

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik 4  
des Klinikums der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Neue Ansätze zur zielgerichteten Therapie neuroendokriner Tumore  
des gastroenteropankreatischen Systems**

Habilitationsschrift

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Kathrin Zitzmann

2021



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitende Zusammenfassung .....	5
2. Einleitung .....	6
2.1 Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems.....	6
2.2 Interferone und der Jak-STAT-Signalweg .....	7
2.3 Der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalweg .....	10
2.4 Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg .....	14
2.5 Fragestellung und Zielsetzung .....	15
3. Eigene Arbeiten.....	18
4. Ergebnisse .....	20
4.1 Aktivierung und zielgerichtete Modulation des Jak-STAT-Signalwegs.....	20
4.1.1 IFN- $\lambda$ s zeigen signifikante Antitumor-Wirkung in neuroendokrinen Tumorzellen .....	20
4.1.2 SOCS1 silencing verstärkt die Antitumor-Wirkung von Typ I IFNen durch Apoptoseregulation .....	22
4.2 Inhibierung und zielgerichtete Modulation des PI(3)K-Akt-mTor-Signalwegs.....	24
4.2.1 Die Rolle spezifischer Akt-Isoformen bei Perifosin-vermittelter Akt Inhibition.....	24
4.2.2 Antitumor-Effekte von Metformin in GEP-NET-Zellen <i>in vitro</i> .....	26
4.2.3 Der mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001) induziert antiproliferative Effekte in GEP-NET-Zellen .....	28
4.3 Inhibierung und zielgerichtete Modulation des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs ...	30
4.3.1 Der neue Raf Inhibitor Raf265 zeigt signifikante Antitumor-Wirkung .....	30
4.4 "multi-targeted" Therapieansätze in GEP-NET-Zellen.....	31
4.4.1 Verhinderung von molekularen Escape-Mechanismen innerhalb des PI(3)K-Akt-mTOR / Ras-Raf-MEK-Erk-Netzwerks – Überlegenheit dualer Therapieansätze .....	31
4.4.2 Sensibilisierung gegenüber TRAIL durch Raf265 und NVP-AEW541 .....	33
4.4.3 Blockierung der Hitzeschockprotein (HSP)90 Funktion .....	35
4.4.4 Somatostatin-Dopamin Chimäre.....	37
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	39
6. Literaturverzeichnis .....	42
7. Eigenes Schriftenverzeichnis .....	54
7.1 Originalarbeiten als Erstautor .....	54
7.2 Originalarbeiten als Koautor .....	56

7.3 Übersichtsartikel / Reviews.....	58
8. Danksagung.....	60

## 1. Einleitende Zusammenfassung

Die Behandlungsmöglichkeiten bei neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET) sind derzeit begrenzt. In der vorliegenden kumulativen Habilitationsarbeit wurden drei Signalwege näher untersucht, die für Proliferation, Wachstum und Überleben neuroendokriner Tumorzellen von besonderer Bedeutung sind: der Jak-STAT-Signalweg, der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalweg sowie der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg. Primäres Ziel war es, durch aktivierende oder hemmende Modulation dieser Signalwege Antitumor-Effekte in GEP-NET-Zellen zu erzielen und somit neue Therapiestrategien aufzuzeigen. Durch siRNA-vermittelte Inhibition von SOCS1 konnten Dauer und Stärke des Typ I IFN-induzierten Jak-STAT-Signals erhöht und damit die Antitumor-Wirkung von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  verstärkt werden. Pharmakologische Inhibitionen verschiedener aktivierender Komponenten des PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs wie Akt, mTOR und Raf bewirkten in GEP-NET-Zellen starke Antitumor-Effekte, wobei „multi-targeted“-Ansätze bezüglich ihrer antitumoralen Wirksamkeit „single-targeted“-Ansätzen überlegen waren. Einige der hier vorgestellten Therapieansätze sind bereits im Rahmen klinischer Studien an GEP-NET-Patienten überprüft worden. Herausragend waren dabei die Ergebnisse mit dem mTOR Inhibitor Everolimus, der inzwischen für die Behandlung metastasierter NET des Pankreas, sowie nicht funktioneller NET gastrointestinalen- oder pulmonalen Ursprungs zugelassen ist.

## 2. Einleitung

### 2.1 Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems

Bei neuroendokrinen Tumoren (NET) handelt es sich um eine heterogene Gruppe bösartiger Erkrankungen. NET sind selten. In Deutschland werden ein bis zwei Neuerkrankungen auf 100.000 Menschen pro Jahr diagnostiziert. Etwa ein Viertel der NET entfallen auf das bronchopulmonale System. Weitere zwei Drittel der NET sind im gastroenteropankreatischen System lokalisiert und werden als GEP-NET bezeichnet (Modlin, Lye & Kidd, 2003). Neben der Tumorlokalisation wird nach WHO Klassifikation 2017 zwischen gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren (G1-G3) und gering differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (G3) unterschieden (Lloyd, Osamura, Klöppel & Rosai, 2017). "Neuroendokrin" werden die Tumore genannt, weil sie sich von Zellen ableiten, welche einerseits die funktionellen und morphologischen Charakteristika von endokrinem Gewebe zeigen, gleichzeitig aber Proteine exprimieren, die sonst nur in Nervenzellen vorkommen (z.B. Chromogranin A, Synaptophysin und Neuron-spezifische Enolase). Knapp die Hälfte aller NET verursacht hormonelle Hypersekretionssyndrome mit typischer Symptomatik - diese Gruppe wird als "funktionell aktiv" bezeichnet (Begum, Maasberg & Pape, 2017). Die restlichen NET sind funktionell inaktiv. Sie präsentieren sich mit einer unspezifischen Symptomatik und bleiben oft über Jahre unerkannt. Klinisch werden sie häufig erst durch lokale Tumorausbreitung oder hepatische Metastasen manifest.

Eine vollständige operative Entfernung des NET stellt die bislang einzige potentiell kurative Therapie dar. Die palliative Therapie bei inoperablen NET umfasst lokalablativ Maßnahmen zur Reduktion der Tumormasse bei ausschließlicher Lebermetastasierung sowie die peptidrezeptorvermittelte Radiotherapie (PRRT) bei Tumoren, die Somatostatinrezeptoren exprimieren. In der medikamentösen Therapie metastasierter GEP-NET kommen, - je nach Primärlokalisation, - konventionelle Chemotherapeutika, Somatostatinanaloga und Interferon- $\alpha$  ("Biotherapien") sowie der Multi-Tyrosin-Kinase Inhibitor Sunitinib und der mTOR Inhibitor Everolimus zum Einsatz (Auernhammer, 2018; Aristizabal Prada, 2018; Auernhammer, 2019).

## 2.2 Interferone und der Jak-STAT-Signalweg

Interferone (IFNe) sind eine große Familie von Zytokinen, deren antivirale Eigenschaften 1957 erstmals beschrieben wurden (Isaacs & Lindenmann, 1957). In den darauffolgenden Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass sie zusätzlich antitumorale und immunmodulatorische Wirkung haben (Stark & Darnell, 2012). IFNe werden als körpereigene Gewebshormone vor allem von Leukozyten und Fibroblasten gebildet. Anhand verschiedener Eigenschaften wie Rezeptorspezifität, Aminosäuresequenzhomologie und Genlocus werden sie aktuell in 3 Hauptgruppen eingeteilt: Typ I IFNe (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\epsilon$  und  $\kappa$ ), Typ II IFNe (IFN- $\gamma$ ) und Typ III IFNe (IFN- $\lambda$ s: IL-28A, IL-28B und IL-29) (Fish, 2014; Sheppard, 2003). Therapeutische Bedeutung haben bislang IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ . IFN- $\alpha$  wird neben seiner Anwendung in der Therapie chronischer Hepatitis B und C Infektionen, bei zahlreichen Tumorerkrankungen, so auch bei NET eingesetzt. Das symptomatische Ansprechen von NET auf eine Therapie mit IFN- $\alpha$  ist vergleichbar mit dem der Somatostatinanaloga, es liegt bei etwa 60% (Uri & Grozinsky-Glasberg, 2018). In einer Reihe unkontrollierter Studien wurden im Durchschnitt eine Stabilisierung des Tumorleidens in 40-50% sowie eine partielle Tumorremission in 11% der Fälle beschrieben (Pavel, 2012). Da das Nebenwirkungsprofil im Vergleich zu Somatostatinanaloga deutlich ungünstiger ist, gilt IFN- $\alpha$  allgemein als Mittel der 2. Wahl.

Die Aminosäuresequenzidentität zwischen IFN- $\alpha$  und Typ III-IFNen beträgt lediglich 15-19%. Dennoch stimulieren Typ I- und Typ III IFNe nahezu identische Genexpressionsmuster. Ihre biologische Wirkung entfalten sie über Bindung an spezifische Rezeptoren und nachfolgende Aktivierung des „Just another kinase“ (Jak)- „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STAT)-Signalwegs (Doyle, 2006; Kotenko, 2003). Der Typ I IFNR besteht aus den Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 und ist ubiquitär exprimiert. Dagegen wird der Typ III IFNR aus den Untereinheiten IL-28R1 und IL-10R2 gebildet, welche keinerlei Homologie zu IFNAR1 oder IFNAR2 aufweisen. Die Expression von IL-28R1 beschränkt sich zudem auf Zellen epithelialen Ursprungs sowie bestimmte Immunzellen (NK cells, pDCs, and DCs; Stanifer, Pervolaraki & Boulant, 2019). Nach Bindung der entsprechenden Liganden erfolgt zunächst eine Dimerisierung der Rezeptor-Untereinheiten. Im Folgenden werden die rezeptorassoziierten

Januskinasen Jak1 und Tyk2 durch Autophosphorylierung aktiviert und phosphorylieren ihrerseits Tyrosinreste an den Rezeptorketten. Diese fungieren als Bindungsstellen für „Src-homology“ 2 (SH2)-Domänen zytoplasmatischer STAT-Proteine, welche im weiteren Verlauf durch Jak1 und Tyk2 tyrosinphosphoryliert werden (Abb. 2). Nach Dissoziation vom Rezeptor bilden sie Homo- oder Heterodimere, welche unmittelbar in den Nukleus wandern und dort die Transkription von Zielgenen aktivieren bzw. unterdrücken. Die Weiterleitung des Typ I- bzw. Typ III-IFN-Signals erfolgt zu einem großen Teil durch STAT1-STAT2-Heterodimere, welche im Kern einen trimolekularen Komplex mit „IFN-regulatory factor“ 9 bilden. Dieser, auch „IFN-stimulated gene factor“ 3 (ISGF3) genannte Komplex, bindet an spezifische DNA-Sequenzen, sog. „IFN-stimulated response elements“ (ISREs; consensus sequence TTCNNGAA). Zusätzlich kommt es durch Typ I und Typ III IFNe zur Bildung anderer STAT-Dimere (hauptsächlich STAT1- und STAT3 Homo- und Heterodimere), welche im Kern an das sog. „Gamma Activated Sequence“ (GAS) Element binden (Platanias, 2005).

Insgesamt wurden bislang ca. 2000 IRGs identifiziert, von denen viele mit den typischen IFN-assoziierten Eigenschaften in Verbindung gebracht werden können (Samarajiwa, Forster, Auchetl & Hertzog, 2009).

Eine unkontrollierte Aktivierung der Jak-STAT-Signalkaskade führt zu chronischer Entzündung und begünstigt die Entstehung von Tumoren. Um die toxischen Wirkungen der Interferone zu begrenzen, sind negative regulatorische Mechanismen auf mehreren Ebenen der Signaltransduktionskaskade notwendig. „Suppressor of Cytokine Signalling“ (SOCS) Proteine gehören zu den wirkungsvollsten Inhibitoren des Jak-STAT-Signalwegs. Die Familie umfasst 8 Mitglieder (SOCS1-7 und CIS). Alle SOCS Proteine besitzen ein konserviertes SOCS-„box“-Motiv am C-Terminus, eine zentrale SH2-Domäne und eine spezifische N-terminale Region variabler Länge. SOCS1 und SOCS3 besitzen zudem eine Kinase-inhibierende Domäne. Typ I IFNe induzieren primär die Expression von SOCS1 und SCOS3, welche auf mehreren Ebenen der Jak-STAT-Kaskade in die Signalweiterleitung eingreifen: Durch Bindung ihrer SH2-Domäne an den phosphorylierten Zytokinrezeptor blockieren sie kompetitiv Bindungsstellen für STATs (1), durch Bindung ihrer Kinase-inhibierenden Domäne an JAKs hemmen sie deren Kinase-Aktivität (2) und schließlich initiieren sie durch Bindung ihrer SOCS-„box“-Domäne an JAKs (3) und Zytokinrezeptoren (4) deren proteasomalen Abbau (Crocker, Kiu & Nicholson, 2008).



Zahlreiche Studien zeigen die Bedeutung von SOCS1 und SOCS3 als negative Feedback-Regulatoren der IFN-stimulierten Jak-STAT-Signalkaskade auf. So bewirkte eine erhöhte SOCS1- und SOCS3 Expression eine Inhibition der IFN-vermittelten antitumoralen und antiviralen Effekte (Vlotides, 2004; Brand, 2005). Zudem konnte eine Korrelation zwischen erhöhter SOCS1- bzw. SOCS3 Expression und einem schlechten Ansprechen auf IFN- $\alpha$  in chronischer myeloischer Leukämie und HCV *in vivo* nachgewiesen werden (Roman-Gomez, 2004; Walsh, 2006).

Aufgrund seiner Bedeutung für die Zytokin-vermittelte Regulation essentieller Zellfunktionen wie Proliferation und Apoptose, birgt der Jak-STAT-Signalweg ein großes therapeutisches Potential für die Behandlung maligner Tumorerkrankungen, einschließlich GEP-NET.

### 2.3 Der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalweg

Der Phosphoinositid-(3)-Kinase (PI(3)K)-Akt-mTOR-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Regulierung essentieller, zellulärer Funktionen wie Zellwachstum, Proliferation, Überleben, Protein-Synthese und Angiogenese.

Die Auslösung der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalkaskade erfolgt in der Regel durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an spezifische Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs). Im Folgenden kommt es zur Aktivierung der Phosphoinositid-(3)-Kinase (PI(3)K), welche die Bildung von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphaten (PIP3) aus Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphaten (PIP2) induziert.

Diese Lipide dienen an der Plasmamembran als Andockstellen für Proteine mit Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen, zu denen auch die Serin/Threoninkinase Akt (PKB) und „Phosphoinositide-dependent kinase“-1 (PDK1) zählen. Sind beide Proteine an PIP3 gekoppelt, kann Akt durch PDK1 am Thr308 phosphoryliert und damit partiell aktiviert werden (Cantley, 2002). Durch Phosphorylierung an Ser473, u. a. durch mTORC2, erhält Akt nachfolgend die volle enzymatische Aktivität (Roux & Topisirovic, 2018).

