* 103:345–353.
doi:10.1159/000439086

Dias JNR, Aguiar SI, Pereira DM, André AS, Gano L, Correia JDG, Carrapiço B, Rütgen B, Malhó R, Peleteiro C, Goncalves J, Rodrigues CMP, Gil S, Tavares L, Aires-da-Silva F (2018) The histone deacetylase inhibitor panobinostat is a potent antitumor agent in canine diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 9:28586–28598. doi:10.18632/oncotarget.25580

Dilling MB, Germain GS, Dudkin L, Jayaraman AL, Zhang X, Harwood FC, Houghton PJ (2002) 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. *Journal of Biological Chemistry* 277:13907–13917. doi:10.1074/jbc.M110782200

Dilz L-M, Denecke T, Steffen IG, Prasad V, Weikersthal LF von, Pape U-F, Wiedenmann B, Pavel M (2015) Streptozocin/5-fluorouracil chemotherapy is associated with durable response in patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumours. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990) 51:1253–1262. doi:10.1016/j.ejca.2015.04.005

Duchmann M, Itzykson R (2019) Clinical update on hypomethylating agents. *International Journal of Hematology* 110:161–169. doi:10.1007/s12185-019-02651-9

Dyer MA, Qadeer ZA, Valle-Garcia D, Bernstein E (2017) ATRX and DAXX: Mechanisms and Mutations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7:a026567.
doi:10.1101/cshperspect.a026567

Exner S, Prasad V, Wiedenmann B, Grötzinger C (2018) Octreotide Does Not Inhibit Proliferation in Five Neuroendocrine Tumor Cell Lines. *Frontiers in Endocrinology* 9.
doi:10.3389/fendo.2018.00146

Gailhouse L, Liew LC, Hatada I, Nakagama H, Ochiya T (2018) Epigenetic reprogramming using 5-azacytidine promotes an anti-cancer response in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cell Death & Disease* 9:468. doi:10.1038/s41419-018-0487-z

Garcia-Alvarez A, Cubero JH, Capdevila J (2022) What Is the Status of Immunotherapy in Neuroendocrine Neoplasms? *Current Oncology Reports* 24:451–461. doi:10.1007/s11912-022-01235-x

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* 31:13–20. doi:10.1002/ijc.2910310104

Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA (2007) A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clinical cancer research : an official*

journal of the American Association for Cancer Research 13:7003–7011. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1263

Guenther R, Aweda T, Carmona Matos DM, Jang S, Whitt J, Cheng Y-Q, Liu XM, Chen H, Lapi SE, Jaskula-Sztul R (2020) Overexpression of somatostatin receptor type 2 in neuroendocrine tumors for improved Ga68-DOTATATE imaging and treatment. *Surgery* 167:189–196. doi:10.1016/j.surg.2019.05.092

Hanahan D (1985) Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315:115–122. doi:10.1038/315115a0

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K (2004) Cadherin switch in tumor progression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014:155–163. doi:10.1196/annals.1294.016

Hervouet E, Cheray M, Vallette FM, Cartron P-F (2013) DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. *Cells* 2:545–573. doi:10.3390/cells2030545

Hunter KE, Quick ML, Sadanandam A, Hanahan D, Joyce JA (2013) Identification and characterization of poorly differentiated invasive carcinomas in a mouse model of pancreatic neuroendocrine tumorigenesis. *PLOS ONE* 8:e64472. doi:10.1371/journal.pone.0064472

Islam P, Rizzieri D, Lin C, Castro C de, Diehl L, Li Z, Moore J, Morris T, Beaven A (2021) Phase II Study of Single-Agent and Combination Everolimus and Panobinostat in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer Investigation* 39:871–879. doi:10.1080/07357907.2021.1983584

Jiao Y, Shi C, Edil BH, Wilde RF de, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N (2011) DAXX/ATRAX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 331:1199–1203. doi:10.1126/science.1200609