Gegenspieler von PI(3)K und damit negativer Regulator der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalkaskade ist Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN), indem es PIP3 in seine inaktive Form, PIP2, umwandelt.

Der Kernregulator des PI(3)K-Akt-mTOR-Signalwegs ist Akt, eine Familie eng verwandter Serin/Threonin-Kinasen (Abb. 1).

In Säugetieren existiert Akt in drei Isoformen mit stark variierenden Expressionsmustern. Während Akt1 ubiquitär exprimiert wird, kommt Akt3 hauptsächlich in neuronalem Gewebe vor. Die Expression von Akt2 variiert stark zwischen verschiedenen Organen, wobei hohe Expressionsraten vor allem in insulinsensitiven Geweben (Leber, Muskel, Fettgewebe) zu finden sind (Stambolic, 2006; Mendoza, 2007). Weit über 100 Akt-Substrate sind bislang charakterisiert, darunter viele mit wichtigen Funktionen im Hinblick auf Apoptose, Proliferation und Zellwachstum (Abb. 1). Akt hemmt direkt pro-apoptotische Proteine wie Bad und Bax sowie apoptosefördernde Signale, die von Transkriptionsfaktoren wie den „Forkhead-Box“ (Fox)-Proteinen erzeugt werden. Gleichzeitig erhöht Akt die Transkriptionsrate anti-apoptotischer Gene wie Bcl-2 und Bcl-XL und wirkt antagonistisch zur p53-vermittelten Apoptose, indem es die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase „Mouse double

minute 2 homolog“ (Mdm2) phosphoryliert (Gottlieb, Leal, Seger, Taya & Oren, 2002).

Als wichtiger Regulator der Zellproliferation phosphoryliert und inaktiviert Akt Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3), was die Phosphorylierung und Degradierung von Cyclin D1 verhindert und somit die Zellzyklusprogression vorantreibt. Ebenfalls proliferationsfördernd wirkt die Akt-vermittelte Phosphorylierung der „cyclin-dependent kinase“ (CDK)-Inhibitoren p21CIP1 und p27kip1 (Mundi, Sachdev, McCourt & Kalinsky, 2016).

Über Phosphorylierung und Hemmung des „Tuberous Sclerosis Complex“ (TSC) kommt es zur Aktivierung der kleinen GTPase „Ras-homolog-enriched-in-brain“ (Rheb) welche wiederum „mechanistic target of rapamycin“ (mTOR) aktiviert. Unter allen Akt Substraten kommt dieser Serin/Threonin Kinase eine Schlüsselrolle zu. mTOR ist Bestandteil mindestens zweier Multi-Protein-Komplexe, welche sich sowohl hinsichtlich ihrer Zusammensetzung als auch ihrer „Inputs“ und Zielproteine unterscheiden. So besteht mTORC1 aus den Untereinheiten mTOR, „regulatory-associated protein of mTOR“ (Raptor), „mammalian lethal with SEC13 protein“ 8 (mLST8) sowie den 2 endogenen Inhibitoren des Komplexes, 40kDa „Proline-rich Akt substrate“ (PRAS40) und „DEP domain-containing mTOR-interacting protein“ (DEPTOR) (Peterson, 2009; Kim, 2003; Brown, 2017; Abb. 1). mTORC1 wird als zentrale Schaltstelle der Zelle betrachtet, welche durch Integration von Signalen unterschiedlicher Netzwerke die Protein-Translationsrate den außen vorherrschenden Bedingungen in Bezug auf die Verfügbarkeit von Energie, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren anpasst. Auf diese Weise reguliert mTORC1 wichtige Funktionen wie Zellwachstum, Proliferation und Apoptose.

4EBP1 und p70S6K sind die am besten charakterisierten Substrate von mTORC1. In unphosphoryliertem Zustand bindet und inhibiert 4EBP1 eIF4E, einen wichtigen Faktor für die Initiation cap-abhängiger Translation. p70S6K wird durch die mTORC1- vermittelte Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert daraufhin das ribosomale Protein S6 (rpS6), einen wichtigen Faktor für die Translation von „5' terminal oligopyrimidine tract“ (TOP) mRNAs.

Neben mTORC1 bildet mTOR den mTORC2, bestehend aus mTOR, Rictor, mLST8, mSin1, Protor1/2 und Deptor (Abb. 1). Während mTORC1 durch Rapamycin gehemmt wird, ist mTORC2 weit weniger empfindlich gegenüber Rapamycin und seinen Derivaten (Roux & Topisirovic, 2018). Wie bereits erwähnt, ist eine wichtige

Funktion von mTORC2 die vollständige Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an Ser473.

Regulierungsstörungen des PI(3)K-Akt-mTOR-Signalwegs werden mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht. So wird geschätzt, dass aktivierende Mutationen innerhalb des PI(3)K-Akt-mTOR Signalwegs für bis zu 30% aller Krebserkrankungen beim Menschen verantwortlich sind. Darüber hinaus korrelieren solche Mutationen mit einer schlechten Prognose (Luo, 2003; Sawyers, 2006).

Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten sind Mutationen in Komponenten des PI(3)K-Akt-mTOR-Signalwegs bei GEP-NET eher selten (z. B. PTEN in 7- bzw. 9% der Fälle; Missiaglia, 2010; Jiao, 2011; Han, 2013; Perren, 2000). Trotzdem weist die Mehrheit untersuchter GEP-NET eine konstitutive Aktivierung des PI(3)K-Akt-mTOR-Signalwegs auf (Shah, 2006; Ghayouri 2010). In jüngster Zeit wurden in NET einige epigenetische Modifikationen, darunter die Methylierung des SEMA3F-Gens und der damit einhergehende Verlust von Semaphorin 3 beschrieben. Es gibt Hinweise, dass Semaphorin 3 mTORC2 hemmt und die Herunterregulation seiner Expression eine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber mTOR-Inhibitoren spielt (Nakayama, 2015; Bollard, 2015).

Häufig sind in GEP-NET auch Wachstumsfaktoren und/oder ihre Rezeptoren überexprimiert (Briest & Grabowski, 2014). Von besonderer Bedeutung sind hierbei IGF-I und TGF-alpha, die von neuroendokrinen Tumorzellen vermehrt sezerniert werden. Die hohe Expressionsdichte der entsprechenden Rezeptoren IGF-IR und EGFR legt die Existenz autokriner Mechanismen nahe (Höpfner, 2006; von Wichert, 2000; Krishnamurthy, 1997; Nilsson, 1995). Somit könnte die gezielte Hemmung von aktivierenden Komponenten des PI(3)K-Akt-mTOR-Signalwegs eine erfolgreiche Strategie gegen die Proliferation von GEP-NET sein.

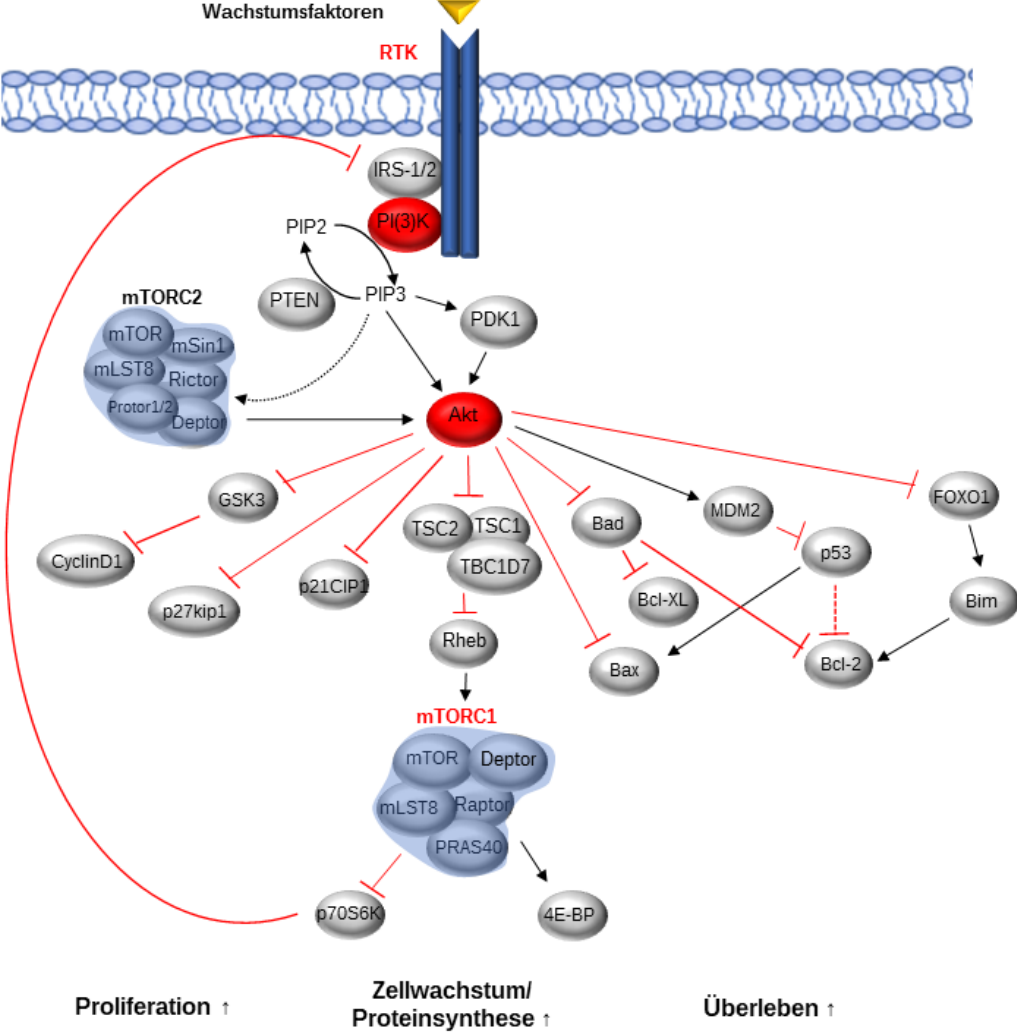


Abbildung 1: Durch koordinierte Phosphorylierung zahlreicher Zielproteine reguliert Akt Proliferation, Zellwachstum/Proteinsynthese und Überleben der Zelle. Modifiziert nach Cantley, 2002; Mundi, 2016; Luo, 2003.

## 2.4 Der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg

Wie der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalweg spielt auch der „Rat sarcoma“ (Ras)-„rapidly accelerated fibrosarcoma“ (Raf)-Mek-„extracellular signal-regulated kinase 1 and 2“ (ERK1/2)-Signalweg eine große Rolle bei der Regulation wesentlicher Zellfunktionen wie Wachstum, Proliferation und Differenzierung.

Auch der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg beginnt in der Regel mit der Aktivierung von RTKs durch Wachstumsfaktoren (Abb. 2). Der aktivierte Rezeptor rekrutiert das Adapter-Protein „Growth factor receptor bound protein“ 2 (Grb2), welches daraufhin den GTP-Austauschfaktor „Son of sevenless“ (SOS) bindet. Die Bildung dieses Komplexes an der Plasmamembran hat die Aktivierung des membranassoziierten G-Proteins Ras zur Folge. Dies wiederum bewirkt, dass Raf-Proteine zur Zellmembran wandern und aktiviert werden. Die Serin/Threonin Kinase Raf kommt bei Säugern in drei Isoformen vor. Dabei ist C-Raf (Raf-1) ubiquitär exprimiert, A-Raf und B-Raf sind gewebespezifisch, mit hohen Konzentrationen in urogenitalem bzw. neuronalem Gewebe (O'Neill & Kolch, 2004). Im weiteren Verlauf wird MEK von A-Raf, B-Raf oder C-Raf an 2 Serinresten phosphoryliert. MEK wiederum phosphoryliert Erk, welches durch direkte und indirekte Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren vor allem die Expression proliferationsfördernder Gene steuert. Fehlregulationen innerhalb der Ras-Raf-MEK-Erk-Übertragung gehen häufig mit ungehindertem Wachstum und Apoptose-Resistenz einher. So wurden in ca. 30% aller Krebserkrankungen beim Menschen aktivierende Punktmutationen der Ras-Gen-Familie gefunden (McCubrey, 2007). Einige Krebsarten wie Melanom, Schilddrüsen- und Eierstockkrebs, weisen B-Raf Mutationen zu einem hohen Prozentsatz auf (30 – 60%; Davies, 2002). In GEP-NET sind aktivierende Mutationen in Komponenten des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs selten (Tannapfel, 2005). Vermutlich sind auch hier autokrine Sekretionsmechanismen von Wachstumsfaktoren dafür verantwortlich, dass die Ras-Raf-MEK-Erk-Kaskade in der Mehrheit der untersuchten GEP-NET konstitutiv aktiviert ist (Shah, 2006; Kidd, 2013). Demnach könnte eine gezielte Hemmung von aktivierenden Komponenten des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs eine erfolgreiche Strategie in der Behandlung von GEP-NET-Erkrankungen darstellen.

## 2.5 Fragestellung und Zielsetzung

Innerhalb des komplexen Netzwerks der intrazellulären Signaltransduktion können der Jak-STAT-, der PI(3)K-Akt-mTOR- und der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg als herausragende Pfade gesehen werden, die allgemein in Tumoren, so auch speziell in GEP-NET, häufig Defekte zeigen. Zentrales Ziel des Habilitationsprojektes war es, durch gezielte Hemmung bzw. Modulation einzelner Komponenten dieser Signalwege, individualisierte Therapiekonzepte für GEP-NET-Erkrankungen anhand geeigneter Zellmodelle zu entwickeln bzw. zu evaluieren. Folgende Ansätze wurden hierbei verfolgt:

### I. Jak-STAT-Signalweg

- Evaluierung des Antitumor-Potentials von Typ III IFNen, welche in ihrer biologischen Wirkung Typ I IFNen ähneln, jedoch aufgrund limitierter Rezeptorexpression weniger Nebenwirkungen erwarten lassen.
- Untersuchung der Wirksamkeit von IFN- $\beta$ , welches in zahlreichen Studien ähnliche, aber stärkere Effekte als IFN- $\alpha$  gezeigt hatte.
- Herunterregulation der SOCS1/SOCS3 Expression, um die Dauer und Stärke der Interferon-Antwort zu erhöhen.

### II. PI(3)K-Akt-mTOR-Signalweg

- Evaluierung des Antitumor-Potentials des Akt Inhibitors Perifosin. Da Perifosin Akt unspezifisch hemmt, sollte weiterführend eine differenzierte Analyse der Effekte Isoform-spezifischer Akt-Inhibition mittels siRNA durchgeführt werden.
- Untersuchung der antitumoralen Effekte von Metformin.
- Untersuchung des Antitumor-Potentials von Everolimus (RAD001), einem effektiven mTORC1 Inhibitor.