Jin N, Lubner SJ, Mulkerin DL, Rajguru S, Carmichael L, Chen H, Holen KD, LoConte NK (2016) A Phase II Trial of a Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat in Patients With Low-Grade Neuroendocrine Tumors. *The Oncologist* 21:785–786. doi:10.1634/theoncologist.2016-0060

Kaku M, Nishiyama T, Yagawa K, Abe M (1980) Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. *Gan* 71:596–601

- Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H (1986) DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44:535–543. doi:10.1016/0092-8674(86)90263-1
- Khan O, La Thangue NB (2012) HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and Cell Biology* 90:85–94. doi:10.1038/icb.2011.100
- Klieser E, Urbas R, Stättner S, Primavesi F, Jäger T, Dinnewitzer A, Mayr C, Kiesslich T, Holzmann K, Di Fazio P, Neureiter D, Swierczynski S (2017) Comprehensive immunohistochemical analysis of histone deacetylases in pancreatic neuroendocrine tumors: HDAC5 as a predictor of poor clinical outcome. *Human Pathology* 65:41–52. doi:10.1016/j.humpath.2017.02.009
- Klomp MJ, Dalm SU, van Koetsveld PM, Dogan F, Jong M de, Hofland LJ (2021a) Comparing the Effect of Multiple Histone Deacetylase Inhibitors on SSTR2 Expression and ¹¹¹In-DOTATATE Uptake in NET Cells. *Cancers* 13:4905. doi:10.3390/cancers13194905
- Klomp MJ, Dalm SU, Jong M de, Feelders RA, Hofland J, Hofland LJ (2021b) Epigenetic regulation of somatostatin and somatostatin receptors in neuroendocrine tumors and other types of cancer. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 22:495–510. doi:10.1007/s11154-020-09607-z
- Krug S, Boch M, Daniel H, Nimphius W, Müller D, Michl P, Rinke A, Gress TM (2015) Streptozocin-Based Chemotherapy in Patients with Advanced Neuroendocrine Neoplasms--Predictive and Prognostic Markers for Treatment Stratification. *PLOS ONE* 10:e0143822. doi:10.1371/journal.pone.0143822
- Kunz PL, Graham NT, Catalano PJ, Nimeiri HS, Fisher GA, Longacre TA, Suarez CJ, Martin BA, Yao JC, Kulke MH, Hendifar AE, Shanks JC, Shah MH, Zalupski MM, Schmulbach EL, Reidy-Lagunes DL, Strosberg JR, O'Dwyer PJ, Benson AB (2023) Randomized Study of Temozolomide or Temozolomide and Capecitabine in Patients With Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors (ECOG-ACRIN E2211). *Journal of Clinical Oncology* 41:1359–1369. doi:10.1200/JCO.22.01013
- Li X-N, Shu Q, Su JM-F, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC (2005) Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Molecular Cancer Therapeutics* 4:1912–1922. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0184
- Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707–719. doi:10.1016/j.cell.2007.01.015
- Li CC, Xu B, Hirokawa M, Qian Z, Yoshimoto K, Horiguchi H, Tashiro T, Sano T (2002) Alterations of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin expression in neuroendocrine tumors

of the gastrointestinal tract. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 440:145–154. doi:10.1007/s004280100529

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Livingston S, Carlton C, Sharma M, Kearns D, Baybutt R, Vanden Heuvel GB (2019) Cux1 regulation of the cyclin kinase inhibitor p27kip1 in polycystic kidney disease is attenuated by HDAC inhibitors. *Gene* 721:100007. doi:10.1016/j.gene.2019.100007

Luley KB, Biedermann SB, Künstner A, Busch H, Franzenburg S, Schrader J, Grabowski P, Wellner UF, Keck T, Brabant G, Schmid SM, Lehnert H, Ungefroren H (2020) A Comprehensive Molecular Characterization of the Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cell Lines BON-1 and QGP-1. *Cancers* 12:691. doi:10.3390/cancers12030691

Marini F, Giusti F, Tonelli F, Brandi ML (2021) Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *International Journal of Molecular Sciences* 22:4041. doi:10.3390/ijms22084041

Matkar S, Thiel A, Hua X (2013) Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 38:394–402. doi:10.1016/j.tibs.2013.05.005

Matrood S, Prisco N de, Wissniowski TT, Wiese D, Jabari S, Griesmann H, Wanzel M, Stiewe T, Neureiter D, Klieser E, Mintziras I, Buchholz M, Bartsch DK, Gennarino VA, Di Fazio P (2021) Modulation of Pancreatic Neuroendocrine Neoplastic Cell Fate by Autophagy-Mediated Death. *Neuroendocrinology* 111:965–985. doi:10.1159/000512567

Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, Della Peruta M, Piemonti L, Capurso G, Di Florio A, delle Fave G, Pederzoli P, Croce CM, Scarpa A (2010) Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *Journal of Clinical Oncology*:245–255. doi:10.1200/JCO.2008.21.5988

Mohammad HP, Barbash O, Creasy CL (2019) Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer. *Nature Medicine* 25:403–418. doi:10.1038/s41591-019-0376-8

Moore LD, Le T, Fan G (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38:23–38. doi:10.1038/npp.2012.112

Morel D, Jeffery D, Aspeslagh S, Almouzni G, Postel-Vinay S (2020) Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise. *Nature reviews. Clinical oncology* 17:91–107. doi:10.1038/s41571-019-0267-4

- Moreno A, Akcakanat A, Munsell MF, Soni A, Yao JC, Meric-Bernstam F (2008) Antitumor activity of rapamycin and octreotide as single agents or in combination in neuroendocrine tumors. *Endocrine-related cancer* 15:257–266. doi:10.1677/ERC-07-0202
- Mosleh M, Safaroghli-Azar A, Bashash D (2020) Pan-HDAC inhibitor panobinostat, as a single agent or in combination with PI3K inhibitor, induces apoptosis in APL cells: An emerging approach to overcome MSC-induced resistance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 122:105734. doi:10.1016/j.biocel.2020.105734
- Na T-Y, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM (2020) The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117:5931–5937. doi:10.1073/pnas.1918167117
- Naryzhny SN (2008) Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65:3789–3808. doi:10.1007/s00018-008-8305-x
- Oki Y, Buglio D, Fanale M, Fayad L, Copeland A, Romaguera J, Kwak LW, Pro B, Castro Faria S de, Neelapu S, Fowler N, Hagemeister F, Zhang J, Zhou S, Feng L, Younes A (2013) Phase I study of panobinostat plus everolimus in patients with relapsed or refractory lymphoma. *Clinical Cancer Research* 19:6882–6890. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1906
- Ouaïssi M, Silvy F, Costa Lima S, Giger U, Zemmour K, Sastre B, Sielezneff I, Cordeiro-da-Silva A, Lombardo D, Mas E, Ouaïssi A (2012) HDAC gene expression in pancreatic tumor cell lines following treatment with the HDAC inhibitors panobinostat (LBH589) and trichostatine (TSA). *Pancreatology* 12:146–155. doi:10.1016/j.pan.2012.02.013
- Perren A, Couvelard A, Scoazec J-Y, Costa F, Borbath I, delle Fave G, Gorbounova V, Gross D, Grossma A, Jense RT, Kulke M, Oeberg K, Rindi G, Sorbye H, Welin S (2017) ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Pathology: Diagnosis and Prognostic Stratification. *Neuroendocrinology* 105:196–200. doi:10.1159/000457956
- Pfister SX, Ashworth A (2017) Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 16:241–263. doi:10.1038/nrd.2016.256
- Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN (2015) Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *Journal of Immunological Methods* 423:99–103. doi:10.1016/j.jim.2015.04.025
- Qin G, Li Y, Xu X, Wang X, Zhang K, Tang Y, Qiu H, Shi D, Zhang C, Long Q, Lee K, Zhai Q, Wang S, Chen M, Deng W (2019) Panobinostat (LBH589) inhibits Wnt/ β -catenin signaling

pathway via upregulating APCL expression in breast cancer. *Cellular Signalling* 59:62–75. doi:10.1016/j.cellsig.2019.03.014