### III. Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg

- Evaluierung des Antitumor-Potentials von Raf265, einem effektiven Inhibitor der Raf-Kinase.

Funktionell und biochemisch lassen sich die betrachteten Signalwege nicht vollständig voneinander abgrenzen. Vielmehr gibt es zahlreiche aktivierende und hemmende Querverbindungen (Abb. 2).

Für die Zelle sind derartige Verflechtungen überlebenswichtig, bieten sie doch die Möglichkeit, Störungen innerhalb einzelner Signalwege auszugleichen. Die Krebstherapie mit neuartigen „small-molecule“-Inhibitoren stellt dies jedoch vor neue Herausforderungen, da sich Zellen einem Angriff auf einzelne tumorfördernde Proteine durch kompensatorische Hochregulation nicht-gehemmter Signalwege entziehen können. Die genaue Beobachtung der Therapieantwort auf molekularer Ebene und individuelles Reagieren auf möglicherweise auftretende Kompensationsmechanismen könnten der Schlüssel zum Erfolg einer Therapie von Tumorerkrankungen inklusive NET sein.

Vor diesem Hintergrund sollte im letzten Abschnitt des Habilitationsprojektes versucht werden, durch duale vertikale Hemmung innerhalb der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalkaskade bzw. durch duale horizontale Hemmung der PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade mögliche Ausweichmechanismen der Zelle zu umgehen und die Effektivität der zielgerichteten Therapien zu steigern. Hierzu wurden folgende „dual“- bzw. „multi-targeted“-Ansätze verfolgt:

- Untersuchung der antitumoralen Wirksamkeit einer gleichzeitigen Hemmung von PI(3)K und mTOR.
- Evaluierung des Antitumor-Potentials einer gleichzeitigen Hemmung von PI(3)K/mTOR und Raf.
- Untersuchung der antitumoralen Effekte von NVP-AEW541, einem selektiven IGFIR-Inhibitor.
- Sensibilisierung gegenüber „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) durch Inhibition verschiedener Komponenten des PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs.
- Evaluierung des Antitumor-Potentials der neuartigen Hitzeschockprotein (HSP)90-Inhibitoren AUY922 und HSP990.
- Untersuchung der antitumoralen Wirksamkeit Somatostatin/Dopamin-chimärer Substanzen.



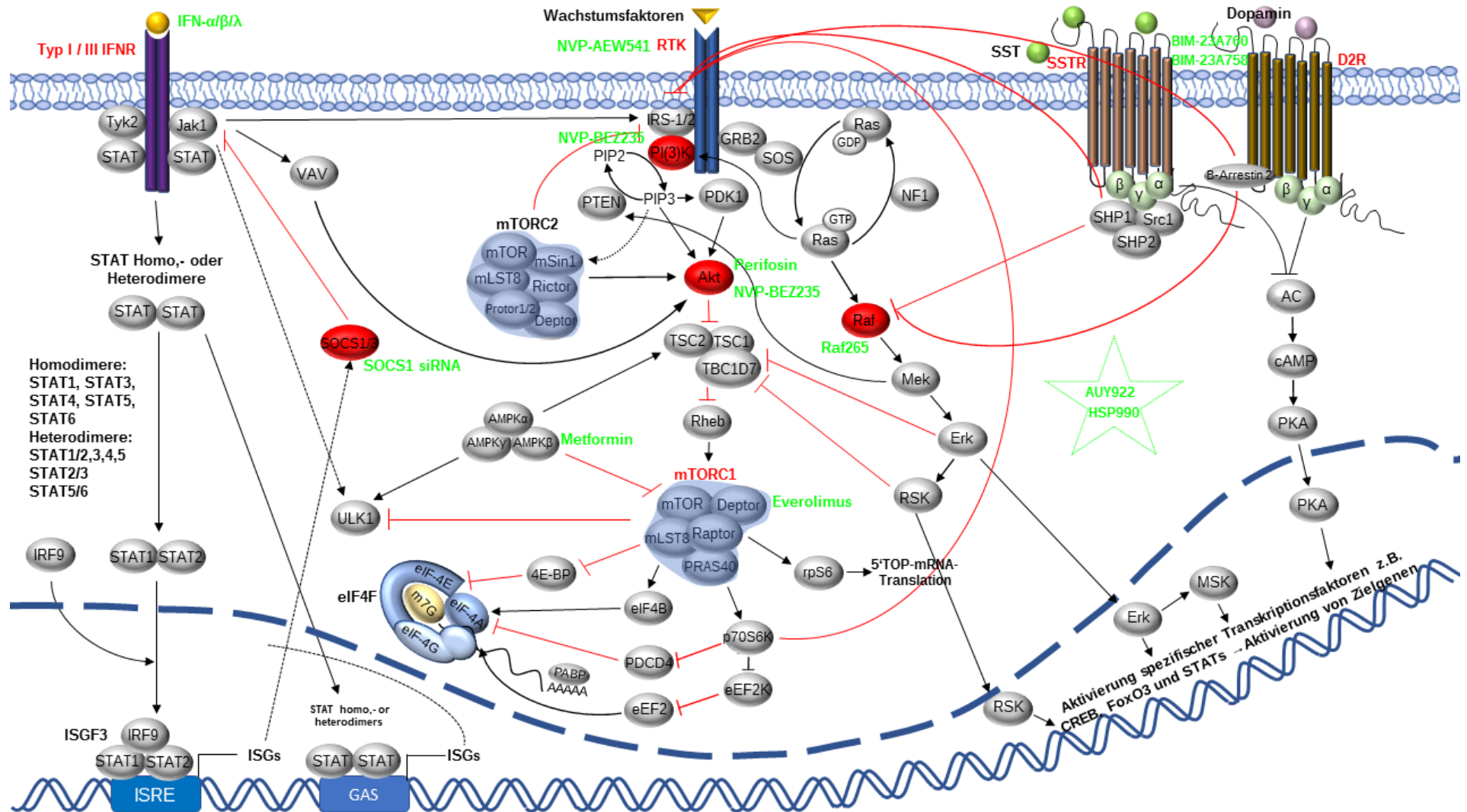


Abbildung 2: Der Jak-STAT-, PI(3)K- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg sind über zahlreiche aktivierende- und hemmende Querverbindungen miteinander vernetzt. Rot markiert sind Proteine, welche zur Evaluierung zielgerichteter Therapieansätze im Rahmen des Habilitationsprojektes aktiviert oder gehemmt wurden. Modifiziert nach Roux, 2018; Hervas-Stubbs, 2011; Zimmermann, 1999; Suire, 2002.

### 3. Eigene Arbeiten

#### Der kumulativen Habilitationsschrift liegen folgende Arbeiten zu Grunde:

- I. **Zitzmann, K.**, Brand, S., Baehs, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H., & Auernhammer, C. J. (2006). Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 344(4), 1334–1341. PMID: 16650825; IF2018/2019: 2.705.
- II. **Zitzmann, K.**, Brand, S., De Toni, E. N., Baehs, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H. H., & Auernhammer, C. J. (2007). SOCS1 silencing enhances antitumor activity of type I IFNs by regulating apoptosis in neuroendocrine tumor cells. *Cancer research*, 67(10), 5025–5032. PMID: 17510435; IF2018/2019: 8.378.
- III. **Zitzmann, K.**, Vlotides, G., Brand, S., Lahm, H., Spöttl, G., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2012). Perifosine-mediated Akt inhibition in neuroendocrine tumor cells: role of specific Akt isoforms. *Endocrine-related cancer*, 19(3), 423–434. PMID: 22499437; IF2018/2019: 4.774.
- IV. Vlotides, G., Tanyeri, A., Spampatti, M., **Zitzmann, K.**, Chourdakis, M., Spöttl, C., Maurer, J., Nölting, S., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2014). Anticancer effects of metformin on neuroendocrine tumor cells in vitro. *Hormones (Athens, Greece)*, 13(4), 498–508. PMID: 25402373; IF2018/2019: 0.78.
- V. **Zitzmann, K.**, De Toni, E. N., Brand, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H. H., & Auernhammer, C. J. (2007). The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology*, 85(1), 54–60. PMID: 17310129; IF2018/2019: 6.804.
- VI. **Zitzmann, K.**, Rüden, J. v., Brand, S., Göke, B., Lichtl, J., Spöttl, G., & Auernhammer, C. J. (2010). Compensatory activation of Akt in response to

- mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer letters*, 295(1), 100–109. PMID: 20356670; IF2018/2019: 6.508.
- VII. **Zitzmann, K.**, de Toni, E., von Räden, J., Brand, S., Göke, B., Laubender, R. P., & Auernhammer, C. J. (2011). The novel Raf inhibitor Raf265 decreases Bcl-2 levels and confers TRAIL-sensitivity to neuroendocrine tumour cells. *Endocrine-related cancer*, 18(2), 277–285. PMID: 21317202; IF2018/2019: 4.774.
- VIII. **Zitzmann, K.**, Ailer, G., Vlotides, G., Spoettl, G., Maurer, J., Göke, B., Beuschlein, F., & Auernhammer, C. J. (2013). Potent antitumor activity of the novel HSP90 inhibitors AUY922 and HSP990 in neuroendocrine carcinoid cells. *International journal of oncology*, 43(6), 1824–1832. PMID: 24100469; IF2018/2019: 3.571.
- IX. **Zitzmann, K.**, Andersen, S., Vlotides, G., Spöttl, G., Zhang, S., Datta, R., Culler, M., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2013). The novel somatostatin receptor 2/dopamine type 2 receptor chimeric compound BIM-23A758 decreases the viability of human GOT1 midgut carcinoid cells. *Neuroendocrinology*, 98(2), 128–136. PMID: 23797089; IF2018/2019: 6.804.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Aktivierung und zielgerichtete Modulation des Jak-STAT-Signalwegs

IFN- $\alpha$  wird in der Biotherapie neuroendokriner Tumore eingesetzt. Die Wirksamkeit von IFN- $\alpha$  ist aufgrund häufig zu beobachtender Interferon-Resistenzen eingeschränkt (Kaltsas, 2004; Plöckinger, 2005). Zudem besitzt IFN- $\alpha$  ein relevantes Nebenwirkungsprofil, welches durch Fieber, Muskelschmerzen, Müdigkeit und Myelosuppression gezeichnet ist.

#### 4.1.1 IFN- $\lambda$ s zeigen signifikante Antitumor-Wirkung in neuroendokrinen Tumorzellen

Bei IFN- $\lambda$  (IL-28A/B und IL-29) handelt es sich um eine 2003 entdeckte Gruppe von Interferonen. Aufgrund limitierter Rezeptorexpression lassen IFN- $\lambda$ s im Vergleich zu IFN- $\alpha$  ein günstigeres Nebenwirkungsspektrum erwarten und könnten, im Falle vergleichbarer Wirksamkeit, IFN- $\alpha$  in der NET-Therapie ersetzen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Effekte von IFN- $\lambda$ s auf neuroendokrine Tumorzellen anhand des gut etablierten humanen pankreatischen NET Zellmodells BON1 zu untersuchen. Zunächst wurde mittels RT-PCR die Expression der beiden IFN- $\lambda$  Rezeptor-Untereinheiten IL-28R1 und IL-10R2 nachgewiesen. Eine Inkubation von BON1 Zellen mit physiologisch erreichbaren IL-28A und IL-29-Konzentrationen (10ng/ml) bewirkte die Phosphorylierung von STAT1, STAT2 und STAT3 sowie eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Durch den Nachweis von PARP- und Caspase-3-Spaltprodukten mittels „Western Blot“ konnte eine IL-28A- und IL-29-vermittelte Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch FACS-Analysen, die einen signifikanten Anstieg der subG1-Phase in IL-28A- und IL-29-behandelten BON1-Zellen zeigten, sowie durch Luciferase-Assays, die einen Anstieg der Promoter-Aktivität des proapoptischen Proteins 2',5'-OAS aufzeigten. Durch stabile Überexpression von SOCS1 und SOCS3 konnten alle beschriebenen Effekte von IL-28A- und IL-29 verhindert werden. Dies beweist, dass SOCS1 und SOCS3 potente negative Regulatoren der IFN- $\lambda$ -induzierten Signalkaskade sind. Insgesamt war die antitumorale Wirkung der IFN- $\lambda$ s, insbesondere die von IL-29, ausgeprägter als bei IFN- $\alpha$ . So könnten langfristig IFN- $\lambda$ s IFN- $\alpha$  in der Biotherapie von GEP-NET ersetzen.

(Zitzmann, K., Brand, S., Baehs, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H., & Auernhammer, C. J. (2006). Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 344(4), 1334–1341.)

### **Entwicklung und aktueller Status**

Pegyliertes IL-29 hat inzwischen mehrere Phase II und III-Studien an Patienten mit chronischer Hepatitis B-, C- und D durchlaufen. Dabei hatte IL-29, im Vergleich zu IFN- $\alpha$ , bei gleicher oder besserer antiviraler Wirkung, deutlich weniger Nebenwirkungen (Muir, 2014; Hamid, 2017; Nelson, 2017; Phillips, 2017). Klinische Studien zur Überprüfung der antitumoralen Wirksamkeit von IFN- $\lambda$  wurden bislang, trotz vielversprechender präklinischer Daten in verschiedenen Tumorentitäten, nicht durchgeführt (Lasfar, Zloza, Silk, Lee & Cohen-Solal, 2019).

#### 4.1.2 SOCS1 silencing verstärkt die Antitumor-Wirkung von Typ I IFNen durch Apoptoseregulation

Neben Typ III IFNen könnte das Typ I-IFN IFN- $\beta$  bei GEP-NET-Erkrankungen ein hohes therapeutisches Potential besitzen. Aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften wird IFN- $\beta$  bislang primär zur Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt. Eine Studie von Vitale *et al.* konnte zeigen, dass IFN- $\beta$  das Zellwachstums von BON1 Zellen hemmt (Vitale, 2006). Im Rahmen dieses Projektes wurden BON1- und zusätzlich CM-Zellen mit IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in steigenden Konzentrationen behandelt. Beide Zytokine bewirkten in beiden Zelllinien eine rasche Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 sowie eine Reduktion der Zellviabilität. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Vitale *et al.* (Vitale, 2006) waren dabei die Effekte von IFN- $\beta$  signifikant stärker. Auf der Suche nach den zugrundeliegenden Mechanismen des Zellviabilitätsverlustes konnte durch den Nachweis von Caspase-8-, Bid- und Caspase-9-Spaltprodukten gezeigt werden, dass IFN- $\beta$  in GEP-NET-Zellen den intrinsischen Apoptose-Signalweg initiiert.