Rinke A, Wiedenmann B, Auernhammer C, Bartenstein P, Bartsch DK, Begum N, Faiss S, Fottner C, Gebauer B, Goretzki P, Lynen Jansen P, Pöpperl G, Scherübl H, Weber MM, Gress TM, Pavel M (2018) S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 56:583–681. doi:10.1055/a-0604-2924

Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18. doi:10.1186/s12859-017-1934-z

Santoni M, Pantano F, Amantini C, Nabissi M, Conti A, Burattini L, Zoccoli A, Berardi R, Santoni G, Tonini G, Santini D, Cascinu S (2014) Emerging strategies to overcome the resistance to current mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Biochimica et biophysica acta* 1845:221–231. doi:10.1016/j.bbcan.2014.01.007

Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168:960–976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004

Scarpa A, Chang DK, Nones K et al (2017) Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature* 543:65–71. doi:10.1038/nature21063

Schmitz RL, Weissbach J, Kleilein J, Bell J, Hüttelmaier S, Viol F, Clauditz T, Grabowski P, Laumen H, Rosendahl J, Michl P, Schrader J, Krug S (2021) Targeting HDACs in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Models. *Cells* 10:1408. doi:10.3390/cells10061408

Secura Bio Limited (Hrsg) (2015) Farydak : EPAR - Product Information. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/farydak-epar-product-information_en.pdf. Zugegriffen: 11. Februar 2021

Shao W, Gowney JD, Feng Y, O'Connor G, Pu M, Zhu W, Yao Y-M, Kwon P, Fawell S, Atadja P (2010) Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: Defining molecular mechanisms of resistance. *International Journal of Cancer* 127:2199–2208. doi:10.1002/ijc.25218

Shi J, Vakoc CR (2014) The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition. *Molecular Cell* 54:728–736. doi:10.1016/j.molcel.2014.05.016

Singh P, Ravanan P, Talwar P (2016) Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): A Regulator of Apoptosis and Autophagy. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9:46. doi:10.3389/fnmol.2016.00046

- Stresemann C, Lyko F (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer* 123:8–13. doi:10.1002/ijc.23607
- Taelman VF, Radojewski P, Marincek N, Ben-Shlomo A, Grotzky A, Olariu CI, Perren A, Stettler C, Krause T, Meier LP, Cescato R, Walter MA (2016) Upregulation of Key Molecules for Targeted Imaging and Therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 57:1805–1810. doi:10.2967/jnumed.115.165092
- Terracciano F, Capone A, Montori A, Rinzivillo M, Partelli S, Panzuto F, Pillozzi E, Arcidiacono PG, Sette C, Capurso G (2021) MYC Upregulation Confers Resistance to Everolimus and Establishes Vulnerability to Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cells. *Neuroendocrinology* 111:739–751. doi:10.1159/000509865
- Townsend CM, Ishizuka J, Thompson JC (1993) Studies of growth regulation in a neuroendocrine cell line. *Acta Oncologica* 32:125–130. doi:10.3109/02841869309083900
- Tsai H-C, Li H, van Neste L, Cai Y, Robert C, Rassool FV, Shin JJ, Harbom KM, Beaty R, Pappou E, Harris J, Yen R-WC, Ahuja N, Brock MV, Stearns V, Feller-Kopman D, Yarmus LB, Lin Y-C, Welm AL, Issa J-P, Minn I, Matsui W, Jang Y-Y, Sharkis SJ, Baylin SB, Zahnow CA (2012) Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* 21:430–446. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.029
- Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Molecular and cellular biology* 18:4629–4638. doi:10.1128/MCB.18.8.4629
- Vallo S, Mani J, Stastny M, Makarević J, Juengel E, Tsaour I, Bartsch G, Haferkamp A, Blaheta RA (2013) The prostate cancer blocking potential of the histone deacetylase inhibitor LBH589 is not enhanced by the multi receptor tyrosine kinase inhibitor TKI258. *Investigational New Drugs* 31:265–272. doi:10.1007/s10637-012-9851-5
- van Veggel M, Westerman E, Hamberg P (2018) Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Panobinostat. *Clinical Pharmacokinetics* 57:21–29. doi:10.1007/s40262-017-0565-x
- Vandamme T, Peeters M, Dogan F, Pauwels P, van Assche E, Beyens M, Mortier G, Vandeweyer G, Herder W de, van Camp G, Hofland LJ, Beeck K op de (2015) Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1. *Journal of Molecular Endocrinology* 54:137–147. doi:10.1530/JME-14-0304
- Veenstra MJ, van Koetsveld PM, Dogan F, Farrell WE, Feelders RA, Lamberts SWJ, Herder WW de, Vitale G, Hofland LJ (2018) Epidrug-induced upregulation of functional somatostatin