Eine stabile Überexpression von SOCS1 konnte die apoptotischen Effekte beider Typ I IFNe vollständig unterbinden. Umgekehrt hatte die siRNA-vermittelte Herunterregulation von SOCS1 eine massive Verstärkung des Interferon-Signals zur Folge. Dies konnte eindrücklich durch stärkere und länger andauernde STAT-Phosphorylierung sowie durch stärkere Apoptose-Induktion gezeigt werden. Durch die Transfektion von SOCS1 siRNA in GEP-NET-Zellen reduzierte sich die basale Expression von Bcl-2- und Bcl-XL, gleichzeitig war die basale Expression von Bak und Bax erhöht. Dies legt den Verdacht nahe, dass eine verminderte SOCS1 Expression die Auslöseschwelle für Apoptose herabsetzt, indem sie das Verhältnis zwischen antiapoptotischen und proapoptotischen Proteinen reduziert.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit aufzeigen, dass

- I) IFN- $\beta$ , im Vergleich zu IFN- $\alpha$ , ein höheres therapeutisches Potential besitzt.
- II) durch Herunterregulation von SOCS1 ein möglicher Resistenzmechanismus überwunden und das therapeutische Potential beider Typ-I IFNe erheblich gesteigert werden kann.

**(Zitzmann, K., Brand, S., De Toni, E. N., Baehs, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H. H., & Auernhammer, C. J. (2007). SOCS1 silencing enhances**

antitumor activity of type I IFNs by regulating apoptosis in neuroendocrine tumor cells. *Cancer research*, 67(10), 5025–5032.)

### **Entwicklung und aktueller Status**

Obwohl IFN- $\beta$  in vorliegender Studie, wie schon in der Studie von Vitale *et al.* (Vitale, 2006), verglichen mit IFN- $\alpha$ , wesentlich stärkere Antitumor-Effekte in GEP-NET-Zellen hervorrief, wurde seine Wirksamkeit in GEP-NET-Erkrankungen bislang nicht klinisch untersucht.

## **4.2 Inhibierung und zielgerichtete Modulation des PI(3)K-Akt-mTor-Signalwegs**

### 4.2.1 Die Rolle spezifischer Akt-Isoformen bei Perifosin-vermittelter Akt Inhibition

Drei Viertel aller GEP-NET weisen eine konstitutive Akt Phosphorylierung auf (Shah et al., 2006). Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Auswirkungen einer Akt-Blockade auf humane GEP-NET-Zellen heterogenen Ursprungs zu untersuchen. Bronchiale NCI-H727-, intestinale GOT1- und pankreatische BON1 Zellen wurden mit Perifosin, einem pan-Akt-Inhibitor aus der Gruppe der Alkylphospholipide, behandelt. In allen untersuchten Zelllinien bewirkte Perifosin eine Inhibierung der Akt-Phosphorylierung sowie eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Außerdem wurde die Phosphorylierung zahlreicher Akt-Effektor-Proteine wie GSK3 $\alpha/\beta$ , MDM2 und p70S6K verhindert. Dabei hatte Perifosin keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus, induzierte aber Apoptose, wie die Zunahme der subG1-Fraktion, die Spaltung von PARP sowie die Abnahme von Bcl-2 und Bcl-XL zeigte.

Perifosin wirkt als pan-Akt-Inhibitor und erfasst alle 3 vorkommenden Akt-Isoformen. Um eine differenzierte Untersuchung der verschiedenen Akt-Isoformen und deren Bedeutung für die Vitalität neuroendokriner Tumorzellen zu ermöglichen, wurde Isoform-spezifische siRNA eingesetzt.

Die Transfektion von Akt1- bzw. Akt3 siRNA hatte eine massive Reduktion der Zellviabilität sowie des koloniebildenden Potentials zur Folge. Dagegen waren Zellviabilität und koloniebildendes Potential in Akt2 siRNA-transfizierten NET-Zellen stark erhöht. Nur die Herunterregulation von Akt1 bzw. Akt3, nicht aber von Akt2 bewirkte die Dephosphorylierung von GSK3 $\alpha/\beta$ , MDM2, und p70S6K. Im Einklang mit diesen Ergebnissen hatte die gleichzeitige Inhibierung aller drei Akt Isoformen einen signifikant geringeren Antitumor-Effekt als die gleichzeitige, selektive Inhibierung von Akt1 und Akt3. Die Transfektion von Akt3 siRNA löste Apoptose aus, während alle 3 Isoform-spezifischen Akt siRNAs zu einer Verschlechterung der Invasionsfähigkeit führten.

Insgesamt ist die Inhibierung von Akt ein vielversprechendes Therapiekonzept für GEP-NET, welches sich durch den Einsatz selektiver Akt-Inhibitoren, unter Umgehung einer Akt2-Inhibition, optimieren lässt.



(Zitzmann, K., Vlotides, G., Brand, S., Lahm, H., Spöttl, G., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2012). Perifosine-mediated Akt inhibition in neuroendocrine tumor cells: role of specific Akt isoforms. *Endocrine-related cancer*, 19(3), 423–434.)

### **Entwicklung und aktueller Status**

Trotz vielversprechender *in vitro* Ergebnisse, wurde die klinische Entwicklung von Perifosin in GEP-NET bisher nicht weiterverfolgt. Der Akt Inhibitor MK-2206 erzielte in GEP-NET-Zellen *in vitro* vergleichbare Antitumor-Effekte (Somnay, 2013) und wurde im Rahmen zweier klinischer Studien untersucht. In einer klinische Phase 1 Studie zu MK-2206 in Patienten mit soliden Tumoren, hatten 2 Pankreas-NET-Patienten eine geringfügige Tumorantwort (Yap, 2011). Eine klinische Phase 2 Studie, welche acht Patienten mit metastasierten NET einschloss, wurde vorzeitig beendet. Es gab keine komplette oder partielle Remission, jedoch wurde in vier der acht Patienten eine Stabilisierung der Tumorerkrankung für 4.2 – 10.2 Monate erreicht (Reidy, Pietanza, Segal, Capanu & Saltz, 2013). In beiden Studien zeigte MK-2206 eine gute Verträglichkeit.

#### 4.2.2 Antitumor-Effekte von Metformin in GEP-NET-Zellen *in vitro*

Das orale Biguanid Metformin ist eines der wichtigsten Medikamente zur Behandlung von Typ-2-Diabetes. Seine Einnahme wird mit einem reduzierten Krebsrisiko in Verbindung gebracht (Yu, 2019). Metformin wirkt dabei vor allem über die Inhibition von mTORC1. Die Hemmung kann hierbei über AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-abhängige und AMPK-unabhängige Mechanismen erfolgen. Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von Metformin auf GEP-NET-Zellen zu untersuchen. Die Behandlung pankreatischer BON1-, bronchialer NCI-H727-, sowie intestinaler GOT1-Zellen mit steigenden Metformin-Konzentrationen (0.1-10 mM) führte zu einer dosis-abhängigen Reduktion von Zellviabilität und Zellzahl. Metformin induzierte dabei in BON1- und GOT1-Zellen die Phosphorylierung von AMPK, inhibierte sie jedoch in NCI-H727-Zellen. Die Abnahme der Phosphorylierungspiegel von 4EBP1, pP70S6K, und rpS6 unter Metformin in allen 3 untersuchten NET-Zelltypen deutet auf eine effektive Hemmung von mTORC1 hin. Dies zeigt, dass in NET-Zellen die Beteiligung von AMPK bei der Metformin-vermittelten mTORC1-Hemmung zelltypabhängig ist. In allen 3 untersuchten Zelllinien kam es unter der Metformin-Behandlung zu einer kompensatorischen Aktivierung von Akt und GSK3. Zudem reagierten BON1- und NCI-H727-Zellen auf Metformin mit einem Anstieg der Erk-Phosphorylierung, während es in GOT1-Zellen zu einer Reduktion von pErk kam. Die Heterogenität der molekularen Metformin-Antwort setzte sich in nachfolgenden Zellzyklusanalysen fort. In GOT1-Zellen kam es unter Metformin zu einem Anstieg der subG1-Fraktion sowie zu einem Anstieg von PARP-Spaltprodukten. In BON1- und NCI-H727-Zellen konnte keine Apoptose-Induktion, jedoch eine leichte G0/G1-Phasen-Akkumulation bei gleichzeitiger Abnahme der S-Phasen-Fraktion, beobachtet werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Metformin, zelltypabhängig, unterschiedliche molekulare Mechanismen in Gang setzt, die jedoch bei allen untersuchten NET-Zellen in mTORC1-Inhibition und einer Abnahme der Zellviabilität resultierten. Wie die Ergebnisse dieser präklinischen Arbeit zeigen, könnte Metformin als gutverträgliches Therapeutikum zukünftig eine Rolle in der Therapie von GEP-NET spielen.

(Vlotides, G., Tanyeri, A., Spampatti, M., **Zitzmann, K.**, Chourdakis, M., Spöttl, C., Maurer, J., Nölting, S., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2014). Anticancer effects of

metformin on neuroendocrine tumor cells in vitro. *Hormones (Athens, Greece)*, 13(4), 498–508.)

### **Entwicklung und aktueller Status**

In der Folge konnte eine weitere präklinische Studie, die viabilitätshemmenden Effekte von Metformin auf GEP-NET-Zellen bestätigen (Herrera-Martínez, 2019). Eine retrospektive Analyse von 445 Patienten mit fortgeschrittenen neuroendokrinen Tumoren des Pankreas ergab eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens durch Metformin (Pusceddu, 2018).

Derzeit sind drei klinische Studien zur Wirksamkeit von Metformin bei der Behandlung von GEP-NET-Erkrankungen aktiv ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Neben einer Phase 2-Studie, die die Wirkung von Metformin als Einzelsubstanz an Patienten mit metastasierten, gut-differenzierten GEP-NET untersucht (NCT02279758), analysieren die MetNET-1 – und MetNET-2-Studien (NCT02294006 und NCT02823691) den antiproliferativen Effekt von Metformin in Kombination mit Everolimus und Octreotide LAR (MetNET-1) bzw. Lanreotide (MetNET2) an Patienten mit metastasierten, gut-differenzierten Pankreas-NET (MetNET1) bzw. GI- oder Lungen-NET (metNET-2).

#### 4.2.3 Der mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001) induziert antiproliferative Effekte in GEP-NET-Zellen

Im Gegensatz zu Metformin bewirkt das makrozyklische Lacton Rapamycin eine direkte Inhibition des mTORC1, indem es, gebunden an das intrazelluläre Protein FKBP12, die Konformationsänderung und allosterische Hemmung von mTOR bewirkt. Rapamycin wurde erstmals 1972 aus dem Bodenbakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliert und bereits in den 1980er Jahren in einem Screening Programm des National Cancer Instituts als ein Agens mit zytostatischer Aktivität eingestuft (Vignot, Faivre, Aguirre & Raymond, 2005). Aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit und chemischen Instabilität wurden zahlreiche Rapamycin-Analoga mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften entwickelt. Eines davon ist Everolimus (Rad001), welches zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits einige Phase II Studien in verschiedenen Tumorentitäten, darunter NET, durchlief. Jedoch lagen damals keinerlei präklinische Daten über die Wirksamkeit von Everolimus in NET vor. In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass Everolimus, dosis-abhängig, die Viabilität pankreatischer BON1-Zellen senkt. Wie die Zunahme der subG1-Fraktion und der Anstieg an PARP- und Caspase-3-Spaltprodukten zeigte, kam es während der Behandlung mit Everolimus zur Induktion von Apoptose. Zusätzlich bewirkte Everolimus einen signifikanten G0/G1-Zellzyklusphasenarrest. Während RAD001 die Phosphorylierung des mTORC1 targets p70S6K wirkungsvoll hemmte, kam es durch negative Rückkopplung zu einer Aktivierung von Akt und GSK3 $\alpha/\beta$ . Insgesamt lieferte diese Arbeit erste *in vitro*-Daten über die Wirksamkeit von Everolimus in NET und stützte die Notwendigkeit klinischer Studien.

**(Zitzmann, K., De Toni, E. N., Brand, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H. H., & Auernhammer, C. J. (2007). The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology*, 85(1), 54–60.)**

In weiterführenden Experimenten wurde das therapeutische Potential von Everolimus an anderen NET-Zellmodellen evaluiert. Sowohl intestinale GOT1- als auch bronchiale NCI-H727-Zellen reagierten bereits auf Konzentrationen von 10 ng/ml mit

signifikanten Viabilitätsverlusten, die sowohl durch Apoptose als auch durch G0/G1-Zellzyklusphasenarrest hervorgerufen wurden. Auch hier kam es durch negative Rückkopplung zu einem starken Anstieg von pAkt. Bei GOT1-Zellen konnte zusätzlich eine Everolimus-vermittelte Aktivierung von Erk nachgewiesen werden.

(Teile aus: **Zitzmann, K.**, Rüden, J. v., Brand, S., Göke, B., Lichtl, J., Spöttl, G., & Auernhammer, C. J. (2010). Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer letters*, 295(1), 100–109.)

### **Entwicklung und aktueller Status**

Everolimus durchlief mehrere Phase 2 und 3 Studien bei progredienten pankreatischen NET. Das progressionsfreie Überleben lag in der RADIANT-1- bzw. COOPERATE-2 Studie zwischen 9,7 und 16,6 Monaten (Yao, 2010; Kulke, 2017). Die randomisierte, Placebo-kontrollierte RADIANT-3 Studie zeigte eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von 4,6 Monaten mit Placebo, auf 11 Monate mit Everolimus, bei einer objektiven Remissionsrate von 5% (Yao, 2011). Seit 2011 ist Everolimus für die Behandlung von inoperablen, metastasierten NET des Pankreas zugelassen, 2016 erfolgte, aufgrund positiver Ergebnisse der RADIANT-4-Studie (Yao, 2016), die Zulassung für die Behandlung nicht funktioneller NET gastrointestinalen- oder pulmonalen Ursprungs.

### 4.3 Inhibierung und zielgerichtete Modulation des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs

#### 4.3.1 Der neue Raf Inhibitor Raf265 zeigt signifikante Antitumor-Wirkung

Der kompensatorische Anstieg von pErk als Antwort auf mTORC1-Inhibition in GOT1-Zellen führte zu der Einbeziehung des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs als potentiell „target“ in GEP-NET-Erkrankungen.

Die Mehrheit neuroendokriner Tumore weist eine konstitutive Erk1/2 Phosphorylierung auf (Shah, 2006). Um die Wirkung einer Blockade innerhalb des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs zu testen, wurden BON1-, GOT1-, und NCI-H727-Zellen mit steigenden Konzentrationen des Raf-Inhibitors Raf265 inkubiert. In allen untersuchten Zelllinien reduzierte Raf265 die Viabilität, indem es zu einer Apoptose, zum anderen einen G0/G1-Zellzyklusphasenarrest hervorrief. Raf265 inhibierte die Phosphorylierung von Erk1/2, induzierte jedoch einen starken Anstieg von pAkt. Eine Aktivierung von Akt unter Raf265 wurde zuvor nicht beschrieben und deutet auf eine geschlossene Rückkopplungsschleife zwischen Akt und Erk hin.

(Teile aus: **Zitzmann, K.**, Rüden, J. v., Brand, S., Göke, B., Lichtl, J., Spöttl, G., & Auernhammer, C. J. (2010). Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer letters*, 295(1), 100–109.)

#### **Entwicklung und aktueller Status**

Klinische Daten zu Raf265 sind rar. Bislang gibt es keine klinischen Studien zu seiner Wirksamkeit in GEP-NET. In einer Studie zu Raf265 in metastasierten Melanomen, erfuhren nur 8 von 66 Patienten – unabhängig vom B-Raf-Mutationsstatus - eine objektive Tumorantwort (Izar, 2017). Hingegen haben sich inzwischen die beiden BRAF-Inhibitoren Dabrafenib und Vemurafenib in der Therapie des BRAF V600-positiven, metastasierten Melanoms etabliert. In GEP-NET-Patienten wurde bislang nur der Raf-Inhibitor Sorafenib getestet. In mehreren Phase 1/Phase 2-Studien zeigte Sorafenib moderate Wirksamkeit, welche jedoch evtl. auf seine VEGFR-hemmende Eigenschaft zurückzuführen ist (Fazio, 2014).

#### 4.4 "multi-targeted" Therapieansätze in GEP-NET-Zellen

##### 4.4.1 Verhinderung von molekularen Escape-Mechanismen innerhalb des PI(3)K-Akt-mTOR / Ras-Raf-MEK-Erk-Netzwerks – Überlegenheit dualer Therapieansätze

In vorangegangenen Versuchen konnte während der Behandlung mit Mono-Kinase-Inhibitoren eine kompensatorische Aktivierung nicht gehemmter Kinasen innerhalb des PI(3)K-Akt-mTOR/Ras-Raf-MEK-Erk-Netzwerks beobachtet werden. Nachfolgende Experimente sollten zeigen, ob durch duale vertikale Hemmung innerhalb der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalkaskade bzw. durch duale horizontale Hemmung der PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade mögliche Ausweichmechanismen der Zelle umgangen und so die Effektivität der zielgerichteten Therapien gesteigert werden kann. In einem ersten Ansatz wurden hierzu pankreatische BON1-, bronchiale NCI-H727-, sowie intestinale GOT1-Zellen mit dem dualen mTOR/PI(3)K Inhibitor NVP-BEZ-235 behandelt. Dieser hatte – verglichen mit äquimolaren Dosen Everolimus – eine deutlich stärkere Reduktion der Zellviabilität zur Folge. Wie Everolimus bewirkte NVP-BEZ235 einen signifikanten G0/G1-Zellzyklusphasenarrest sowie die Induktion von Apoptose. Durch die zusätzliche Hemmung der PI(3)K konnte eine negative „feedback“-Aktivierung von Akt, wie sie durch Everolimus ausgelöst wurde, verhindert werden. Allerdings kam es nun zu einem leichten Anstieg von pErk.

In einem nächsten Ansatz sollte daher durch simultane Inhibierung von mTOR bzw. PI(3)K/mTOR und Raf mittels Everolimus bzw. NVP-BEZ235 und Raf265 ein weiterer Kompensationsmechanismus inhibiert werden. Tatsächlich konnte eine zusätzliche Behandlung mit Raf265 die antitumorale Wirkung, sowohl von Everolimus als auch von NVP-BEZ235, massiv verstärken.

Frühere Studien hatten gezeigt, dass die Aktivierung der PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade in BON1-Zellen in hohem Maße von der Stimulation des IGF-IR abhängt (Höpfner, 2006). Eine Ausschaltung dieser übergeordneten Instanz könnte durch die gleichzeitige Verhinderung mehrerer „feedback“-Schleifen ein hohes Antitumor-Potential bergen. In allen untersuchten GEP-NET-Zellen (BON1, NCI-H727 und GOT1) bewirkte eine IGFIR-Blockierung mittels des selektiven IGFIR-Inhibitors NVP-AEW541, eine langanhaltende Inhibition

der Phosphorylierung von Akt, p70S6K und Erk. Erwartungsgemäß kam es unter NVP-AEW541 zu einem starken Rückgang der Zellviabilität.

(Teile aus: **Zitzmann, K.**, Rüden, J. v., Brand, S., Göke, B., Lichtl, J., Spöttl, G., & Auernhammer, C. J. (2010). Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer letters*, 295(1), 100–109.)

### **Weiterentwicklung/aktueller Status**

In nachfolgenden präklinischen Studien, konnten andere Arbeitsgruppen die starke Antitumor-Wirkung von NVP-BEZ235 auf GEP-NET-Zellen bestätigen (Vandamme, 2016; Valentino, 2014). Jedoch wurden zwei begonnene klinischen Studien vorzeitig abgebrochen, da der primäre Endpunkt nicht erreicht wurde und NVP-BEZ235, im Vergleich zu Everolimus, eine geringere Wirksamkeit und schlechtere Tolerabilität aufwies (Salazar, 2018; Fazio, 2016). Inzwischen wurde die klinische Entwicklung von NVP-BEZ235 in GEP-NET eingestellt.

Ebenso enttäuschend waren die Ergebnisse zweier klinischer Studien zur Wirksamkeit der monoklonalen IGF-IR-Antikörper Ganitumab und Cixutumumab in NET. In keiner der beiden Studien konnte ein signifikantes Ansprechen der Tumore auf die IGF-IR-Hemmung beobachtet werden (Strosberg, 2013; Dasari, 2015).



#### 4.4.2 Sensibilisierung gegenüber TRAIL durch Raf265 und NVP-AEW541

Der Todesligand „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) wird von NK-Zellen des Immunsystems exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr. Durch Andocken an entsprechende Rezeptoren (DR 4 und 5) setzt TRAIL die Selbstzerstörungsmaschinerie virusinfizierter- oder entarteter Zellen in Gang. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass die externe Gabe von TRAIL in Tumorzellen Apoptose auslöst, ohne gesunde Zellen zu beeinträchtigen (Chinnaiyan, 2000). Dabei konnte in einigen Fällen ein Zusammenhang zwischen TRAIL-Resistenz und einer Überaktivierung von mTOR hergestellt werden (Panner, James, Berger & Pieper, 2005).

Eine Vorbehandlung mit mTOR-Inhibitoren könnte daher ein vielversprechender Ansatz sein, um die Sensitivität von Krebszellen gegenüber TRAIL wiederherzustellen bzw. zu erhöhen. GEP-NET-Zellen unterschiedlicher Herkunft zeigten stark unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber TRAIL: Pankreatische BON1- und CM-Zellen waren besonders empfindlich und reagierten bereits bei niedrigen TRAIL-Konzentrationen (1 ng/ml) mit signifikant verminderter Zellviabilität. NCI-H727-Zellen zeigten eine mäßige Sensitivität, während GOT1-Zellen unempfindlich gegenüber allen getesteten TRAIL-Konzentrationen waren. Die Empfindlichkeit gegenüber TRAIL korrelierte mit der basalen Expression von FLIP(S), Caspase-8 und Bcl-2.

Entgegen der Erwartungen, konnte eine Vorinkubation mit RAD001 oder NVP-BEZ235 in keiner der getesteten Zelllinien die Sensitivität erhöhen.

Anders sahen die Ergebnisse einer Kombinationsbehandlung mit NVP-AEW541 und TRAIL aus. Hier konnten zumindest für NCI-H727-Zellen synergistische Antitumor-Effekte beobachtet werden. Ebenfalls synergistisch waren die Antitumor-Effekte einer Kombinationsbehandlung mit Raf265 und Trail in NCI-H727- und CM-Zellen. In beiden Fällen korrelierte die Reduktion der Zellviabilität mit der Aktivierung von Caspase 3, 8, 9 und PARP und einem Anstieg der subG1-Fraktion. Raf265 bewirkte in Zellen die für seine TRAIL-sensitivierenden Eigenschaften empfänglich waren, eine starke Reduktion der Bcl-2-Expression. *In vivo* könnten Raf-Inhibitoren, zusätzlich zu direkten Antitumor-Effekten, die NK-zellvermittelte Immunantwort verstärken. Zusätzlich stellt die kombinierte, externe Gabe von Raf-Inhibitoren und

rekombinatem TRAIL ein weiteres vielversprechendes Konzept in der Behandlung von GEP-NET-Erkrankungen dar.

(Zitzmann, K., de Toni, E., von Rüden, J., Brand, S., Göke, B., Laubender, R. P., & Auernhammer, C. J. (2011). The novel Raf inhibitor Raf265 decreases Bcl-2 levels and confers TRAIL-sensitivity to neuroendocrine tumour cells. *Endocrine-related cancer*, 18(2), 277–285.)

### **Weiterentwicklung/aktueller Status**

In den letzten Jahren wurde die Wirkung von rekombinatem humanem TRAIL in einer Vielzahl von Tumorentitäten, nicht aber in NET, untersucht. Vermutlich aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (< 60 min) blieb bislang der erhoffte Erfolg in der Krebstherapie aus (Lim, Greer, Lipkowitz & Takebe, 2019). Zahlreiche DR-Agonisten wurden entwickelt und befinden sich derzeit in präklinischer/klinischer Entwicklung. Auch die Antitumor-Wirkung des niedermolekulare TRAIL-Induktors ONC201 wird derzeit in mehreren Phase 2 Studien, darunter auch in rekurrenten und metastatierten NET evaluiert (NCT03034200, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass in stark Bcl-2-exprimierenden NET Zellen (GOT1), durch Bcl-2-Hemmung die Sensitivität gegenüber TRAIL wiederhergestellt werden konnte. Die Ergebnisse aktueller präklinischer und klinischer Studien zeigen hohe Ansprechraten von Bcl-2-Inhibitoren wie Venetoclax bei Tumoren mit hoher Bcl-2-Expression, einschließlich kleinzelliger Lungenkarzinome (Lim, 2019; Lochmann, 2018). In den USA wurde Venetoclax bereits im April 2016 über ein beschleunigtes Verfahren für die Behandlung chronisch lymphatischer Leukämie zugelassen. Noch im selben Jahr erfolgte seine Zulassung in der EU.

#### 4.4.3 Blockierung der Hitzeschockprotein (HSP)90 Funktion

Bei HSP90 handelt es sich um ein wichtiges molekulares Chaperon, welches im Zusammenspiel mit Co-Chaperonen wie HSP70, die korrekte Faltung, Aktivierung und Translokation einer Vielzahl tumor-relevanter Proteinkinasen, darunter zahlreiche Komponenten des PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs, koordiniert. Die pharmakologische Blockierung seiner Funktion hat die simultane Degradation solcher „Klientenproteine“ zur Folge und könnte ein vielversprechender Ansatz sein, „escape“-Mechanismen zu umgehen (Isaacs, Xu & Neckers, 2003).

In dieser Arbeit untersuchten wir die Wirkung der HSP90-Inhibitoren AUY922 und HSP990 auf BON1-, NCI-H727- und GOT1-Zellen. In den untersuchten Zelllinien bewirkten bereits geringe Konzentration (5 nM) beider Inhibitoren eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Unter AUY922 oder HSP990 kam es zu keiner Verschiebung der Zellzyklusphasenverteilung, jedoch konnte eine Zunahme von subG1-events und PARP-Spaltprodukten und damit Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. Die Untersuchung einiger Schlüsselproteine des PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs, nach Behandlung der Zellen mit AUY922 bzw. HSP990, zeigte eine deutlich verminderte Expression von pAkt, Akt, pErk, pp70S6K, p70S6K und 4EBP1.

Unter den zahlreichen bekannten Klientenproteinen von HSP90 sind neben Komponenten des PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs, eine Vielzahl von Wachstumshormonrezeptoren. So konnte Gilbert et al. in NCI-H727-Zellen eine reduzierte Expression von EGFR und IGF-I-R nach Behandlung mit dem HSP90- Inhibitor 17-AAG nachweisen (Gilbert, 2013).

Auch in der vorliegenden Arbeit bewirkte die HSP90-Inhibition mittels AUY922 oder HSP990 in allen 3 untersuchten NET-Zelllinien eine deutliche Verminderung der EGFR-Expression. Zusätzlich wurde durch beide HSP90-Inhibitoren die Expression der zur EGFR-Familie gehörenden Rezeptorkinasen ErbB2 und ErbB3 sowie von IGFR wirkungsvoll unterdrückt.

(Zitzmann, K., Ailer, G., Vlotides, G., Spoettl, G., Maurer, J., Göke, B., Beuschlein, F., & Auernhammer, C. J. (2013). Potent antitumor activity of the novel HSP90 inhibitors AUY922 and HSP990 in neuroendocrine carcinoid cells. *International journal of oncology*, 43(6), 1824–1832.)

### **Weiterentwicklung/aktueller Status**

Während die klinische Entwicklung von HSP990 bereits im August 2012 aufgrund mangelnder Effektivität eingestellt wurde, durchlief AUY922 in den letzten Jahren eine Reihe klinischer Studien in verschiedenen Tumorentitäten, nicht aber in NET (Spreafico, 2015). AUY922 gehört dabei zu den HSP90-Inhibitoren mit dem bisher besten Entwicklungsfortschritt innerhalb klinischer Studien (Schaarschmidt, 2020, Bendell, 2016). Generell ist aufgrund vergleichsweise hoher Toxizitäten und „heat shock response“-bedingter Resistenzen ein zukünftiger Einsatz von HSP90-Inhibitoren in der Klinik fraglich.

#### 4.4.4 Somatostatin-Dopamin Chimäre

Im humanen Genom finden sich 5 Gene welche für 5 transmembrane G-Protein-gekoppelte Somatostatin-Rezeptoren (SSTR1-5) codieren. Die natürlichen Liganden SST-14, SST-28 und Cortistatin binden mit hoher Affinität an alle SSTR, besitzen jedoch aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeiten keine klinische Relevanz. Die synthetischen Somatostatin-Analoga, Octreotide und Lanreotide, werden in der Behandlung von GEP-NET eingesetzt. Gegenüber den natürlichen Somatostatinen besitzen sie ein verbessertes pharmakokinetisches Profil, binden jedoch lediglich SSTR2 mit hoher Affinität. Die Effekte von Somatostatin sind teilweise durch direkte und indirekte Hemmung der PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade bedingt (Briest, 2014).

Es gilt als gesichert, dass SSTRen mit Dopamin D2 Rezeptoren (D2R) heterodimere Rezeptorkomplexe mit verbesserter Funktion im Hinblick auf Bindungsstärke und Signalweiterleitung bilden können (Rocheville, 2000). Da die Mehrheit der GEP-NET sowohl SSTRen als auch D2R exprimiert, könnte der Einsatz von SSTR/D2R-chimären Substanzen erfolgversprechend sein.

Zur Evaluierung dieses Ansatzes wurden zunächst die Effekte der zwei neuen SSTR2/D2R-chimären Substanzen, BIM-23A760 und BIM-23A758, auf die Viabilität verschiedener GEP-NET-Zelllinien im Vergleich zu den selektiven SSTR2- bzw. D2R-Agonisten BIM-23023 bzw. BIM-53097 getestet. Während BIM-23A760, BIM-23023 und BIM-53097 keine oder minimale Effekte auf die Viabilität der getesteten NET-Zellen hatten, bewirkte BIM-23A758 in GOT1-Zellen eine signifikante Abnahme der Zellviabilität. Genauere Untersuchungen konnten unter BIM-23A758 eine Zunahme der subG1-Fraktion sowie einen Anstieg von Caspase-3-Spaltprodukten und eine Abnahme von Bcl-2 und Bcl-XL zeigen. Die Apoptose-Induktion ging mit einer Reduzierung der Phosphorylierungsspiegel von MEK, Erk1/2 und Akt, sowie p70S6K, 4E-BP1 und MDM2 einher.

Um zu verstehen, welche molekularen Voraussetzungen der Wirksamkeit von BIM-23A758 zugrunde liegen, wurden zunächst die basalen mRNA-Expressionsspiegel von SSTR2, SSTR5 und den beiden Splicevarianten von D2R, D2R-L (long) und D2R-S (short) mittels qRT-PCR analysiert. In allen untersuchten Zelllinien konnten alle Rezeptortypen nachgewiesen werden. Jedoch

zeigten GOT1-Zellen – in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen – die höchste Expression, insbesondere von DR2-S. Eine gleichzeitige Behandlung mit dem selektiven D2R-Antagonist Sulpiride und BIM-23A758 konnte die zuvor beobachteten Antitumor-Effekte deutlich abmildern. Insgesamt liefern diese Ergebnisse Hinweise auf die Notwendigkeit hoher D2R-S-Expression für das Ansprechen auf SSTR2/D2R-Chimäre. Sie zeigen dabei, einmal mehr, die Heterogenität von GEP-NET und die Wichtigkeit einer individuellen Betrachtung und maßgeschneiderten Therapie. Bei GEP-NET-Patienten mit positivem D2R-S-Rezeptor-Status könnten neuartige SSTR2/D2R-chimäre Substanzen in Zukunft eine Rolle spielen.

(Zitzmann, K., Andersen, S., Vlotides, G., Spöttl, G., Zhang, S., Datta, R., Culler, M., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2013). The novel somatostatin receptor 2/dopamine type 2 receptor chimeric compound BIM-23A758 decreases the viability of human GOT1 midgut carcinoid cells. *Neuroendocrinology*, 98(2), 128–136.)

### **Weiterentwicklung/aktueller Status**

Trotz vielversprechender Ergebnisse der vorliegenden Studie wurde bisher keine klinische Entwicklung von BIM-23A758 verfolgt. Hingegen trat BIM-23A760 in klinische Studien an Patienten mit Karzinoidsyndrom bzw. Akromegalie ein und zeigte anfänglich gute Wirksamkeit. Diese ließ jedoch mit zunehmender Behandlungsdauer stark nach, wofür die Akkumulation eines BIM-23A760-Metaboliten mit dopaminergem Aktivität verantwortlich gemacht wurde (Culler, 2011). Mit BIM23B065 wurde ein SSTR2/D2R-Chimär mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften entwickelt (de Boon, 2019). In vitro hemmt BIM23B065 effektiv die Sekretion von Serotonin in GEP-NET (Herrera-Martínez, 2019). Eine erste klinische Studien belegte die Beständigkeit seiner Wirkung (de Boon, 2019).

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In den publizierten Arbeiten wurden Signalwege näher untersucht, die für Proliferation, Wachstum und Überleben neuroendokriner Tumorzellen von besonderer Bedeutung sind: der Jak-STAT-Signalweg, der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalweg sowie der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg. Primäres Ziel war es, durch aktivierende oder hemmende Modulation dieser Signalwege Antitumor-Effekte in GEP-NET-Zellen zu erzielen und somit neue Strategien für die Behandlung neuroendokriner Tumore aufzuzeigen.

Die Suche nach Alternativen zu IFN- $\alpha$  bzw. Möglichkeiten die Jak-STAT-vermittelte antitumorale Wirkung von IFN- $\alpha$  zu verstärken ergab, dass in GEP-NET-Zellen

- **$\lambda$ -IFNe in ihrer Antitumor-Wirkung vergleichbar mit IFN- $\alpha$  sind.**
- **IFN- $\beta$  signifikant stärkere antitumorale Effekte als IFN- $\alpha$  induziert.**
- **die Wirkung von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  durch siRNA-vermitteltes Silencing von SOCS1 bzw. SOCS3 massiv verstärkt werden kann.**

Innerhalb des PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs wurden einzelne Komponenten inhibiert und gefunden dass in GEP-NET-Zellen

- **der pan-Akt-Inhibitor Perifosin eine starke Antitumor-Wirkung zeigt**
- **die selektive Inhibition von Akt1 und/oder Akt3 signifikante antitumorale Effekte hervorruft, während die Inhibition von Akt2 stark tumorfördernd ist.**
- **Metformin über AMPK-abhängige und AMPK-unabhängige Mechanismen mTORC1 hemmt und damit die Viabilität stark herabsetzt**
- **der mTOR-Inhibitor Everolimus und**
- **der Raf-Inhibitor Raf265 eine starke Antitumor-Wirkung zeigen.**

Der sowohl unter Everolimus als auch unter Raf265, zu beobachtende Anstieg von pAkt lieferte einen Hinweis auf die Existenz wirkungsvoller Rückkopplungsmechanismen. Deshalb wurde versucht, durch duale vertikale Hemmung innerhalb der PI(3)K-Akt-mTOR-Signalkaskade bzw. durch duale horizontale Hemmung der PI(3)K-Akt-mTOR- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalkaskade die Kompensationsmöglichkeiten für die Zellen einzudämmen. In GEP-NET-Zellen waren „multi-targeted“-Ansätze mit

- **dem dualen PI(3)K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235**
- **Kombinationen von Everolimus + Raf265 bzw. NVP-BEZ235 + Raf265**
- **dem IGF-IR-Inhibitor NVP-AEW541 sowie**
- **den HSP90-Inhibitoren AUY922 und HSP990**

bezüglich ihrer antitumoralen Wirksamkeit den „single-targeted“-Ansätzen überlegen.

Während die Evaluation und Weiterentwicklung einiger der hier vorgestellten Therapieansätze (bisher) nicht fortgesetzt wurde, sind andere Ansätze bereits im Rahmen klinischer Studien an GEP-NET-Patienten überprüft worden. Herausragend waren dabei die Ergebnisse mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus, welcher inzwischen für die Behandlung von metastasierter NET des Pankreas, sowie nicht funktioneller NET gastrointestinalen- oder pulmonalen Ursprungs zugelassen ist (Yao, 2010; Kulke, 2017; Yao, 2011; Yao, 2016). Dagegen erwies sich die pharmakologische Inhibition von Akt oder Raf in klinischen Studien an GEP-NET-Patienten als wenig effektiv (Yap, 2011; Reidy, 2013; Fazio, 2014). Ebenfalls enttäuschend war die klinische Evaluation verschiedener „multi-targeted“-Ansätze wie PI3K/Akt- oder IGF-IR-Inhibition (Salazar, 2018; Fazio, 2016; Strosberg, 2013; Dasari, 2015). Kritisiert werden hier jedoch Schwächen bezüglich des Studiendesigns. So deutet einiges darauf hin, dass GEP-NET-Patienten mit seltenen B-Raf-Mutationen von einer Behandlung mit Raf-Inhibitoren (z.B. Raf265) durchaus profitieren könnten (Allen, 2019; Dizdar, 2019; Klempner, 2016). Ebenso scheinen hohe IGF-I und IGF-IR-Expressionsspiegel für die Wirksamkeit monoklonaler IGF-IR-Antikörper bzw. pharmakologischer IGF-IR-Inhibitoren zu sprechen (Werner, Sarfstein & Bruchim, 2019). Ebenfalls ein Zusammenhang besteht zwischen hoher Bcl-2-Expression und



dem Ansprechen auf Bcl-2-Inhibitoren (Lim, 2019), welche allein oder in Kombination mit TRAIL einen vielversprechenden neuen Therapieansatz für GEP-NET darstellen. Diese Beobachtungen zeigen, dass eine strengere Selektion von Patienten, die aufgrund molekularer Tumorcharakteristika von zielgerichteten Therapien profitieren könnten, dringend erforderlich ist und verdeutlichen die Notwendigkeit individualisierter Therapien.

## 6. Literaturverzeichnis

- Allen, A., Qin, A., Raj, N., Wang, J., Uddin, S., Yao, Z., Tang, L., Meyers, P. A., Taylor, B. S., Berger, M. F., Yaeger, R., Reidy-Lagunes, D., & Pratilas, C. A. (2019). Rare BRAF mutations in pancreatic neuroendocrine tumors may predict response to RAF and MEK inhibition. *PloS one*, *14*(6), e0217399.
- Aristizabal Prada, E. T., & Auernhammer, C. J. (2018). Targeted therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: preclinical strategies and future targets. *Endocrine connections*, *7*(1), R1–R25.
- Auernhammer, C. J., Spitzweg, C., Angele, M. K., Boeck, S., Grossman, A., Nölting, S., Ilhan, H., Knösel, T., Mayerle, J., Reincke, M., & Bartenstein, P. (2018). Advanced neuroendocrine tumours of the small intestine and pancreas: clinical developments, controversies, and future strategies. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, *6*(5), 404–415.
- Auernhammer, C. J., Spitzweg, C., Böck, S., Knösel, T., & Bartenstein, P. (2019). Neues zur Therapie von neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems [Current standards and novel developments in the treatment of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, *144*(20), 1390–1395.
- Begum, N., Maasberg, S., & Pape U. F. (2017). Epidemiologische Daten des Deutschen NET-Registers. *TumorDiagnostik und Therapie*, *38*(01), 30-34.
- Bendell, J. C., Bauer, T. M., Lamar, R., Joseph, M., Penley, W., Thompson, D. S., Spigel, D. R., Owera, R., Lane, C. M., Earwood, C., & Burris, H. A., 3rd (2016). A Phase 2 Study of the Hsp90 Inhibitor AUY922 as Treatment for Patients with Refractory Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer investigation*, *34*(6), 265–270.
- Bollard, J., Massoma, P., Vercherat, C., Blanc, M., Lepinasse, F., Gadot, N., Couderc, C., Poncet, G., Walter, T., Joly, M. O., Hervieu, V., Scoazec, J. Y., & Roche, C. (2015). The axon guidance molecule semaphorin 3F is a negative regulator of tumor progression and proliferation in ileal neuroendocrine tumors. *Oncotarget*, *6*(34), 36731–36745.
- Brand, S., Zitzmann, K., Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Vlotides, G., Eichhorst, S. T., Göke, B., Diepolder, H., & Auernhammer, C. J. (2005). SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambda IL-28A and IL-29. *Biochemical and biophysical research communications*, *331*(2), 543–548.

- Briest, F., & Grabowski, P. (2014). PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: the complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Theranostics*, 4(4), 336–365.
- Brown, M. C., & Gromeier, M. (2017). MNK Controls mTORC1: Substrate Association through Regulation of TELO2 Binding with mTORC1. *Cell reports*, 18(6), 1444–1457.
- Cantley L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1655–1657.
- Chinnaiyan, A. M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D. A., Shanaiah, M., Chenevert, T. L., Ross, B. D., & Rehemtulla, A. (2000). Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1754–1759.
- Crocker, B. A., Kiu, H., & Nicholson, S. E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in cell & developmental biology*, 19(4), 414–422.
- Culler M. D. (2011). Somatostatin-dopamine chimeras: a novel approach to treatment of neuroendocrine tumors. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, 43(12), 854–857.
- Dasari, A., Phan, A., Gupta, S., Rashid, A., Yeung, S. C., Hess, K., Chen, H., Tarco, E., Chen, H., Wei, C., Anh-Do, K., Halperin, D., Meric-Bernstam, F., & Yao, J. (2015). Phase I study of the anti-IGF1R antibody cixutumumab with everolimus and octreotide in advanced well-differentiated neuroendocrine tumors. *Endocrine-related cancer*, 22(3), 431–441.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–954.
- de Boon, W., van Esdonk, M. J., Stuurman, F. E., Biermasz, N. R., Pons, L., Paty, I., & Burggraaf, J. (2019). A Novel Somatostatin-Dopamine Chimera (BIM23B065) Reduced GH Secretion in a First-in-Human Clinical Trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(3), 883–891.
- Dizdar, L., Werner, T. A., Drusenheimer, J. C., Möhlendick, B., Raba, K., Boeck, I., Anlauf, M., Schott, M., Göring, W., Esposito, I., Stoecklein, N. H., Knoefel, W. T., & Krieg, A.

- (2019). BRAF<sup>V600E</sup> mutation: A promising target in colorectal neuroendocrine carcinoma. *International journal of cancer*, 144(6), 1379–1390.
- Doyle, S. E., Schreckhise, H., Khuu-Duong, K., Henderson, K., Rosler, R., Storey, H., Yao, L., Liu, H., Barahmand-pour, F., Sivakumar, P., Chan, C., Birks, C., Foster, D., Clegg, C. H., Wietzke-Braun, P., Mihm, S., & Klucher, K. M. (2006). Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 44(4), 896–906.
- Fazio, N., Abdel-Rahman, O., Spada, F., Galdy, S., De Dosso, S., Capdevila, J., & Scarpa, A. (2014). RAF signaling in neuroendocrine neoplasms: from bench to bedside. *Cancer treatment reviews*, 40(8), 974–979.
- Fazio, N., Buzzoni, R., Baudin, E., Antonuzzo, L., Hubner, R. A., Lahner, H., DE Herder, W. W., Raderer, M., Teulé, A., Capdevila, J., Libutti, S. K., Kulke, M. H., Shah, M., Dey, D., Turri, S., Aimone, P., Massacesi, C., & Verslype, C. (2016). A Phase II Study of BEZ235 in Patients with Everolimus-resistant, Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *Anticancer research*, 36(2), 713–719.
- Fish, E. N., & Plataniias, L. C. (2014). Interferon receptor signaling in malignancy: a network of cellular pathways defining biological outcomes. *Molecular cancer research: MCR*, 12(12), 1691–1703.
- Ghayouri, M., Boulware, D., Nasir, A., Strosberg, J., Kvols, L., & Coppola, D. (2010). Activation of the serine/threonine protein kinase Akt in enteropancreatic neuroendocrine tumors. *Anticancer research*, 30(12), 5063–5067.
- Gilbert, J. A., Adhikari, L. J., Lloyd, R. V., Halfdanarson, T. R., Muders, M. H., & Ames, M. M. (2013). Molecular markers for novel therapeutic strategies in pancreatic endocrine tumors. *Pancreas*, 42(3), 411–421.
- Gottlieb, T. M., Leal, J. F., Seger, R., Taya, Y., & Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 21(8), 1299–1303.
- Hamid, S. S., Etzion, O., Lurie, Y., Bader, N., Yardeni, D., & Channa, S. M. (2017). A phase 2 randomized clinical trial to evaluate the safety and efficacy of pegylated interferon lambda monotherapy in patients with chronic hepatitis delta virus infection. Interim results from the LIMIT HDV Study (abstr.). *Hepatology*, 66, 496A.

- Han, X., Ji, Y., Zhao, J., Xu, X., & Lou, W. (2013). Expression of PTEN and mTOR in pancreatic neuroendocrine tumors. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(5), 2871–2879.
- Herrera-Martínez, A. D., Pedraza-Arevalo, S., L-López, F., Gahete, M. D., Gálvez-Moreno, M. A., Castaño, J. P., & Luque, R. M. (2019). Type 2 Diabetes in Neuroendocrine Tumors: Are Biguanides and Statins Part of the Solution?. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(1), 57–73.
- Herrera-Martínez, A. D., van den Dungen, R., Dogan-Oruc, F., van Koetsveld, P. M., Culler, M. D., de Herder, W. W., Luque, R. M., Feelders, R. A., & Hofland, L. J. (2019). Effects of novel somatostatin-dopamine chimeric drugs in 2D and 3D cell culture models of neuroendocrine tumors. *Endocrine-related cancer*, 26(6), 585–599.
- Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., & Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(9), 2619–2627.
- Höpfner, M., Baradari, V., Huether, A., Schöfl, C., & Scherübl, H. (2006). The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Endocrine-related cancer*, 13(1), 135–149.
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society B*, 147, 258-267.
- Isaacs, J. S., Xu, W., & Neckers, L. (2003). Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer cell*, 3(3), 213–217.
- Izar, B., Sharfman, W., Hodi, F. S., Lawrence, D., Flaherty, K. T., Amaravadi, R., Kim, K. B., Puzanov, I., Sosman, J., Dummer, R., Goldinger, S. M., Lam, L., Kakar, S., Tang, Z., Krieter, O., McDermott, D. F., & Atkins, M. B. (2017). A first-in-human phase I, multicenter, open-label, dose-escalation study of the oral RAF/VEGFR-2 inhibitor (RAF265) in locally advanced or metastatic melanoma independent from BRAF mutation status. *Cancer medicine*, 6(8), 1904–1914.
- Jiao, Y., Shi, C., Edil, B. H., de Wilde, R. F., Klimstra, D. S., Maitra, A., Schulick, R. D., Tang, L. H., Wolfgang, C. L., Choti, M. A., Velculescu, V. E., Diaz, L. A., Jr, Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Hruban, R. H., & Papadopoulos, N. (2011). DAXX/ATRAX, MEN1, and

- mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6021), 1199–1203.
- Kaltsas, G. A., Besser, G. M., & Grossman, A. B. (2004). The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocrine reviews*, 25(3), 458–511.
- Kidd, M., Schimmack, S., Lawrence, B., Alaimo, D., & Modlin, I. M. (2013). EGFR/TGF $\alpha$  and TGF $\beta$ /CTGF Signaling in Neuroendocrine Neoplasia: Theoretical Therapeutic Targets. *Neuroendocrinology*, 97(1), 35–44.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell*, 11(4), 895–904.
- Klempner, S. J., Gershenhorn, B., Tran, P., Lee, T. K., Erlander, M. G., Gowen, K., Schrock, A. B., Morosini, D., Ross, J. S., Miller, V. A., Stephens, P. J., Ou, S. H., & Ali, S. M. (2016). BRAFV600E Mutations in High-Grade Colorectal Neuroendocrine Tumors May Predict Responsiveness to BRAF-MEK Combination Therapy. *Cancer discovery*, 6(6), 594–600.
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H., & Donnelly, R. P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology*, 4(1), 69–77.
- Krishnamurthy, S., & Dayal, Y. (1997). Immunohistochemical expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal carcinoids. *The American journal of surgical pathology*, 21(3), 327–333.
- Kulke, M. H., Ruzniewski, P., Van Cutsem, E., Lombard-Bohas, C., Valle, J. W., De Herder, W. W., Pavel, M., Degtyarev, E., Brase, J. C., Bubuteishvili-Pacaud, L., Voi, M., Salazar, R., Borbath, I., Fazio, N., Smith, D., Capdevila, J., Riechelmann, R. P., & Yao, J. C. (2017). A randomized, open-label, phase 2 study of everolimus in combination with pasireotide LAR or everolimus alone in advanced, well-differentiated, progressive pancreatic neuroendocrine tumors: COOPERATE-2 trial. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(6), 1309–1315.

- Lasfar, A., Zloza, A., Silk, A. W., Lee, L. Y., & Cohen-Solal, K. A. (2019). Interferon Lambda: Toward a Dual Role in Cancer. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 39(1), 22–29.
- Lim, B., Greer, Y., Lipkowitz, S., & Takebe, N. (2019). Novel Apoptosis-Inducing Agents for the Treatment of Cancer, a New Arsenal in the Toolbox. *Cancers*, 11(8), 1087.
- Lloyd, R. V., Osamura, R. Y., Klöppel, G., & Rosai, J. (2017). WHO classification of tumours of endocrine organs. Lyon. IARC, 4. Edition.
- Lochmann, T. L., Floros, K. V., Naseri, M., Powell, K. M., Cook, W., March, R. J., Stein, G. T., Greninger, P., Maves, Y. K., Saunders, L. R., Dylla, S. J., Costa, C., Boikos, S. A., Leveson, J. D., Souers, A. J., Krystal, G. W., Harada, H., Benes, C. H., & Faber, A. C. (2018). Venetoclax Is Effective in Small-Cell Lung Cancers with High BCL-2 Expression. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(2), 360–369.
- Luo, J., Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer cell*, 4(4), 257–262.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1263–1284.
- Mendoza, M. C., & Blenis, J. (2007). PHLPPing it off: phosphatases get in the Akt. *Molecular cell*, 25(6), 798–800.
- 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, C. M., & Scarpa, A. (2010). Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(2), 245–255.
- Modlin, I. M., Lye, K. D., & Kidd, M. (2003). A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*, 97(4), 934–959.
- Muir, A. J., Arora, S., Everson, G., Flisiak, R., George, J., Ghalib, R., Gordon, S. C., Gray, T., Greenbloom, S., Hassanein, T., Hillson, J., Horga, M. A., Jacobson, I. M., Jeffers, L., Kowdley, K. V., Lawitz, E., Lueth, S., Rodriguez-Torres, M., Rustgi, V., Shemanski, L., ...

- EMERGE study group (2014). A randomized phase 2b study of peginterferon lambda-1a for the treatment of chronic HCV infection. *Journal of hepatology*, 61(6), 1238–1246.
- Mundi, P. S., Sachdev, J., McCourt, C., & Kalinsky, K. (2016). AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *British journal of clinical pharmacology*, 82(4), 943–956.
- Nakayama, H., Bruneau, S., Kochupurakkal, N., Coma, S., Briscoe, D. M., & Klagsbrun, M. (2015). Regulation of mTOR Signaling by Semaphorin 3F-Neuropilin 2 Interactions In Vitro and In Vivo. *Scientific reports*, 5, 11789.
- Nelson, M., Rubio, R., Lazzarin, A., Romanova, S., Luetkemeyer, A., Conway, B., Molina, J. M., Xu, D., Srinivasan, S., & Portsmouth, S. (2017). Safety and Efficacy of Pegylated Interferon Lambda, Ribavirin, and Daclatasvir in HCV and HIV-Coinfected Patients. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 37(3), 103–111.
- Nilsson, O., Wängberg, B., Kölby, L., Schultz, G. S., & Ahlman, H. (1995). Expression of transforming growth factor alpha and its receptor in human neuroendocrine tumours. *International journal of cancer*, 60(5), 645–651.
- O'Neill, E., & Kolch, W. (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *British journal of cancer*, 90(2), 283–288.
- Panner, A., James, C. D., Berger, M. S., & Pieper, R. O. (2005). mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Molecular and cellular biology*, 25(20), 8809–8823.
- Pavel, M., Baudin, E., Couvelard, A., Krenning, E., Öberg, K., Steinmüller, T., Anlauf, M., Wiedenmann, B., Salazar, R., & Barcelona Consensus Conference participants (2012). ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology*, 95(2), 157–176.
- Perren, A., Komminoth, P., Saremaslani, P., Matter, C., Feurer, S., Lees, J. A., Heitz, P. U., & Eng, C. (2000). Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *The American journal of pathology*, 157(4), 1097–1103.



- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, *137*(5), 873–886.
- Phillips, S., Mistry, S., Riva, A., Cooksley, H., Hadzhiolova-Lebeau, T., Plavova, S., Katzarov, K., Simonova, M., Zeuzem, S., Woffendin, C., Chen, P. J., Peng, C. Y., Chang, T. T., Lueth, S., De Knegt, R., Choi, M. S., Wedemeyer, H., Dao, M., Kim, C. W., Chu, H. C., ... Chokshi, S. (2017). Peg-Interferon Lambda Treatment Induces Robust Innate and Adaptive Immunity in Chronic Hepatitis B Patients. *Frontiers in immunology*, *8*, 621.
- Platanias L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology*, *5*(5), 375–386.
- Plöckinger, U., & Wiedenmann, B. (2005). Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Management of metastatic endocrine tumours. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, *19*(4), 553–576.
- Pusceddu, S., Vernieri, C., Di Maio, M., Marconcini, R., Spada, F., Massironi, S., Ibrahim, T., Brizzi, M. P., Campana, D., Faggiano, A., Giuffrida, D., Rinzivillo, M., Cingarlini, S., Aroldi, F., Antonuzzo, L., Berardi, R., Catena, L., De Divitiis, C., Ermacora, P., Perfetti, V., ... de Braud, F. (2018). Metformin Use Is Associated With Longer Progression-Free Survival of Patients With Diabetes and Pancreatic Neuroendocrine Tumors Receiving Everolimus and/or Somatostatin Analogues. *Gastroenterology*, *155*(2), 479–489.e7.
- Reidy DL, Pietanza MC, Segal M, Capanu M & Saltz L. (2013). A phase II clinical and translational study of MK-2206 in patients with metastatic neuroendocrine tumors (NETs). *Journal of Clinical Oncology*, *31*:15\_suppl, e15133-e15133.
- Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Patel, S. C., Patel, R. C., & Patel, Y. C. (2000). Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5463), 154–157.
- Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Castillejo, J. A., Cervantes, F., Barrios, M., Colomer, D., Heiniger, A., & Torres, A. (2004). The suppressor of cytokine signaling-1 is constitutively expressed in chronic myeloid leukemia and correlates with poor cytogenetic response to interferon-alpha. *Haematologica*, *89*(1), 42–48.
- Roux, P. P., & Topisirovic, I. (2018). Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Molecular and cellular biology*, *38*(12), e00070-18.

- Salazar, R., Garcia-Carbonero, R., Libutti, S. K., Hendifar, A. E., Custodio, A., Guimbaud, R., Lombard-Bohas, C., Ricci, S., Klümper, H. J., Capdevila, J., Reed, N., Walenkamp, A., Grande, E., Safina, S., Meyer, T., Kong, O., Salomon, H., Tavorath, R., & Yao, J. C. (2018). Phase II Study of BEZ235 versus Everolimus in Patients with Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Naïve Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *The oncologist*, *23*(7), 766–e90.
- Samarajiwa, S. A., Forster, S., Auchetl, K., & Hertzog, P. J. (2009). INTERFEROME: the database of interferon regulated genes. *Nucleic acids research*, *37*(Database issue), D852–D857.
- Sawyers C. L. (2006). Will kinase inhibitors have a dark side?. *The New England journal of medicine*, *355*(3), 313–315.
- Schaarschmidt, M. U. (2020). Wirkung des HSP90-Inhibitors AUY922 in Ewing-Sarkomzellen, univ. Diss., Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Shah, T., Hochhauser, D., Frow, R., Quaglia, A., Dhillon, A. P., & Caplin, M. E. (2006). Epidermal growth factor receptor expression and activation in neuroendocrine tumours. *Journal of neuroendocrinology*, *18*(5), 355–360.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F. J., ... Klucher, K. M. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature immunology*, *4*(1), 63–68.
- Somnay, Y., Simon, K., Harrison, A. D., Kunnimalaiyaan, S., Chen, H., & Kunnimalaiyaan, M. (2013). Neuroendocrine phenotype alteration and growth suppression through apoptosis by MK-2206, an allosteric inhibitor of AKT, in carcinoid cell lines in vitro. *Anti-cancer drugs*, *24*(1), 66–72.
- Spreafico, A., Delord, J. P., De Mattos-Arruda, L., Berge, Y., Rodon, J., Cottura, E., Bedard, P. L., Akimov, M., Lu, H., Pain, S., Kaag, A., Siu, L. L., & Cortes, J. (2015). A first-in-human phase I, dose-escalation, multicentre study of HSP990 administered orally in adult patients with advanced solid malignancies. *British journal of cancer*, *112*(4), 650–659.
- Stambolic, V., & Woodgett, J. R. (2006). Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends in cell biology*, *16*(9), 461–466.

- Stanifer, M. L., Pervolaraki, K., & Boulant, S. (2019). Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1445.
- Stark, G. R., & Darnell, J. E., Jr (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, 36(4), 503–514.
- Strosberg, J. R., Chan, J. A., Ryan, D. P., Meyerhardt, J. A., Fuchs, C. S., Abrams, T., Regan, E., Brady, R., Weber, J., Campos, T., Kvolts, L. K., & Kulke, M. H. (2013). A multi-institutional, phase II open-label study of ganitumab (AMG 479) in advanced carcinoid and pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrine-related cancer*, 20(3), 383–390.
- Suire, S., Hawkins, P., & Stephens, L. (2002). Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras. *Current biology : CB*, 12(13), 1068–1075.
- Tannapfel, A., Vomschloss, S., Karhoff, D., Markwarth, A., Hengge, U. R., Wittekind, C., Arnold, R., & Hörsch, D. (2005). BRAF gene mutations are rare events in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *American journal of clinical pathology*, 123(2), 256–260.
- Uri, I., & Grozinsky-Glasberg, S. (2018). Current treatment strategies for patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). *Clinical diabetes and endocrinology*, 4, 16.
- Valentino, J. D., Li, J., Zaytseva, Y. Y., Mustain, W. C., Elliott, V. A., Kim, J. T., Harris, J. W., Campbell, K., Weiss, H., Wang, C., Song, J., Anthony, L., Townsend, C. M., Jr, & Evers, B. M. (2014). Cotargeting the PI3K and RAS pathways for the treatment of neuroendocrine tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(5), 1212–1222.
- Vandamme, T., Beyens, M., de Beeck, K. O., Dogan, F., van Koetsveld, P. M., Pauwels, P., Mortier, G., Vangestel, C., de Herder, W., Van Camp, G., Peeters, M., & Hofland, L. J. (2016). Long-term acquired everolimus resistance in pancreatic neuroendocrine tumours can be overcome with novel PI3K-AKT-mTOR inhibitors. *British journal of cancer*, 114(6), 650–658.
- Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D., & Raymond, E. (2005). mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 16(4), 525–537.
- Vitale, G., de Herder, W. W., van Koetsveld, P. M., Waaijers, M., Schoordijk, W., Croze, E., Colao, A., Lamberts, S. W., & Hofland, L. J. (2006). IFN-beta is a highly potent inhibitor of

- gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell growth in vitro. *Cancer research*, 66(1), 554–562.
- Vlotides, G., Sørensen, A. S., Kopp, F., Zitzmann, K., Cengic, N., Brand, S., Zachoval, R., & Auernhammer, C. J. (2004). SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN- $\alpha$ -induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochemical and biophysical research communications*, 320(3), 1007–1014.
- von Wichert, G., Jehle, P. M., Hoeflich, A., Koschnick, S., Dralle, H., Wolf, E., Wiedenmann, B., Boehm, B. O., Adler, G., & Seufferlein, T. (2000). Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. *Cancer research*, 60(16), 4573–4581.
- Walsh, M. J., Jonsson, J. R., Richardson, M. M., Lipka, G. M., Purdie, D. M., Clouston, A. D., & Powell, E. E. (2006). Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut*, 55(4), 529–535.
- Werner, H., Sarfstein, R., & Bruchim, I. (2019). Investigational IGF1R inhibitors in early stage clinical trials for cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs*, 28(12), 1101–1112.
- Yao, J. C., Fazio, N., Singh, S., Buzzoni, R., Carnaghi, C., Wolin, E., Tomasek, J., Raderer, M., Lahner, H., Voi, M., Pacaud, L. B., Rouyrre, N., Sachs, C., Valle, J. W., Fave, G. D., Van Cutsem, E., Tesselaar, M., Shimada, Y., Oh, D. Y., Strosberg, J., ... RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial (RADIANT-4) Study Group (2016). Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet (London, England)*, 387(10022), 968–977.
- Yao, J. C., Lombard-Bohas, C., Baudin, E., Kvols, L. K., Rougier, P., Ruzniewski, P., Hoosen, S., St Peter, J., Haas, T., Lebwohl, D., Van Cutsem, E., Kulke, M. H., Hobday, T. J., O'Dorisio, T. M., Shah, M. H., Cadiot, G., Luppi, G., Posey, J. A., & Wiedenmann, B. (2010). Daily oral everolimus activity in patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: a phase II trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(1), 69–76.
- Yao, J. C., Shah, M. H., Ito, T., Bohas, C. L., Wolin, E. M., Van Cutsem, E., Hobday, T. J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E. G., Tomassetti, P., Pavel, M. E., Hoosen, S.,

- Haas, T., Lincy, J., Lebwohl, D., Öberg, K., & RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group (2011). Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *The New England journal of medicine*, 364(6), 514–523.
- Yap, T. A., Yan, L., Patnaik, A., Fearen, I., Olmos, D., Papadopoulos, K., Baird, R. D., Delgado, L., Taylor, A., Lupinacci, L., Riisnaes, R., Pope, L. L., Heaton, S. P., Thomas, G., Garrett, M. D., Sullivan, D. M., de Bono, J. S., & Tolcher, A. W. (2011). First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(35), 4688–4695.
- Yu, H., Zhong, X., Gao, P., Shi, J., Wu, Z., Guo, Z., Wang, Z., & Song, Y. (2019). The Potential Effect of Metformin on Cancer: An Umbrella Review. *Frontiers in endocrinology*, 10, 617.
- Zimmermann, S., & Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science (New York, N.Y.)*, 286(5445), 1741–1744.

## 7. Eigenes Schriftenverzeichnis

19 Originalarbeiten

davon 9 als Erstautor

### 7.1 Originalarbeiten als Erstautor

**Zitzmann, K.**, Ailer, G., Vlotides, G., Spoetl, G., Maurer, J., Göke, B., Beuschlein, F., & Auernhammer, C. J. (2013). Potent antitumor activity of the novel HSP90 inhibitors AUY922 and HSP90 in neuroendocrine carcinoid cells. *International journal of oncology*, 43(6), 1824–1832.

PMID: 24100469

IF2018/2019: 3,571

**Zitzmann, K.**, Andersen, S., Vlotides, G., Spöttl, G., Zhang, S., Datta, R., Culler, M., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2013). The novel somatostatin receptor 2/dopamine type 2 receptor chimeric compound BIM-23A758 decreases the viability of human GOT1 midgut carcinoid cells. *Neuroendocrinology*, 98(2), 128–136.

PMID: 23797089

IF2018/2019: 6,804

**Zitzmann, K.**, Vlotides, G., Brand, S., Lahm, H., Spöttl, G., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2012). Perifosine-mediated Akt inhibition in neuroendocrine tumor cells: role of specific Akt isoforms. *Endocrine-related cancer*, 19(3), 423–434.

PMID: 22499437

IF2018/2019: 4,774

**Zitzmann, K.**, de Toni, E., von Rüden, J., Brand, S., Göke, B., Laubender, R. P., & Auernhammer, C. J. (2011). The novel Raf inhibitor Raf265 decreases Bcl-2 levels and confers TRAIL-sensitivity to neuroendocrine tumour cells. *Endocrine-related cancer*, 18(2), 277–285.

PMID: 21317202

IF2018/2019: 4,774

**Zitzmann, K.**, Rüden, J. v., Brand, S., Göke, B., Lichtl, J., Spöttl, G., & Auernhammer, C. J. (2010). Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer letters*, 295(1), 100–109.

PMID: 20356670

IF2018/2019: 6.508

**Zitzmann, K.**, Brand, S., De Toni, E. N., Baehs, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H. H., & Auernhammer, C. J. (2007). SOCS1 silencing enhances antitumor activity of type I IFNs by regulating apoptosis in neuroendocrine tumor cells. *Cancer research*, 67(10), 5025–5032.

PMID: 17510435

IF2018/2019: 8.378

**Zitzmann, K.**, De Toni, E. N., Brand, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H. H., & Auernhammer, C. J. (2007). The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology*, 85(1), 54–60.

PMID: 17310129

IF2018/2019: 6,804

**Zitzmann, K.**, Brand, S., Baehs, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H., & Auernhammer, C. J. (2006). Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 344(4), 1334–1341.

PMID: 16650825

IF2018/2019: 2,705

Brand S\*, **Zitzmann K\***, Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Vlotides, G., Eichhorst, S. T., Göke, B., Diepolder, H., & Auernhammer, C. J. (2005). SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochemical and biophysical research*

*communications*, 331(2), 543–548. \* beide Autoren haben gleichermaßen beigetragen

PMID: 15850793

IF2018/2019: 2,705

## 7.2 Originalarbeiten als Koautor

Vlotides, G., Tanyeri, A., Spampatti, M., **Zitzmann, K.**, Chourdakis, M., Spöttl, C., Maurer, J., Nölting, S., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2014). Anticancer effects of metformin on neuroendocrine tumor cells in vitro. *Hormones (Athens, Greece)*, 13(4), 498–508.

PMID: 25402373

IF2018/2019: 0,78

Diegelmann, J., Beigel, F., **Zitzmann, K.**, Kaul, A., Göke, B., Auernhammer, C. J., Bartenschlager, R., Diepolder, H. M., & Brand, S. (2010). Comparative analysis of the lambda-interferons IL-28A and IL-29 regarding their transcriptome and their antiviral properties against hepatitis C virus. *PloS one*, 5(12), e15200.

PMID: 21170333

IF2018/2019: 2,776

Dambacher, J., Beigel, F., **Zitzmann, K.**, De Toni, E. N., Göke, B., Diepolder, H. M., Auernhammer, C. J., & Brand, S. (2009). The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut*, 58(9), 1207–1217.

PMID: 18483078

IF2018/2019: 17,943

Dambacher, J., Beigel, F., **Zitzmann, K.**, Heeg, M. H., Göke, B., Diepolder, H. M., Auernhammer, C. J., & Brand, S. (2008). The role of interleukin-22 in hepatitis C virus infection. *Cytokine*, 41(3), 209–216.

PMID: 18191408

IF2018/2019: 3,078



Brand, S., Dambacher, J., Beigel, F., **Zitzmann, K.**, Heeg, M. H., Weiss, T. S., Prüfer, T., Olszak, T., Steib, C. J., Storr, M., Göke, B., Diepolder, H., Bilzer, M., Thasler, W. E., & Auernhammer, C. J. (2007). IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 292(4), G1019–G1028.

PMID: 17204547

IF2018/2019: 3,729

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., **Zitzmann, K.**, Eichhorst, S. T., Otte, J. M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkühn, T., Göke, B., Auernhammer, C. J., & Dambacher, J. (2006). IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 290(4), G827–G838.

PMID: 16537974

IF2018/2019: 3,729

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., **Zitzmann, K.**, Eichhorst, S. T., Otte, J. M., Diebold, J., Diepolder, H., Adler, B., Auernhammer, C. J., Göke, B., & Dambacher, J. (2005). IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 289(5), G960–G968.

PMID: 16051921

IF2018/2019: 3,728

Brand, S., **Zitzmann, K.**, Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Vlotides, G., Eichhorst, S. T., Göke, B., Diepolder, H., & Auernhammer, C. J. (2005). SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(2), 543–548.

PMID: 15850793

IF2018/2019: 2,705

Vlotides, G., Sørensen, A. S., Kopp, F., **Zitzmann, K.**, Cengic, N., Brand, S., Zachoval, R., & Auernhammer, C. J. (2004). SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochemical and biophysical research communications*, 320(3), 1007–1014.

PMID: 15240148

IF2018/2019: 2,705

Vlotides, G., **Zitzmann, K.**, Hengge, S., Engelhardt, D., Stalla, G. K., & Auernhammer, C. J. (2004). Expression of novel neurotrophin-1/B-cell stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3) in murine pituitary folliculostellate TtT/GF cells: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide-induced stimulation of NNT-1/BSF-3 is mediated by protein kinase A, protein kinase C, and extracellular-signal-regulated kinase1/2 pathways. *Endocrinology*, 145(2), 716–727.

PMID: 14605001

IF2018/2019: 3,800

### 7.3 Übersichtsartikel / Reviews

**Zitzmann, K.**, Vlotides, G., Göke, B., & Auernhammer, C. J. (2008). PI(3)K-Akt-mTOR pathway as a potential therapeutic target in neuroendocrine tumors. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 3(2), 207–222.

PMID: 30764093

IF2018/2019: 0,42

Auernhammer, C. J., **Zitzmann, K.**, Schnitzler, F., Seiderer, J., Lohse, P., Vlotides, G., Engelhardt, D., Sackmann, M., Goke, B., & Ochsenkuhn, T. (2005). Role of the intracellular receptor domain of gp130 (exon 17) in human inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 11(8), 1196–1199.

PMID: 15754404

IF2018/2019: 3,411

Vlotides, G., **Zitzmann, K.**, Stalla, G. K., & Auernhammer, C. J. (2004). Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(5), 325–336.

PMID: 15450249

IF2018/2019: 5,458

## 8. Danksagung

*Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.*

(Marcus Tullius Cicero)

Getreu dieser Maxime möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, ohne deren Unterstützung die Fertigstellung dieses Habilitationsprojektes nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christoph Auernhammer bedanken, der mich vor vielen Jahren herzlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und in mir die große Begeisterung für Grundlagenforschung im Bereich neuroendokriner Tumore geweckt und immer weiter bestärkt hat. Vom ersten Tag an hat er mir Vertrauen und Anerkennung entgegengebracht, mich mit Wissen und Erfahrung unterstützt ohne mir dabei den Freiraum für eigene Ideen zu nehmen.

Prof. Dr. Burkhard Göke, Direktor der Medizinischen Klinik 2, möchte ich dafür danken, dass er mir stets unterstützend und beratend zur Seite stand. Auch möchte ich ihm und Herrn Prof. Dr. Günter Stalla für die fachmentorielle Betreuung während des Habilitationsverfahrens danken.

Unendlich dankbar bin ich Prof. Dr. Stephan Brand, der stets ein offenes Ohr für Probleme hatte, mich motiviert, gefördert und aus so mancher Notlage gerettet hat.

PD Dr. George Vlotides möchte ich danken für die geduldige Einführung in die Methodik und die vielen wunderschönen, lustigen Stunden, die wir während unserer gemeinsamen Forschungszeit im Labor verbracht haben. Seine Ideen, seine Arbeitsweise und sein Esprit haben mich stets inspiriert.

Prof. Dr. Peter Lohse und Pia Lohse danke ich für die Möglichkeit, zu jeder Tages- und Nachtzeit Sequenzierungen in Ihrem Labor durchführen zu dürfen. Ihr entgegengebrachtes Vertrauen, ihre Großzügigkeit und Ihre netten, aufmunternden Worte werden mir stets in Erinnerung bleiben.

Erfolgreiches wissenschaftliches Arbeiten ist heute ohne ein größeres Team kaum möglich. Daher möchte ich mich bei allen technischen Assistenten, Doktoranden und Kooperationspartnern bedanken, ohne deren Hilfe viele Fragestellungen nicht hätten bearbeitet werden können. Mein besonderer Dank gilt hierbei Jennifer Lichtl und

Gerald Spöttl, die mit Fleiß und Zuverlässigkeit zum Gelingen zahlreicher Projekte beigetragen haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meine Eltern haben mich stets unterstützt und mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht - sie haben damit den Grundstein für dieses Habilitationsprojekt gelegt. Dafür bin ich Ihnen unendlich dankbar.

Besonderer Dank gilt dabei meiner Mutter, die viele, viele Stunden die Kinder betreut und mir damit ermöglicht hat, die Habilitationsschrift doch noch fertigzustellen.

Der letzte Dank gilt meinem Mann Stefan sowie meinen Kindern Emma, Lotta und Oskar, die oft Rücksicht nehmen mussten. Für die aufgebrachte Geduld und den nötigen Rückhalt danke ich Ihnen von ganzem Herzen.