type 2 receptors in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Oncotarget* 9:14791–14802. doi:10.18632/oncotarget.9462

Venturelli S, Berger A, Weiland T, Essmann F, Waibel M, Nuebling T, Häcker S, Schenk M, Schulze-Osthoff K, Salih HR, Fulda S, Sipos B, Johnstone RW, Lauer UM, Bitzer M (2013) Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumor cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 12:2226–2236. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0137

Viol F, Sipos B, Fahl M, Clauditz TS, Amin T, Kriegs M, Nieser M, Izbicki JR, Huber S, Lohse AW, Schrader J (2022) Novel preclinical gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia models demonstrate the feasibility of mutation-based targeted therapy. *Cellular Oncology* 45:1401–1419. doi:10.1007/s13402-022-00727-z

Wanek J, Gaisberger M, Beyreis M, Mayr C, Helm K, Primavesi F, Jäger T, Di Fazio P, Jakab M, Wagner A, Neureiter D, Kiesslich T (2018) Pharmacological Inhibition of Class IIA HDACs by LMK-235 in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19:3128. doi:10.3390/ijms19103128

Wasim L, Chopra M (2016) Panobinostat induces apoptosis via production of reactive oxygen species and synergizes with topoisomerase inhibitors in cervical cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 84:1393–1405. doi:10.1016/j.biopha.2016.10.057

Woods DM, Woan K, Cheng F, Wang H, Perez-Villarroel P, Lee C, Lienlaf M, Atadja P, Seto E, Weber J, Sotomayor EM, Villagra A (2013) The antimelanoma activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) is mediated by direct tumor cytotoxicity and increased tumor immunogenicity. *Melanoma Research* 23:341–348. doi:10.1097/CMR.0b013e328364c0ed

Zhou B, Xiang J, Jin M, Zheng X, Li G, Yan S (2021) High vimentin expression with E-cadherin expression loss predicts a poor prognosis after resection of grade 1 and 2 pancreatic neuroendocrine tumors. *BMC Cancer* 21:334. doi:10.1186/s12885-021-08062-6

7 Thesen

- Panobinostat führt in-vitro zu Apoptose in neuroendokrinen Tumorzelllinien und ist ein vielversprechendes Agens für die therapeutische Anwendung.
- Synergistische Effekte einer Therapie mit Panobinostat und mTOR-Inhibitoren sind unwahrscheinlich.
- Die bei Anwendung von Valproat in der Therapie neuroendokriner Tumore erforderlichen Wirkspiegel lassen eine relevante und inakzeptable Toxizität erwarten.
- Eine niedrig dosierte Therapie mit 5-Azacytidin wirkt weniger stark auf neuroendokrine Tumore als eine Therapie mit Panobinostat.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift