

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele**

**Der Einfluss der Wnt-Modulatoren Quercetin und Lithiumchlorid auf die Expression  
von Somatostatinrezeptoren und CXCR4 in Zelllinien neuroendokriner Tumoren**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Melissa Edith Renate Peschka**

**aus Aschaffenburg**

**Würzburg, Januar 2023**

Referent: Prof. Dr. med. Michael Scheurlen

Korreferent bzw. Korreferentin: Priv. Doz. Dr. med. Rudolf Werner

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2023

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Neuroendokrine Neoplasien .....	1
1.1.1. Epidemiologie .....	1
1.1.2. Klassifikation .....	1
1.1.3. Diagnose.....	2
1.1.4. Klinische Präsentation .....	2
1.1.5. Therapie.....	3
1.1.6. Rezeptorexpression der GEP NET/NEC .....	5
1.1.7. Somatostatinrezeptoren.....	5
1.1.8. CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4.....	6
1.2. Wnt-Signalweg.....	7
1.2.1. Die Wnt-Signaltransduktion .....	7
1.2.2. Wnt-Aktivierung bei malignen Erkrankungen und GEP-NET.....	8
1.3. Der Wnt-Inhibitor Quercetin .....	9
1.4. Der Wnt-Aktivator Lithiumchlorid .....	10
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden .....	12
2.1. Material .....	12
2.1.1. Geräte .....	12
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.3. Chemikalien .....	15
2.1.4. Fertigsätze .....	17
2.1.5. Standardlösungen.....	18

2.1.6.	Antikörper .....	19
2.1.7.	Enzyme .....	21
2.1.8.	Zelllinien.....	21
2.2.	Versuchsaufbau .....	21
2.2.1.	Zellkultur .....	21
2.2.2.	Zellzählung .....	22
2.2.3.	Zelllinien.....	22
2.2.4.	Zellkulturversuche.....	22
2.3.	Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.3.1.	Aussaat und Ernte der Zellen .....	23
2.3.2.	RNA-Isolation.....	23
2.3.3.	RNA-Messung .....	23
2.3.4.	cDNA-Synthese .....	23
2.3.5.	Housekeeping-Gen.....	24
2.3.6.	Real-Time-PCR .....	24
2.4.	SDS-Page und Western Blot .....	25
2.4.1.	Aussaat und Ernte der Zellen .....	25
2.4.2.	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA).....	26
2.4.3.	Vorbereitung der Gele und Gelelektrophorese .....	26
2.4.4.	Elektroblot und Blocken .....	27
2.4.5.	Färbung und Entwicklung .....	27
2.4.6.	Beta-Actin Färbung.....	28
2.5.	Immunhistochemie.....	28
2.5.1.	Aussaat und Ernte der Zellen .....	28
2.5.2.	Zytospins .....	28
2.5.3.	Färben .....	28

2.5.4.	Mikroskopie und Fotografie .....	30
2.6.	Statistische Auswertung.....	30
3.	Ergebnisse .....	31
3.1.	Effekt einer Wnt-Modulation auf Somatostatinrezeptoren .....	31
3.1.1.	Effekt von Quercetin auf die SSTR.....	31
3.1.2.	Effekt von Lithiumchlorid auf die SSTR .....	35
3.2.	Effekt einer Wnt-Modulation auf CXCR4 .....	37
3.2.1.	Effekt von Quercetin auf CXCR4 .....	37
3.2.2.	Effekt von Lithiumchlorid auf CXCR4 .....	39
4.	Diskussion.....	41
4.1.	Methodendiskussion .....	42
4.2.	Diskussion der Ergebnisse .....	44
4.2.1.	Einfluss der Wnt-Modulation auf die SSTR .....	44
4.2.2.	Einfluss der Wnt-Modulation auf CXCR4.....	46
4.2.3.	Einordnung des Effekts von Quercetin .....	47
4.2.4.	Einordnung des Effekts von Lithiumchlorid.....	49
4.2.5.	Einordnung der Ergebnisse .....	51
5.	Zusammenfassung.....	53
6.	Literaturverzeichnis .....	54
I	Abkürzungsverzeichnis.....	1
II	Abbildungsverzeichnis .....	1
III	Tabellenverzeichnis .....	3
IV	Danksagung .....	5

# 1. Einleitung

## 1.1. Neuroendokrine Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) sind eine heterogene Gruppe epithelialer Neubildungen, die in verschiedenen Organen des menschlichen Körpers auftreten können. Sie entwickeln sich aus den Zellen des neuroendokrinen Systems und unterscheiden sich je nach Lokalisation und Biologie stark in Genese, Pathologie, Klinik, Dignität und Prognose (Kim and Hong 2016). Zwei Drittel aller NEN entstehen im Gastrointestinaltrakt und Pankreas. Dies sind die Gastroenteropankreatischen Neuroendokrinen Neoplasien (GEP NEN) (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015).

### 1.1.1. Epidemiologie

In den letzten drei Jahrzehnten ist eine ständig steigende Prävalenz und Inzidenz der NEN zu verzeichnen. Durch verbesserte Diagnostik und veränderte Diagnosekriterien (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015) lässt sich die Gesamtprävalenz aller NEN mittlerweile auf 35/100.000 Einwohner beziffern. Die jährlichen Inzidenz liegt bei 5,25/100.000 Einwohner. Abhängig von Differenzierungsgrad, Lokalisation und Ausbreitung des Tumors liegt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 14% und 93% (Yao et al. 2008).

### 1.1.2. Klassifikation

Die Weltgesundheitsorganisation veröffentlichte 2010 überarbeitete Kriterien zur Klassifikation und Diagnostik von GEP NEN. Danach erfolgt eine Einteilung durch die Einschätzung des histologischen Differenzierungsgrades der Mitoserate und der Proliferationsrate anhand des Ki67-Index (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015). Dieser zeigt über eine Färbung des Proteins Ki67 die mitosefähigen Zellen ab Mitte der G1-, der S- und der G2-Phase (Garg et al. 2019).

Man unterscheidet die gut differenzierten G1 Tumoren mit niedrigem Proliferationsgrad und einem Ki67-Index von unter 2% und den gut differenzierte G2 Tumoren mit einem höheren Proliferationsgrad und einem Ki67-Index zwischen 2 und 20%. G3 Tumoren mit einem Proliferationsgrad und einem Ki67-Index von mehr als 20 werden als neuroendokrinen Karzinomen (NEC) bezeichnet. Bei Letzteren handelt es sich um hochproliferative (Ki67-Index >20%), schlecht differenzierte, klein- oder großzellige Tumoren (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015). Der hohe Proliferationsgrad und die

schlechte Differenzierung gehen mit einer schlechten Prognose einher (Rinke and Gress 2017). Allerdings hat diese Klassifikation Schwächen. Es scheint Tumorsubgruppen zu geben deren Prognose nicht adäquat eingeschätzt werden kann. Es fehlen zusätzliche molekularbiologische Marker, welche die bessere Charakterisierung der heterogenen Tumorgruppe von G3-NEN ermöglichen (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015).

### 1.1.3. Diagnose

Die Diagnostik eines Gastroenteropankreatischen Neuroendokrinen Tumors (GEP NET) umfasst, abhängig von der klinischen Präsentation, spezifische laborchemische Untersuchungen, die Detektion der Tumorlokalisationen (Staging) und die histopathologische Aufarbeitung von Biopsie- bzw. Tumormaterial. Lokalisation und Ausdehnung des Tumors werden durch verschiedene bildgebende Verfahren ermittelt. Zu nennen ist die Sonographie des Abdomens, die Endoskopie und Endosonographie, die kontrastmittel-verstärkte Computertomographie und Kernspintomographie (A. Rinke, 2014) sowie bei gut differenzierten Tumoren die Positronenemissionstomographie (PET) in Form der Gallium 68 markierten DOTA(0)-Phe(1)-Tyr(3)-octreotid ( $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTATOC) PET. Das Verfahren funktioniert über die bildliche Darstellung der Bindung eines Tracers an die Oberfläche der NEN (Kjaer and Knigge 2015).

Die Diagnose eines NET wird histologisch aus einer Gewebeprobe gesichert. Dabei muss der Differenzierungsgrad des Tumors durch Immunfärbungen der Proliferationsmarker Ki67 oder M1B1/MIB1 bestimmt werden (Grading). Zusätzlich erfolgen Färbungen zur Detektion der neuroendokrinen Markerproteine Chromogranin A, Synaptophysin, CD56, Serotonin (A. Rinke, 2014) und von Lokalisationsmarkern wie TTF-1, CDX2 und Islet-1 (Srivastava and Hornick 2009).

Weiter wird der SSTR2-Rezeptorstatus bestimmt. Es können auch Untersuchungen zur Darstellung einer Expression spezifischer Hormone folgen. Bei Diagnosestellung sollte außerdem die Bestimmung der Tumormarker Chromogranin A und neuronenspezifische Enolase (NSE) im Plasma durchgeführt werden, da diese Parameter mit der Tumormasse korrelieren und zur Verlaufsbeurteilung herangezogen werden können (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015).

### 1.1.4. Klinische Präsentation

Klinisch kann zwischen endokrin aktiven und inaktiven Tumoren unterschieden werden. Hormonell inaktive Tumoren sind meist Zufallsbefunde oder fallen durch ihre

raumfordernde Wirkung bzw. durch klinische Allgemeinsymptome auf (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015).

Im Gegensatz dazu stehen die hormonell aktiven Tumoren. Sie können sporadisch oder im Rahmen hereditärer Erkrankungen, wie dem Multiple Endokrine Neoplasien-1 (MEN-1) Syndrom, dem von Hippel-Lindau-Syndrom, der Neurofibromatose 1 oder der Tuberösen Sklerose auftreten und machen durch einen Hormonexzess und dessen Folgen auf sich aufmerksam. Beispielhaft sind unter anderem das Karzinoidsyndrom, das Zollinger-Ellison-Syndrom und das Verner-Morrison-Syndrom zu nennen (Belei et al. 2017) (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015).

Ein Karzinoidsyndrom manifestiert sich typischerweise im Rahmen eines intestinalen NET in Form von Flushing der Haut, abdominellen Krämpfen und Diarrhö. Auslösend für diese Symptomatik sind vasoaktive Substanzen wie Serotonin, Bradykinin, Histamin, Prostaglandine oder Polypeptidhormone (Lawrence et al. 2010).

Das Zollinger-Ellison-Syndrom, ausgelöst durch ein Gastrinom, zeichnet sich durch eine Hypergastrinämie, gastroduodenale Ulzera und Diarrhö aus. Hormonaktive, meist benigne Insulinome sind durch Hypoglykämien als Folge einer Hyperinsulinämie charakterisiert (Lodish et al. 2008).

NEN können in jedem Organ mit neuroendokrinen Zellen auftreten. Für Gastroenteropankreatische NEN stellen Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum, Appendix, Colon, Rektum und Pankreas mögliche Lokalisationen dar (Uccella, Sessa, and La Rosa 2015).

#### 1.1.5. Therapie

Zur Behandlung von NET und NEC gibt es verschiedene pharmakologische, chirurgische und interventionelle Therapieoptionen.

Die medikamentösen Therapiemaßnahmen umfassen die Biotherapie mit Somatostatinanaloga (SSA), Interferon- $\alpha$  und molekular zielgerichtete Therapien mit Sunitinib und Everolimus. Dabei nimmt Interferon mittlerweile aufgrund des ungünstigeren Nebenwirkungsprofils und der zunehmenden Verfügbarkeit besserer Alternativen eine nachgeordnete Stellung ein.

Weiter kann eine symptomatische Behandlung des Karzinoid-Syndroms mit dem Serotonin-Synthesehemmer Telotristat Etiprat erfolgen.

Eine wichtige und spezifische Therapieform stellt die Peptidrezeptor-basierte Radiotherapie (PRRT) dar. Dabei wird ein Radiopharmakon mit einem beta-strahlendem



Isotop und spezifischer Bindungsaffinität für die Somatostatinrezeptoren (SSTR) 2a und 5 eingesetzt (A. Rinke, 2014).

Die Therapie mit den SSA Octreotid und Lanreotid hat in den letzten Jahren an Bedeutung für den klinischen Alltag gewonnen und wird bei gut differenzierten NEN wegen ihrer spezifischen Wirkung und guten Verträglichkeit primär eingesetzt. Diese Pharmaka imitieren das Peptidhormon Somatostatin und binden an die Somatostatinrezeptoren (2a und 5). Die meisten gut differenzierten GEP-NET exprimieren diese Rezeptoren stark (Kaemmerer et al. 2015). Eine hohe SSTR2a- und SSTR5- Expression kann als Angriffspunkt für eine rezeptorbasierte Therapie dienen. Dedifferenzierte, hochproliferative NEC exprimieren diese Rezeptoren meist bedeutend weniger (Rinke and Gress 2017).

SSA besetzen SSTR, welche als G-Protein wirken, eine Reihe von Signalkaskaden in Gang setzen und schlussendlich eine verminderte Hormonsekretion der NET bewirken (Alonso-Gordoa, Capdevila, and Grande 2015). So eignen sie sich zur symptomatischen Therapie von funktionellen Tumoren (Wolin 2012). Ein antiproliferativer Effekt von SSA ist bekannt (Caplin et al. 2016). Die PROMID und CLARINET Studie konnten zeigen, dass das Wachstum des Tumor gestoppt und ein verlängertes progressionsfreies Überleben erreicht werden kann (Rinke et al. 2009; Rinke et al. 2017; Caplin et al. 2014). Die gesteigerte Expression von SSTR in NET macht sich auch die PRRT zunutze. Durch die Verwendung der Radiopharmaka Lutetium 177 markiertes DOTA(0)-Tyr(3)-octreotid ( $[^{117}\text{Lu}]\text{Lu-DOTATATE}$ ) und Lutetium 177 markiertes DOTA(0)-Phe(1)-Tyr(3)-octreotid ( $[^{117}\text{Lu}]\text{Lu-DOTATOC}$ ), welche die höchste Bindungsaffinität an SSTR2a haben, kann eine Radiotherapie erfolgen. Nach Bindung an den SSTR wird das Radiopharmakon internalisiert und wirkt zytoreduktiv auf die Tumorzellen. Außerdem wird eine Symptomreduktion bei funktionell aktiven Tumoren und eine Schmerzreduktion bei Knochenmetastasen erreicht. Die NETTER-1 Studie zeigte, dass PRRT eine wirkungsvolle Therapiemöglichkeit für inoperable und metastasierte, gut differenzierte Tumoren darstellt (Strosberg and Krenning 2017). Allerdings sind auch unerwünschte Wirkungen der PRRT wie zB. Nephro- und Myelotoxizität bekannt. Gelegentlich kann es unter der Behandlung zu einer Exazerbation der endokrinen Symptomatik kommen (Severi et al. 2017).

Welches Therapieverfahren zum Einsatz kommt, ist von der Ausbreitung, der Lokalisation, dem Differenzierungsgrad und der Proliferationsrate des Tumor abhängig (Uri and Grozinsky-Glasberg 2018).

So wird bei lokalisierten und operativ resezierbaren Tumoren eine chirurgische R0 Resektion angestrebt. Dies stellt die einzige kurative Therapieoption dar. Da bei Diagnosestellung häufige bereits eine Metastasierung stattgefunden hat, muss dann auf andere Therapiemöglichkeiten zurückgegriffen werden (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018) (Uri and Grozinsky-Glasberg 2018).

Eine SSA-Therapie ist, abhängig von der Rezeptorexpression, vor allem bei G1 und G2 Tumoren als primäre Behandlungsmethode etabliert. Bei Tumorprogression kann auf eine PRRT, eine Therapie mit Everolimus oder lokal ablativ Verfahren eskaliert werden. Für die Therapie mit SSA ist die Expression von SSTR durch den Tumor Voraussetzung. Ein Verlust der Expression dieser Rezeptoren in den Tumorzellen stellt für die Langzeittherapie differenzierter NET ein Problem dar (Alonso-Gordoa, Capdevila, and Grande 2015).

Bei G3 Tumoren mit hohem Metastasierungspotential stößt eine Therapie mit SSA wegen ihrer zu geringen wachstumshemmenden Wirkung und der meist bereits primär zu geringer SSA-Rezeptorexpression ebenfalls an ihre Grenzen, es muss auf andere Therapiemaßnahmen ausgewichen werden. Hier bieten zytostatische Chemotherapeutika meist die einzig sinnvolle Möglichkeit zur Tumorkontrolle (Uri and Grozinsky-Glasberg 2018).

#### 1.1.6. Rezeptorexpression der GEP NET/NEC

Wie oben bereits ausgeführt, stellt die Expression von Somatostatinrezeptoren ein wichtiges Charakteristikum der GEP-NET dar (Hankus and Tomaszewska 2016).

Außerdem exprimieren GEP-NET den CXCR4, welcher zur Gruppe der Chemokinrezeptoren gehört und beim Menschen vor allem in malignen Tumoren und physiologisch in Zellen des hämatopoetischen Systems zu finden ist (Peng et al. 2018).

#### 1.1.7. Somatostatinrezeptoren

Somatostatinrezeptoren sind G-Proteine welche die Peptidhormone Somatostatin-14 und Somatostatin-28 binden (de Herder et al. 2003).

Man unterscheidet zwischen den verschiedenen Subtypen SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 und SSTR5. Die SSTR1 und SSTR4 sind vor allem im Zytoplasma zu finden. Von klinisch größerer Bedeutung sind die SSTR2a und SSTR5. Beide kommen in der

Plasmamembran vor (de Herder et al. 2003) und bieten einen Angriffspunkt für Diagnostik und Therapie der GEP NET (Caplin et al. 2016). Im Menschen wird die Isoform SSTR2a des SSTR2 exprimiert. Diese SSTR bestehen aus 364 bzw. 418 Aminosäuren und sind physiologischerweise in verschiedenen Organen und unterschiedlichen zellulären Kompartimenten zu finden. Sie kommen beispielsweise im Gehirn, im Hypophysenvorderlappen, auf Inselzellen des Pankreas und im Gastrointestinaltrakt vor (Gunther et al. 2018).

Sie aktivieren Signalwege welche zu einer reduzierten exokrinen und endokrinen Sekretion sowie zum Zellzyklusarrest und Proliferationsstopp führen (Alonso-Gordo, Capdevila, and Grande 2015).

Verschiedene Tumoren können SSTR exprimieren. Zu diesen zählen neben den NET v.a. Paragangliome, Phäochromozytome, kleinzellige Lungenkarzinome, medulläre Schilddrüsenkarzinome und Hypophysenadenome (Hankus and Tomaszewska 2016).

Das Ausmaß der SSTR2-Expression korreliert in gut differenzierten GEP-NET mit der Dauer des Überlebens der Patienten. Dies konnte für andere SSTR nicht bestätigt werden. Die SSTR2-Expression eines NET gilt aktuell per se nicht als Prognosemarker (Qian et al. 2016). Allerdings ist eine zunehmende Entdifferenzierung, welche sekundär mit dem Verlust von SSTR2 einhergeht, mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Yao et al. 2008) (Kaemmerer et al. 2015).

SSTR sind ein zentraler Angriffspunkt in der Therapie gut differenzierter NET (Kaemmerer et al. 2015).

In GEP NET können vor allem SSTR1, SSTR2 und SSTR5 nachgewiesen werden. SSTR2 wird von 80% der pankreatischen und gastrointestinalen NET gebildet und ist damit der am häufigsten nachgewiesene Rezeptor (Hankus and Tomaszewska 2016).

#### 1.1.8. CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4

Beim CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) handelt es sich ebenfalls um ein G-Protein.

Die CXCL12/ CXCR4- Achse ist am Ablauf verschiedener biologischer Prozesse wie z.B. der Immunantwort und Inflammation, der Regulation der hämatopoetischen Stammzellmigration und der Embryonalentwicklung beteiligt. Pathologische Effekte betreffen die Funktion als essenzieller Co-Rezeptor für den Eintritt des Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Wirtszellen. Außerdem findet eine Mitwirkung bei

Tumormigration und Metastasierung sowie in der Pathogenese zerebrovaskulärer und myokardialer Ischämien statt. In vielen dieser Pathologien werden CXCR4-Antagonisten als potenzieller Therapieansatz diskutiert (Peng et al. 2018).

Der CXCR4 besteht aus 352 Aminosäuren, angeordnet in sieben Transmembrandomänen, mit je drei intra- und drei extrazellulären Verbindungsloops. Ein kurzer, extrazellulär gelegener N-Terminus sorgt für eine negative Ladung, welche essenziell für die Bindung eines Liganden ist. Ein intrazelluläres C-terminales Ende sorgt für die Aktivierung des G-Proteins.

Durch die Bindung von CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12), des einzigen endogenen Chemokinliganden, an CXCR4, kommt es zu einer Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden (Chatterjee, Behnam Azad, and Nimmagadda 2014).

Während bei neuroendokrinen Tumoren mit zunehmender Entdifferenzierung die Expression von SSTR2a sinkt, nimmt die Expression von CXCR4 tendenziell zu. Kaemmerer et al. zeigten, dass die Expression von SSTR2a auf G1 Tumoren zwischen 70 und 100% liegt, von CXCR4 hingegen bei nur etwa 6%. In G3 Tumoren war nur in 23% der Fälle SSTR2a zu finden. Gegenätzlich dazu wurde CXCR4 immunhistochemisch bei ca. 50% der G3 Tumoren nachgewiesen (Kaemmerer et al. 2015).

## 1.2. Wnt-Signalweg

### 1.2.1. Die Wnt-Signaltransduktion

Die auto- und parakrine Wnt-Signaltransduktion spielt im menschlichen Organismus bei der Embryogenese, bei chronisch entzündlichen Erkrankungen sowie in der Pathogenese verschiedener Tumoren eine entscheidende Rolle.

Es werden drei verschiedene Wnt-Signalwege unterschieden, zwei Varianten der „Nicht-Kanonischen Signaltransduktion“ und die „Kanonische Signaltransduktion“.

Die nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktion erfolgt über den JNK/API abhängigen PCP-Signalweg und den PKC/CAMKII/NFAT abhängigen Wnt/Kalzium-Signalweg. Der kanonische und nicht-kanonische Wnt-Signalweg können sich gegenseitig regulieren.

In dieser Arbeit wird der  $\beta$ -Catenin abhängige kanonische Signalweg untersucht.

Bei Inhibition bzw. Inaktivität des Signalweges kann der aktivierte Komplex aus GSK-3, APC (Adenomatous Polyposis Coli) und Axin das Protein  $\beta$ -Catenin phosphorylieren und

dadurch zur Ubiquitinierung markieren. So kommt es zur Degradierung und Abnahme der Konzentration von  $\beta$ -Catenin im Zytosol.

Bindet ein Wnt-Ligand an die sieben Transmembrandomänen des Frizzled Rezeptors, kommt es, zusammen mit dem Co-Rezeptor LRP6, zur Bildung des Wnt-Fz-LRP6-Komplexes. Dieser phosphoryliert und aktiviert das Dishevelled Protein, welches wiederum die GSK-3 phosphoryliert und damit inhibiert. Dies hat zur Folge, dass  $\beta$ -Catenin nicht mehr durch das Proteasom abgebaut wird, sondern in Zytosol und Nukleus angehäuft wird. Nukleär bildet sich ein Transkriptionskomplex aus  $\beta$ -Catenin, dem T-Zell-Faktor (TCF) und Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF 1) welcher für eine verstärkte Transkription von *MYC*, *CCDN1* und weiterer Gene sorgt (Pongracz and Stockley 2006).

### 1.2.2. Wnt-Aktivierung bei malignen Erkrankungen und GEP-NET

Die Wnt-Signaltransduktion in malignen Tumoren ist häufig aktiviert und begünstigt die Tumorprogression (Pongracz and Stockley 2006). Ein aktivierter Wnt-Signalweg ermöglicht durch Entdifferenzierung humaner Zellen zu Tumorstammzellen die Karzinogenese. Weiteres Wachstum, Invasion und Metastasierung folgen (Kim et al. 2017).

Kim et al zeigten in NEN eine pathologisch aktivierte Wnt-Signalübertragung, welche durch die Expression verschiedener Zielgene zum Fortschreiten der Tumorerkrankung beiträgt und Auswirkung auf die Prognose der Erkrankung haben dürfte (Kim et al. 2013). Zimmermann et. al. konnten in GEP-NET in 80% der Fälle neben zahlreichen anderen Mutationen auch eine Wnt-Aktivierung nachweisen (Zimmermann et al. 2018).

Neben der Wnt- Signalkaskade existieren in GEP NET noch weitere für Pathogenese und Therapie relevante molekulare Signalwege (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018).

Von besonderer Bedeutung ist hier der PI3K-Akt-mTOR Signalweg, welcher bei gesteigerter Aktivität zu fehlerhaften Reparaturmechanismen bei Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Doppelstrangbrüchen und zur Radio- und Chemotherapieresistenz führt. Everolimus nutzt diesen Signalweg als Target.

Zahlreiche weitere Signalwege sind in GEP NET erforscht und werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit erläutert (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018).

Bisher liegen wenige Daten vor, ob und wie die Wnt-Signalgebung auf die Rezeptorexpression von SSTR und CXCR4 in GEP-NET Zelllinien wirkt.

Für eine Reihe von Substanzen ist ein pharmakologisch nutzbarer Effekt auf die Wnt-Signaltransduktion beschrieben, der auch therapeutisch genutzt werden könnte. In der vorliegenden Arbeit werden die folgenden Substanzen untersucht.

### 1.3. Der Wnt-Inhibitor Quercetin

Quercetin ist ein Flavonol aus der Gruppe der Flavonoide. Durch sein natürliches Vorkommen in pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Gemüse und Früchten ist es mit einer durchschnittlichen Tageszufuhr von etwa 25 mg ein Bestandteil der menschlichen Ernährung. Nach Ingestion werden Flavonoide biologisch aktiv (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019).

Flavonoide sind für eine Vielzahl an positiven Effekten auf die menschliche Gesundheit bekannt. Die zugrundeliegenden Prozesse hierfür sind momentan nur in Teilen erforscht. Quercetin gilt als antioxidativ, antimutagen und antikarzinogen. Bei einer Einnahme von Flavonoiden in hohen Mengen wurde eine zytotoxische Wirkung beschrieben (Panche, Diwan, and Chandra 2016).

Auf zellulärer Ebene wirkt Quercetin über die Inhibition der Signalwege PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK1/2 und Wnt/ $\beta$ -Catenin (Kumar et al. 2020).

Es bewirkt in Tumorzellen die Induktion von Differenzierung, Apoptose und Autophagie unter anderem durch die Inhibition des Wnt-Signalwegs (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019).

In Kolonkarzinomzellen wurde gezeigt, dass Quercetin über Wnt-Inhibition die nukleäre Konzentration von  $\beta$ -Catenin und TCF senkt. Außerdem stört es deren Komplexbildung und die Bindung an die DNA als Transkriptionsfaktor. Die Transkriptionsaktivität des TCF/LEF-Komplexes wird reduziert, und die Expression verschiedener Zielgene wie *TCF*, *LEF-1*, *MYC* und *CCDN1* sinkt (Park et al. 2005).

Die Untersuchung der Zielgene lässt es zu, die Aktivität des Wnt-Wegs zu überprüfen (Kim et al. 2017). Zwar ist bekannt, dass die Zielgene des Wnt-Wegs auch über andere Mechanismen als die Aktivierung des Wnt-Signalweges transkribiert werden können (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018), jedoch hat sich die Beobachtung der Wnt-Zielgene als Möglichkeit etabliert, die Wnt-Aktivität zu bestimmen (Pongracz and Stockley 2006; Kim et al. 2013; Pai et al. 2017; Aristizabal Prada and Auernhammer 2018).

Außerdem wird eine Reduktion der VEGF (vaskular endothelial growth factor) -Sekretion und der Matrix Metalloproteinase-Konzentration induziert, die bei der malignen Transformation eine entscheidende Rolle spielen. Durch Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs werden Enzyme der Glykolyse und der Glucose Aufnahme in Tumorzellen gestört. Zudem wird durch eine direkte Wirkung auf Mitochondrien in Tumorzellen Apoptose induziert (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019).

Es konnten eine antikanzerogene Wirkung von Flavonoiden und Quercetin gezeigt werden (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019).

#### 1.4. Der Wnt-Aktivator Lithiumchlorid

Seit 1949 sind Lithiumsalze integraler Bestandteil der Therapie bipolarer affektiver Störungen. Allerdings besitzen sie eine geringe therapeutische Breite und potenziell relevante Nebenwirkungen. Lithiumchlorid (LiCl) stimuliert den Natrium-Kalium Membrantransporter. Dieser aktiviert die kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalkaskade über eine Inhibition von GSK3 und des IP/PKC Signalweges (Hart 2016) (Jope 2003).

Durch eine Akkumulation von unphosphoryliertem  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und Nucleus kommt es zu einer gesteigerten Expression der Wnt-Zielgene (Galli et al. 2013).

#### 1.5. Zielsetzung der Arbeit

In Voruntersuchungen unserer Forschungsgruppe wurde gezeigt, dass durch die Behandlung von GEP-NET Zelllinien mit dem Wnt-Inhibitor 5-aza-CdR eine gesteigerte Expression der Somatostatinrezeptoren in GEP-NET Zelllinien erzielt wird. Ebenso zeigte sich eine Reduktion der CXCR4 – Expression. (Weich et al. 2023)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Quercetin als ein verglichen mit 5-aza-CDR weniger nebenwirkungsreicher Wnt-Inhibitor, welcher für die klinische Anwendung in Frage kommen kann, ähnliche Effekte erzielen kann. Bei Reproduzierbarkeit der Daten nach Behandlung mit Quercetin kann die Modulation des Wnt- Signalwegs als Ursache für die Effekte auf die neuroendokrinen Tumorzelllinien angenommen werden.

Ziel der Arbeit war es, die Wirkung des Wnt- Inhibitors Quercetin und des Wnt-Aktivators Lithiumchlorid auf die Expression von Somatostatinrezeptoren und CXCR4 in den neuroendokrinen Tumorzelllinien QGP-1 und BON-1 anhand einer Real-time PCR, eines

Western Blots sowie einer Immunhistochemie auf mRNA- und auf Proteinebene zu untersuchen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Akku-Pipette accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Autoklav	Fedegari, Pavia, Italien
Blottingkammer MINIPRO-TEAN II	BioRad Laboratories, München, Deutschland
CO2 Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
DeNovix DS-11 FX Spectrophotometer/Fluorometer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland Logos
Elektrophoresegerät power pac 200	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Elektrophoresekammer MINI PROTEAN II	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Eppendorf Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feuchte Kammer	Spezialanfertigung
Fluoreszenz-Mikroskop HS BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH, Neu Isenburg, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -70°C Hera freeze	Heraeus, Hanau, Deutschland
Heizblöcke	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Heizmagnetrührer IkaMagReo	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland

Imager 600	Amersham Life Science Ltd., Little Chalfont, UK
Kipprollmischer	Sunlab, Mannheim, Deutschland
Kühlschrank 7°C glassline	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laborabzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Life Touch Thermal Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Luna FL Dual Fluorescence cell counter	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland Logos
Mikroskop Leica DM IL	Leica, Bensheim, Deutschland
N2-Behälter	Taylor-Wharton, Husum, Deutschland
pH-Meter	InoLab, WTW, Weilheim, Deutschland
Rüttler IKA-Vibrax VXR	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Synergy™ HT Multi-detection microplate reader	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Tiefkühlzentrifuge Biofugefresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschall Sonoplus GM70	Bandelin, Berlin, Deutschland
ViiA 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Vortexer Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, CH

Waage	Sartorius laboratory, Göttingen, Deutschland
Wärmeschrank 70°C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Häningsen, Deutschland

*Tabelle 1: Geräte*

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
384-well Multiply PCR-Plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger	Langenbrinck, Berlin, Deutschland
Deckgläser	Marienzell, Lauda-Königshofen, Deutschland
Adhäsiv PCR-Folie	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blottingmembran Immobilon Transfer Membranes	Millipore, Billerica MA, USA
Combitips Plus (5ml, 10ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filtro Pur S 0,s	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Finnpipette (4; 25µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Frischhaltefolie	Toppits, Minden, Deutschland
Gelladepipetten 200µl MultiFlex Round	Sorenson™ BioSciences, Inc., Salt Lake City UT, USA
Glaspasteurpipetten, 225 mM	Brand, Wertheim, Deutschland
Kulturflaschen Cellstar, 25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Mikrotiterplatte Cellstar (6-, 12-, 24-, 96-well)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Original Perfusor Syringe 50ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S. (0,1-20; 2-200; 50-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional, Kimtech Science, Koblenz-Rheinhafen, Deutschland
Reaktionsgefäße 50ml 15ml 2ml 1,5ml 0,2ml Micro AmpReaction Tube	Cellstar Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Serological Pipette, steril (5ml, 10ml, 25ml,50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
WhatmanFilterpapier Whatman Absorbent Protector Sheets	Whatman International Ltd., Maidstone, UK
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

### 2.1.3. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
30% Acrylamid/Bis Solution 37,5:1	BioRad Laboratories, München, Deutschland
APS 10%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aqua dest. Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Butanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
DAB	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's PBS	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethanol abs.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FBS Superior	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lauryl Sulfate (SDS, Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Methanol 100%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mineral Oil	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pen-Strep (5000 Units/ml Penicillin; 5000 µg/ml Streptomycin)	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Quick Start BSA Standard	BioRad Laboratories, München, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

TrisBase	Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland
Trockenmilchpulver	Fluka-Biochemika, Buchs, Schweiz
Trypanblau0,4%	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 3: Chemikalien

#### 2.1.4. Fertigsätze

Fertigsätze	Hersteller
ABsolute Q PCR Mix	Thermo-Scientific, Hamburg, Deutschland
Blotting-Grade Blocker Nonfat Dry Milk	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Clarity™ Western ECL Blotting Substrates	BioRad Laboratories, München, Deutschland
DNA, RNA and protein purification	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Laemmli Sample Buffer 2x	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Nuclease free water	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoSpin®RNA, RNA Isolation Kit	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo-Scientific, Hamburg, Deutschland
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Protease Inhibitor Solution	Qiagen, Hilden, Deutschland

RIPA-Buffer	Thermo-Scientific, Hamburg, Deutschland
Target Retrieval Solution	Dako, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Fertigsätze

### 2.1.5. Standardlösungen

Standardlösung	Zusammensetzung		
Dry Milk-Blocking Buffer, 5%	25 g	Dry Milk	
	Ad50 ml	TBS, 1x	
PBS, 1x	36 g	NaCl	
	7,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	2,15 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	5 l	ddH <sub>2</sub> O	
	2,5 g	BSA	
Reservoir Buffer, 10x	30,2 g	TrisBase	
	145,3 g	Glycin	
	100 ml	SDS (10% in H <sub>2</sub> O)	
	ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O	
Reservoir Buffer, 1x	100 ml	Reservoir Buffer, 10x	
	900 ml	ddH <sub>2</sub> O	
RIPA Buffer + Zusätze	100 ml	RIPA Buffer	
	1 ml	Protease Inhibitor Solution	
Running Buffer, 4x,	90,8 g	TrisBase	
	40 ml	SDS (10% in H <sub>2</sub> O)	
	500 ml	ddH <sub>2</sub> O	
		mittels 5N HCl erfolgt die pH Einstellung auf 8,8	
Running Gel (12,5% Gel für 2 Minigele)	9,0 m	Acrylamid (30%)	
	4,5 ml	Running Buffer, 4x	
	4,5 ml	ddH <sub>2</sub> O	
	110 µl	APS	
	13 µl	TEMED	

Stacking Buffer, 4x	30,2 40 500	g ml ml	TrisBase SDS (10% in H <sub>2</sub> O) ddH <sub>2</sub> O mittels 5N HCl erfolgt die pH-Einstellung auf pH 6,8
Stacking Gel	1,0 1,5 3,5 90 9	ml ml ml µl µl	Acrylamid Stacking Buffer, 4x ddH <sub>2</sub> O APS (10%) TEMED
TBS 0,1% Tween 20	1 ad 1	ml l	Tween 20 TBS 1x
TBS, 1x	6 44 ad 5	g g l	TrisBase NaCl (150mM) ddH <sub>2</sub> O
Transfer Buffer, 10x	30,2 145, 3 ad 1	g g l	TrisBase Glycin ddH <sub>2</sub> O
Transfer Buffer, 1x	100 200 700	ml ml ml	Blotting Buffer, 10x Methanol (100%) ddH <sub>2</sub> O
Tris-Puffer pH 7,6	7,88 1	g l	Tris-Hydrochlorid ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 5: Standardlösungen

### 2.1.6. Antikörper

Antikörper Western Blot	Nummer	Hersteller
Anti-Mouse IgG Antikörper (H+L), <i>HRP Conjugate</i>	W4021	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland



Anti-Rabbit IgG Antikörper (H+L), <i>HRP Conjugate</i>	W4011	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Anti-Actin Antikörper ( <i>produced in rabbit</i> )	Sigma A2066	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-SSTR1	OriGeneTA323285	OriGene Technologies, Rockville, USA
Anti-SSTR2	Sigma HPA007264	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-SSTR5	Ab156864	Abcam®, Cambridge, UK
Anti-CXCR4	Ab 13854	Abcam®, Cambridge, UK

<b>Antikörper-Sonden Real Time PCR</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
SSTR1	Hs00265617 s1	Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
SSTR2	Hs00265624 s1	Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
SSTR5	Hs00265647 21	Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
CXCR4	Hs00607978_s1	Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 7: Antikörper für die RT-PCR

<b>Antikörper Immunhistochemie</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-SSTR2	ab134152	Abcam®, Cambridge, UK

Anti-CXCR4	ab2090	Abcam®, Cambridge, UK
------------	--------	-----------------------

Tabelle 8: Antikörper für die Immunhistochemie

### 2.1.7. Enzyme

Enzym	Hersteller
Trypsin/EDTA 0,05%	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 9: Enzyme

### 2.1.8. Zelllinien

Zelllinien	Verbrauchsmedium
QGP-1	RPMI (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
BON-1	DMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Tabelle 10: Zelllinien

## 2.2. Versuchsaufbau

### 2.2.1. Zellkultur

Die Zelllinien QGP-1 und BON-1 wurden in 20 ml (T75) bzw. 4 ml (T25) Flaschen, im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung, kultiviert. Das Medium, welches abhängig von der jeweiligen Zelllinie gewählt wurde (siehe Tabelle 10), wurde alle drei bis vier Tage gewechselt.

Die Aussaat und Ernte erfolgten entsprechend der nachfolgend angewandten Methodik (siehe 2.3.1,2.4.1,2.5.1).

### 2.2.2. Zellzählung

Es wurden 10 µl Aliquot in 10 µl Trypanblau überführt und gevortext. Die Zellzählung erfolgte mit 10-12 µl des Gemisches im *Luna FL Daul Fluorescence cell counter* von *Biozym*.

### 2.2.3. Zelllinien

Es wurden die neuroendokrinen Tumorzelllinien QGP-1 und BON-1 verwendet.

Die QGP-1-Zelllinie wurde aus dem neuroendokrinen Pankreastumor eines 61-jährigen Mannes im Jahre 1980 isoliert.

Die BON-1-Zelllinie wurde aus Lymphknotenmetastasen des neuroendokrinen Pankreastumors eines 28-jährigen Mannes isoliert. Die Linien wurden freundlicherweise von der AG Grötzinger (Innere Medizin m.S. Hepatologie-Gastroenterologie, Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.4. Zellkulturversuche

Die Zellen wurden fünf Tage nach Aussaat mit Quercetin bzw. Lithiumchlorid, entsprechend Tabelle 11 und Tabelle 12, behandelt.

Die Aussaat und Ernte erfolgte angepasst an das Versuchsprotokoll der jeweils angewandten Methode (siehe 2.3.1,2.4.1,2.5.1).

<b>Zellkulturversuche mit Quercetin</b>				
Zeit	Konzentration Quercetin			
0 h	0 µM			
6 h	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM
24 h	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM

Tabelle 11: Zellkulturversuche mit Quercetin

<b>Zellkulturversuche mit Lithiumchlorid</b>	
Zeit	Konzentration Lithiumchlorid
0 h	0 mM

4 h	2,5 mM	5 mM
6 h	2,5 mM	5 mM

Tabelle 12: Zellkulturversuche mit Lithiumchlorid

## 2.3. Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

### 2.3.1. Aussaat und Ernte der Zellen

Es wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät und nach fünf Tagen mit Quercetin und Lithiumchlorid, wie im Versuchsprotokoll beschrieben, behandelt (siehe 2.2).

### 2.3.2. RNA-Isolation

Die RNA wurde unter Anwendung des *NucleSpin®RNA Kit* von *Macherey-Nagel* entsprechend des beiliegenden Handbuchs isoliert.

### 2.3.3. RNA-Messung

Unter Nutzung des Photometers *DeNovix DS-11 FX Spectrophotometer/Fluorometer* von *Biozym* wurde die RNA-Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] der Proben bestimmt.

### 2.3.4. cDNA-Synthese

Anhand der zuvor bestimmten RNA-Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ], wurde die benötigte Menge an Reagenzien für die cDNA-Synthese berechnet (siehe Tabelle 13).

Die Synthese der cDNA erfolgte anhand das „*iScriptcDNA Synthesis Kit*“ von *BioRad*, entsprechend des beiliegenden Versuchsprotokolls.

Reaktionsansatz cDNA-Synthese		
5x iScript Reaction Mix	4,0	$\mu\text{l}$
iScript Reverse Transkriptase	1,0	$\mu\text{l}$
RNA (100 $\mu\text{g}$ zu 1 $\mu\text{g}$ Total RNA)	x	$\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	x	$\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	20	$\mu\text{l}$

Tabelle 13: Reaktionsansatz cDNA-Synthese

Die Reaktionsansätze wurden in 200 µl PCR-Reaktionsgefäße überführt. Die cDNA-Synthese lief gemäß des Reaktionsprotokolls in Tabelle 14, im *Life Touch Thermal Cycler* von *Biozym* ab.

Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

PCR-Reaktionsprotokoll			
5	min	25	°C
30	min	42	°C
5	min	85	°C
∞		4	°C

Tabelle 14: PCR-Reaktionsprotokoll

### 2.3.5. Housekeeping-Gen

Da die Effizienz der cDNA variiert, ist der Abgleich mit einem Referenzwert in Form eines Housekeeping-Gens/Haushaltsgens nötig, bei welchem von einer konstanten relativen Genexpression in allen Proben ausgegangen werden kann. In dieser Arbeit wurde das Housekeeping-Gen HPRT1 verwendet.

### 2.3.6. Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde mit dem *ABsolute Q PCR Mix* von *Thermo-Scientific* durchgeführt.

Für jede Sonde (siehe Tabelle 15: Verwendete Sonden für die qPCR) wurde ein eigener Reaktionsansatz (siehe Tabelle 16: Reaktionsansatz Real Time qPCR) angesetzt.

Sonde	Quercetin auf BON-1	Quercetin auf QGP-1	LiCl auf BON-1	LiCl auf QGP-1
HPRT1	X	X	X	X
SSTR1	X	X	X	X
SSTR2	X	X	X	X

SSTR5	X	X	X	X
CXCR4	X	X	X	X

Tabelle 15: Verwendete Sonden für die RT-PCR, X = Versuche erfolgt.

Reaktionsansatz Real Time RT-PCR pro Well		
Master Mix	5	µl
Sonden	0,5	µl
H2O	4,5	µl
Gesamtvolumen	10	µl

Tabelle 16: Reaktionsansatz Real Time RT-PCR

Auf einer 386-Well-Platte wurde doppelt ein A-, B- und C-Versuch pipettiert. Zusätzlich wurde ein ntc-Wert, für jede Sonde, ebenfalls doppelt, pipettiert.

In ein Well wurden jeweils 9,5 µl Reaktionsgemisch und 0,5 µl cDNA oder RNase-free H2O eingegeben.

Anschließend wurde die Platte mit der beiliegenden Folie abgedeckt und die RT-PCR mit dem *ViiA 7 Real-time PCR System* von *Applied Biosystems®*, *Life Technologies* durchgeführt.

## 2.4. SDS-Page und Western Blot

### 2.4.1. Aussaat und Ernte der Zellen

Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen auf einer 6-Well-Platte ausgesät und nach fünf Tagen entsprechend des Versuchsprotokoll der Zellkulturversuche (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12) mit Quercetin und Lithiumchlorid inkubiert.

Zur Ernte der Zellen wurde der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch fünfminütige Behandlung mit jeweils 200 µl *RIPA Buffer* von *Thermo-Scientific* auf Eis.

Nach Überführung in ein Eppendorfgefäß folgte eine Ultraschallbehandlung mit dem *Ultraschall Sonoplus GM70* von *Bandelin* für zehn Sekunden, konstant bei 72 D. Zuletzt wurde für 15 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. 200 µl des

gebildeten Überstandes wurden in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

#### 2.4.2. Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinbestimmung wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* von *Thermo Fisher Scientific*, gemäß der beiliegenden Gebrauchsanweisung beschrieben, durchgeführt. Für das Erstellen eines BCA-Protein-Assays wurde sowohl eine Standard BSA (Bovines Serum Albumin) Reihe als auch jeweils 1 µl der Proben zusammen mit der working solution in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Anschließend wurde die Platte mit der beiliegenden Folie abgeklebt, für 30 Sekunden auf dem Rüttler *IKA-Vibrax VXR* von *Janke & Kunkel GmbH & Co KG* gerüttelt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden im ELISA-Reader *Synergy™ HT Multi-detection microplate reader* von *BioTek* bestimmt. Anhand von *MSEXcel* wurden die Ladevolumina entsprechend einer Proteinkonzentration von 40 µl errechnet.

#### 2.4.3. Vorbereitung der Gele und Gelelektrophorese

Die Gele wurden wie in Tabelle 17 und Tabelle 18 beschrieben angefertigt. Die Gelelektrophoresekammer wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut und mit Reservoir Buffer befüllt. Jeder Probe, bestehend aus 199 µl, wurden 50 µl *Laemmli Sample Buffer 2x* von *BioRad* zugegeben und bei 100 °C für drei Minuten aufgekocht. Anschließend erfolgte die Ladung der Geltaschen. Die Gelelektrophorese lief für ein bis zwei Stunden bei 120 Volt ab.

<b>Sammelgel für zwei Minigele</b>		
30% Acrylamid/Bis Solution	1,0	ml
Stacking Buffer	1,5	ml
ddH <sub>2</sub> O	3,5	ml
APS 10%	90,0	µl
TEMED	9,0	µl

Tabelle 17: Sammelgel

<b>12,5% Polyacrylamidgel für zwei Minigele</b>
---

30% Acrylamid/Bis Solution	7,5	ml
Running Buffer 4x	4,5	ml
ddH <sub>2</sub> O	6,0	ml
APS 10%	110,0	µl
TEMED	13,0	µl

Tabelle 18: Trenngel

#### 2.4.4. Elektrobplot und Blocken

Für jedes Gel wurde eine PVDF Membran vorbereitet und 15 Sekunden in Methanol gewaschen. Die Acrylamidgele wurden aus der Elektrophoresekammer entfernt und das Sammelgel abgeschnitten.

Der Transfer erfolgt über zwei Stunden bei 200 mA, anschließend wurde die Membrane in *Dry Milk Blotting Buffer* von *BioRad*, für eine Stunde, bei Raumtemperatur, abgeblockt.

#### 2.4.5. Färbung und Entwicklung

Die Antikörper wurden entsprechend Tabelle 19 verdünnt. Die nötigen Mengen wurden in 10 ml *Dry Milk Blotting Buffer* von *BioRad* gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C inkubiert.

Antikörperverdünnung				
Färbung	1. Antikörper	Konzentration	2. Antikörper	Konzentration
SSTR2	Anti-SSTR2	1:500	<i>Anti-Rabbit IgG</i>	1:2000
β-Actin	Anti-β-Actin	1:2000	<i>Anti-Rabbit IgG</i>	1:2000

Tabelle 19: Antikörperverdünnung

Nach Behandlung mit dem ersten Antikörper wurde die Membran zweimal für je 15 Minuten mit TBS gewaschen, bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert und erneut zweimal für je 10 Minuten mit TBS gewaschen. Abschließend wurde die *Clarity™ Western ECL Lösung* von *Bio Rad* entsprechend den Herstellerangaben aufgetragen.

Die Membran wurde mit dem *Imager 600* von *Amersham Life Science Ltd* entwickelt.



#### 2.4.6. Beta-Actin Färbung

Jeder angefertigte Western Blot wurde nach der ersten Färbung erneut mit Beta-Actin gefärbt. Dafür wurde die Membran mit dem *Stripping Buffer* von *Thermo Fisher Scientific* behandelt. Die  $\beta$ -Actin Färbung konnte anschließend nach dem oben beschriebenen Verfahren erfolgen (siehe 2.4.5).

### 2.5. Immunhistochemie

#### 2.5.1. Aussaat und Ernte der Zellen

Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in T25 Flaschen ausgesät und nach fünf Tagen mit 75  $\mu$ M Quercetin für 24 h bzw 5 mM Lithiumchlorid für 4 h inkubiert.

Ebenso wurde je eine Probe ohne Inkubation mit Quercetin bzw Lithiumchlorid angefertigt.

Nach Inkubation wurde der Überstand abgesaugt, die adhärennten Zellen mittels Trypsin für die weiteren Arbeitsschritte gelöst und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt.

#### 2.5.2. Zytospins

Es folgte ein Waschschrift mit PBS und eine anschließende Verdünnung der Zellsuspension auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml.

Die Zytospins wurden mit der *Laborfuge 400R* von *Haereus* angefertigt. Auf jeden Objektträger wurden ca. 200.000 Zellen zentrifugiert, für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit Methanol fixiert.

#### 2.5.3. Färben

Die Zytospins wurden mit der *Target Retrieval Solution* von *Dako* für 30 Minuten im Wasserbad, bei 90 °C vorbehandelt. Nach 30-minütigem Abkühlen der Objektträger bei Raumtemperatur, erfolgte das zweimalige Waschen mit der PBS/BSA Lösung (siehe Tabelle 20) für fünf Minuten.

Den nächsten Arbeitsschritt stellte die Behandlung mit 200 ml Methanol, versetzt mit 5 ml Wasserstoffperoxid, für 30 Minuten dar. Es folgte erneutes zweimaliges Waschen in PBS/BSA für je fünf Minuten.

Anschließend wurde ein Proteinblock mit *Power Block* von *Biogenex* für sieben Minuten durchgeführt und zwei Mal für jeweils eine Minute mit PBS/BSA gewaschen.

Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in der Verdünnung 1:200. Die weitere Antikörperbehandlung erfolgte mit dem *Super Sensitive™ (SS) Link-Label IHC Detection System* von *Biogenex* mit anschließendem zweimaligen Waschen mit PBS/BSA für je drei Minuten und einmaligen Spülen mit ddH<sub>2</sub>O.

Abschließend erfolgte die Visualisierung durch die Behandlung mit dem DAB Reaktionsgemisch (siehe Tabelle 21).

<b>PBS/BSA Lösung</b>			
PBS/BSA	1,6 400	l mg	PBS BSA

Tabelle 20: PBS/BSA Lösung

<b>DAB Reaktionsgemisch</b>			
DAB für Färbung	1 40 35	l mg µl	Tris-Puffer DAB H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Tabelle 21: DAB Reaktionsgemisch

Die Reaktion mit dem Antikörper Anti-SSTR2 wurden nach acht Minuten mit ddH<sub>2</sub>O abgestoppt, die Reaktion mit dem Antikörper Anti-CXCR4 nach fünf Minuten. Die Entwicklungszeiten wurden am Mikroskop überprüft.

Es folgte das vier-sekündige Gegenfärben der Objektträger mit Hämalun und die aufsteigende Alkoholreihe.

Abschließend wurden die Präparate mit *Roti-Clear* behandelt und mit *Roti-Mount* von *Roth* eingedeckt.

Es erfolgte die Färbung der mit und ohne Quercetin bzw Lithiumchlorid inkubierten Probe. Die Antikörperfärbung stellte sich braun dar.

Bei einer Negativprobe wurde auf eine Antikörperfärbung verzichtet. Hier wurde lediglich eine Hämalunfärbung vorgenommen.

#### 2.5.4. Mikroskopie und Fotografie

Die Immunhistochemie wurde mit dem *Fluoreszenz-Mikroskop HS BZ-9000* von *Keyence* mikroskopiert und fotografiert.

#### 2.6. Statistische Auswertung

Die Auswertung und bildliche Darstellung der gewonnenen Daten erfolgte mit den Programmen *Microsoft Excel 2016* und *Microsoft PowerPoint 2016*. Die Ergebnisse der RT-PCR sind als Mittelwert aus je zwei Proben aus einem A, B und C Versuch sowie der positiven Standardabweichung angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der *T-Test* mit den Signifikanz-Niveaus  $*p < 0,05$  und  $***p < 0,01$  angewandt.

Auf eine Korrektur für multiple Testung wurde aufgrund des deskriptiven Charakters der Grafiken verzichtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Effekt einer Wnt-Modulation auf Somatostatinrezeptoren

##### 3.1.1. Effekt von Quercetin auf die SSTR

Nach Behandlung mit dem Wnt-Inhibitor Quercetin zeigte sich in BON-1 Zellen eine signifikant gesteigerte Expression der mRNA für SSTR2, jedoch nicht in QGP-1.

Für SSTR1 und SSTR5 konnte in beiden Zellsystemen keine signifikante Steigerung der Expression von SSTR nachgewiesen werden.

Im Western Blot konnte in der Antikörperfärbung gegen SSTR2 kein Effekt durch die Behandlung mit Quercetin in QGP-1 und BON-1 gezeigt werden.

Immunhistochemisch konnte nach Inkubation mit Quercetin eine gesteigerte Anfärbung für SSTR2 in den Zellen gezeigt werden.

In beiden Zellsystemen konnte im Nativzustand vor Behandlung mit Quercetin keine relevante RNA-Expression für SSTR3 und SSTR4 nachgewiesen werden. Auch nach Gabe des Wnt-Inhibitors ließ sich keine messbare mRNA-Expression induzieren. Auf eine graphische Darstellung wurde verzichtet.

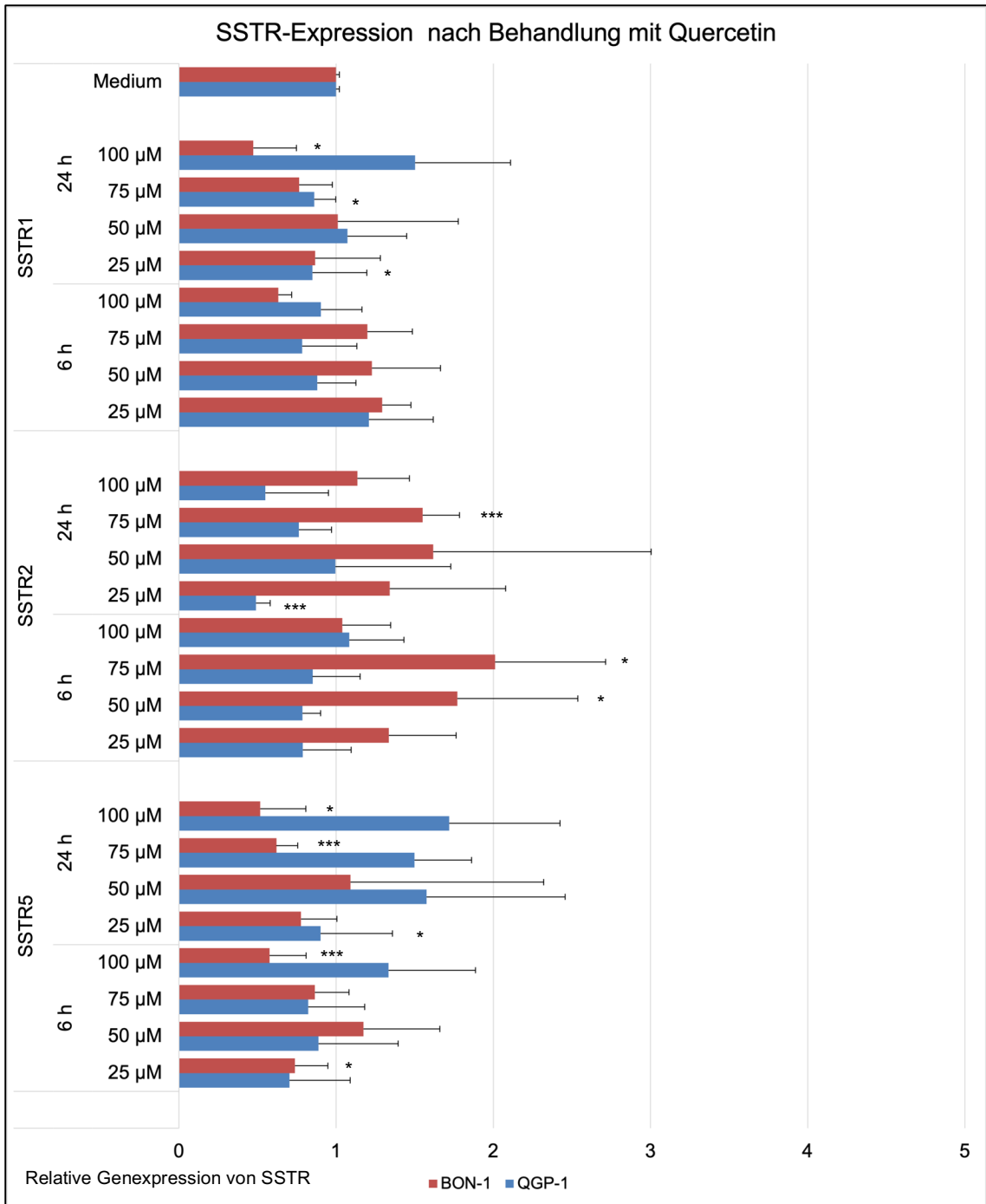


Abbildung 1: Ergebnisse der Real-time PCR: Die relative Genexpression von SSTR1, SSTR2 und SSTR5 in BON-1 und QGP-1 nach Behandlung mit Quercetin. Signifikanz-Niveau \*p < 0,05 und \*\*\*p < 0,01 angewandt.

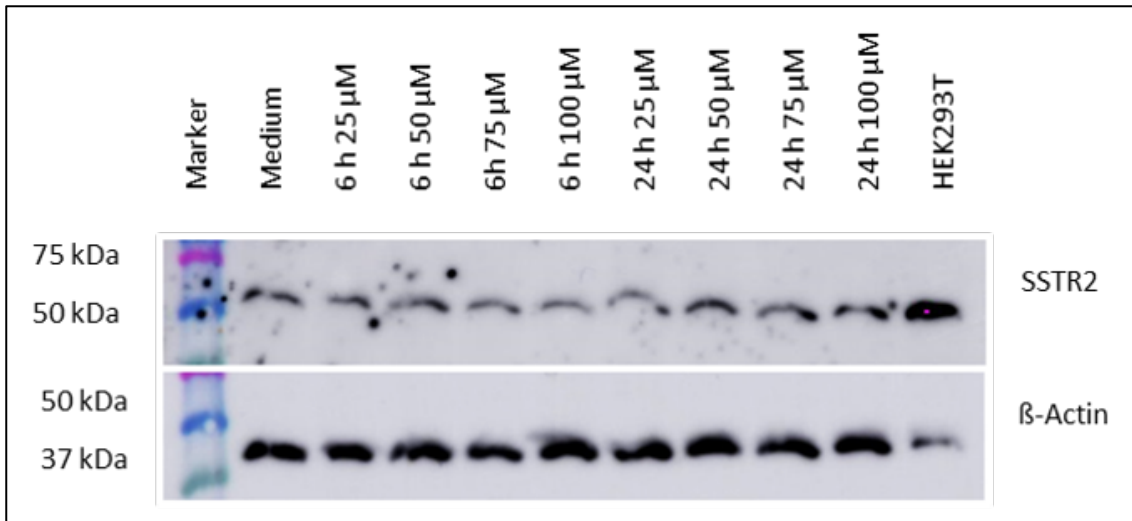


Abbildung 2: Western Blot für SSTR2 von QGP-1 nach Behandlung mit Quercetin und der Positivkontrolle HEK293.

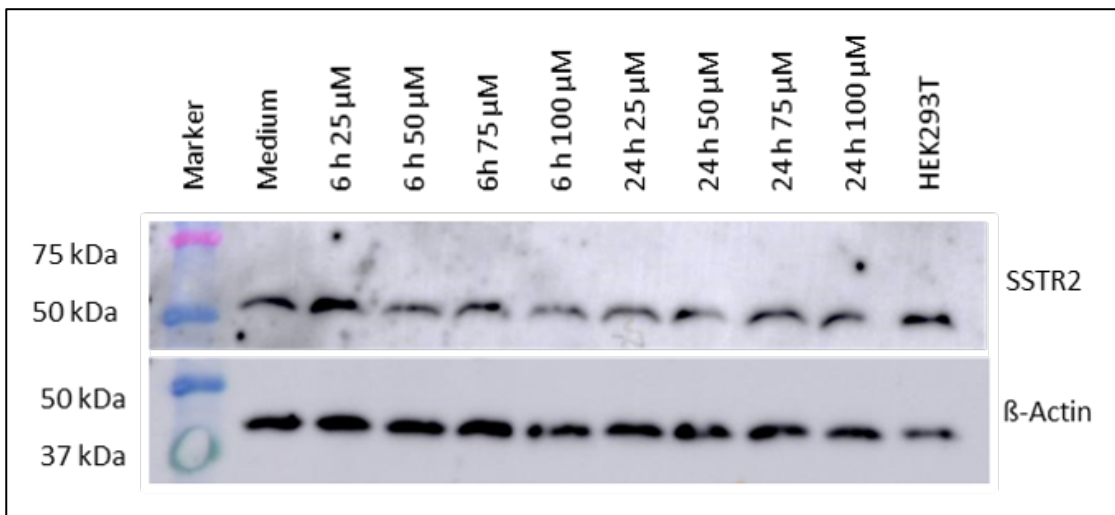


Abbildung 3: Western Blot für SSTR2 von BON-1 nach Behandlung mit Quercetin und der Positivkontrolle HEK293.

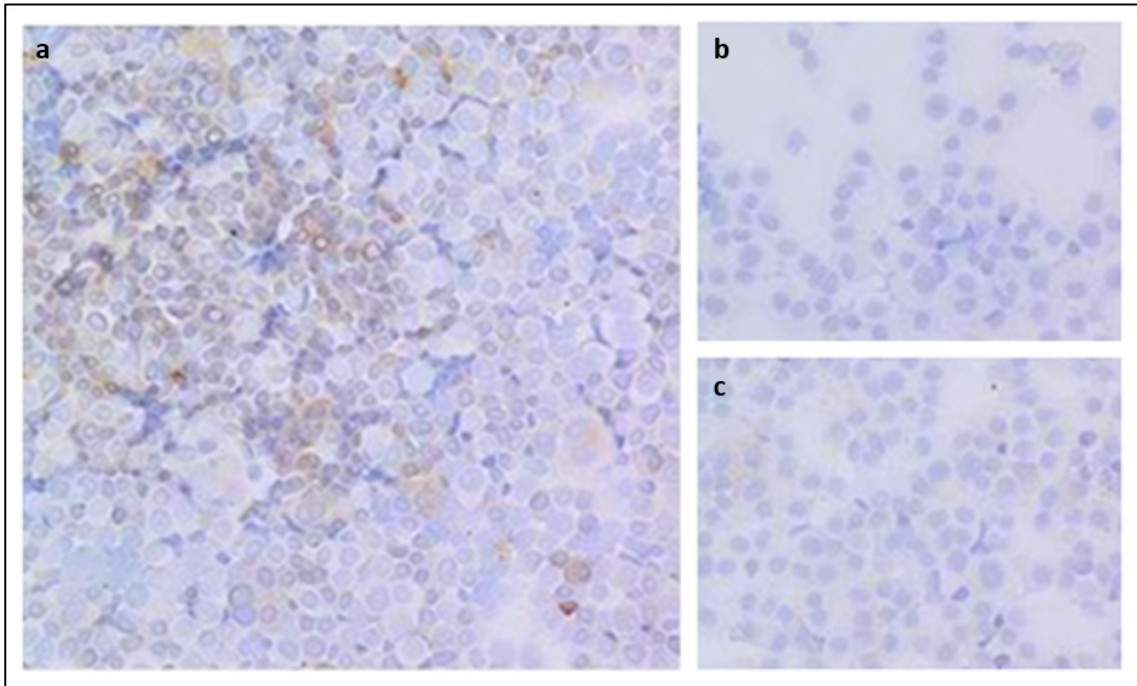


Abbildung 4: Immunhistochemie an QGP-1; a: SSTR2 Färbung nach 24 h Inkubation mit 75 µM Quercetin von QGP-1; b: Negativkontrolle ohne Färbung mit einem SSTR2 Antikörper mit Quercetin; c: SSTR2 Färbung ohne Inkubation mit Quercetin.

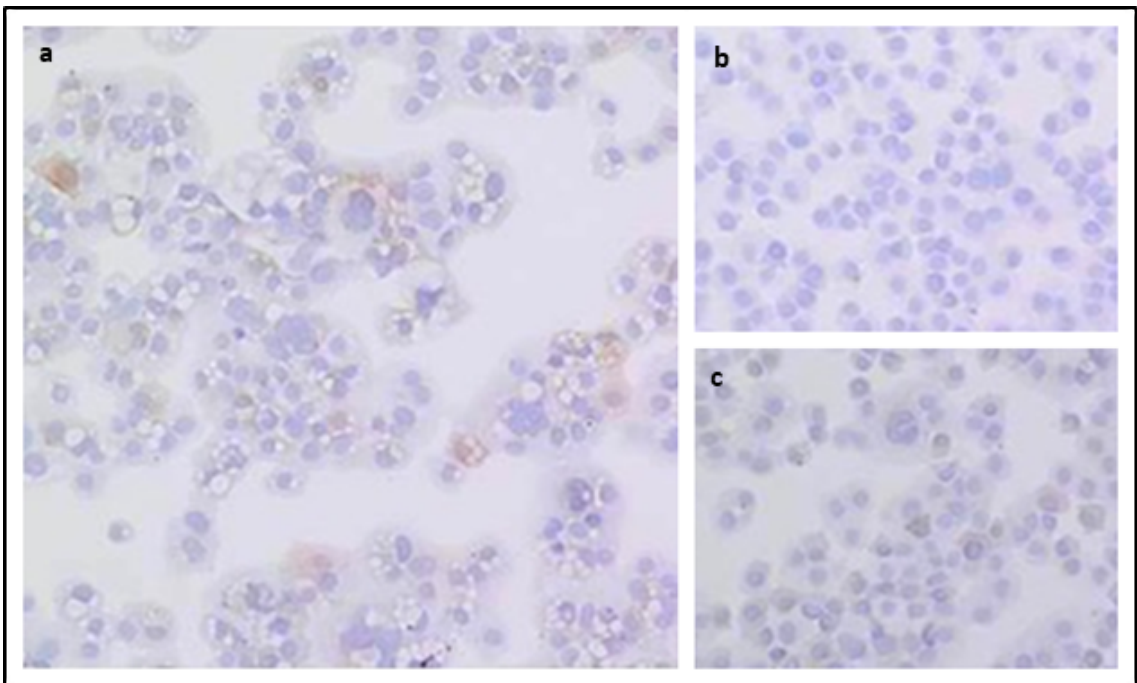


Abbildung 5: Immunhistochemie von BON-1; a: SSTR2 Färbung nach 24 h Inkubation mit 75 µM Quercetin von BON-1; b: Negativkontrolle ohne Färbung mit einem SSTR 2 Antikörper mit Quercetin; c: SSTR2 Färbung ohne Inkubation mit Quercetin.

### 3.1.2. Effekt von Lithiumchlorid auf die SSTR

Die relative Genexpression von SSTR1 und SSTR5 zeigte keine wesentliche Veränderung in QGP-1 und BON-1 nach Behandlung mit Lithiumchlorid. Eine signifikant reduzierte mRNA-Expression konnte für SSTR2 in BON-1-Zellen nach 6 Stunden gezeigt werden.

Immunhistochemisch konnte vor und nach Behandlung mit Lithiumchlorid auf beiden Zelllinien nur geringe Mengen an SSTR2 nachgewiesen werden. Ein Effekt der Behandlung zeigte sich nicht.

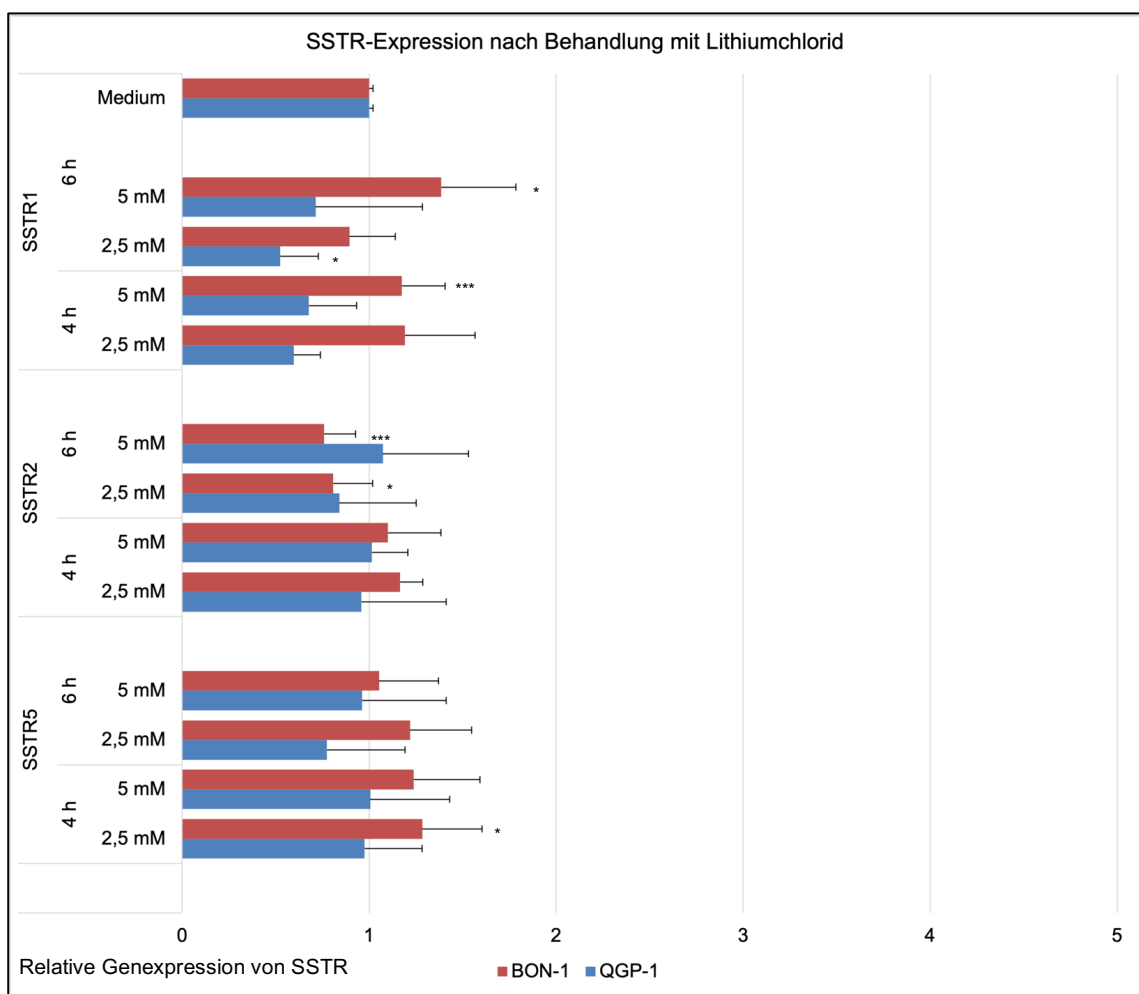


Abbildung 6: Ergebnisse der Real-time PCR: relative Genexpression von SSTR1, SSTR2 und SSTR5 in BON-1 und QGP-1 nach Behandlung mit Lithiumchlorid. Signifikanz-Niveau \*p < 0,05 und \*\*\*p < 0,01 angewandt.



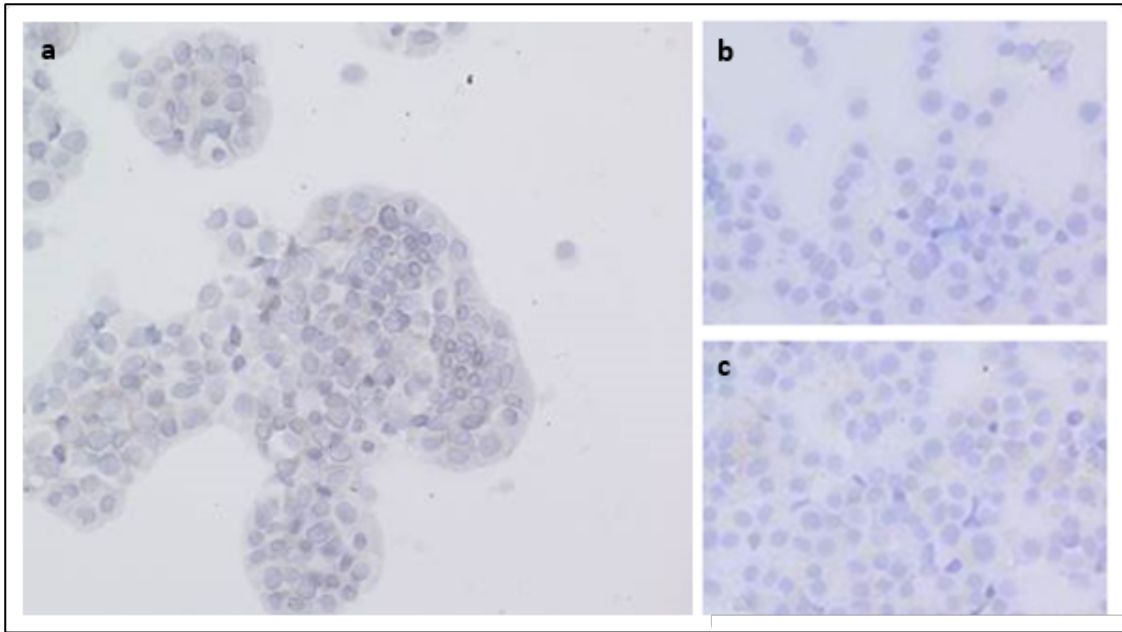


Abbildung 7: Immunhistochemie von QGP-1; a: SSTR2 Färbung nach 4 h Inkubation mit 5 mM Lithiumchlorid von QGP-1; b: Negativkontrolle ohne Färbung mit einem SSTR-Antikörper; c: SSTR2 Färbung ohne Inkubation mit Lithiumchlorid.

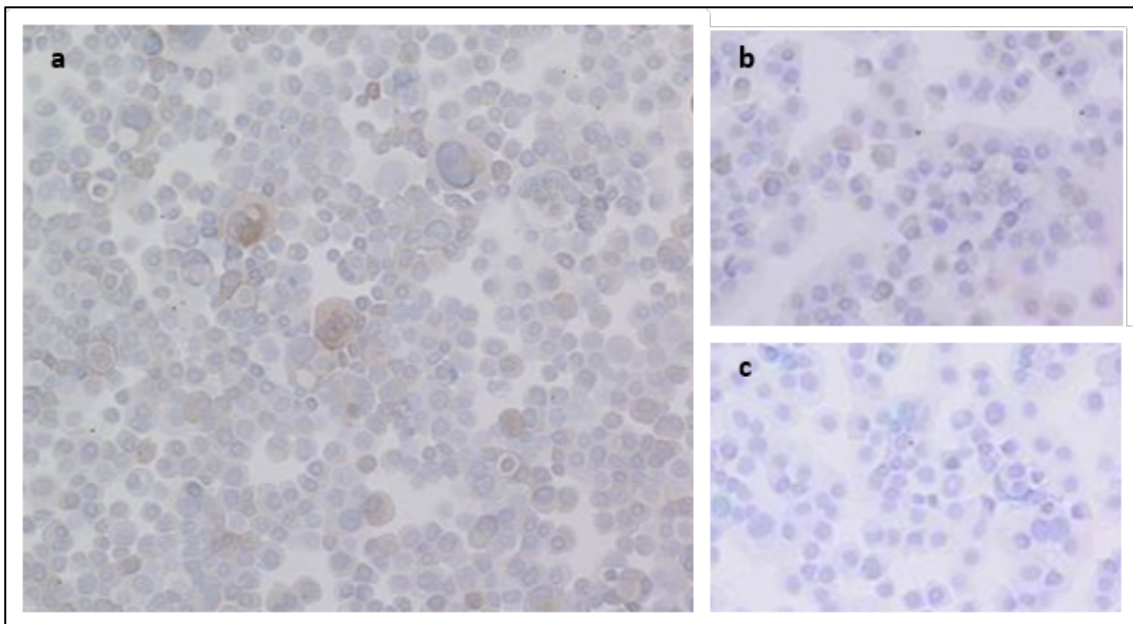


Abbildung 8: Immunhistochemie von BON-1; a: SSTR2 Färbung nach 4 h Inkubation mit 5 mM Lithiumchlorid von BON-1; b: Negativkontrolle ohne Färbung mit einem SSTR-Antikörper; c: SSTR2 Färbung ohne Inkubation mit Lithiumchlorid.

## 3.2. Effekt einer Wnt-Modulation auf CXCR4

### 3.2.1. Effekt von Quercetin auf CXCR4

Die relative CXCR4-Genexpression in BON-1 und QGP-1 sank nach sechs Stunden Inkubation mit Quercetin hoch signifikant. Auch nach 24 Stunden ist eine Reduktion der relativen Genexpression von CXCR4 zu sehen, jedoch in geringerer Ausprägung.

In der IHC an BON-1 zeigte sich eine leicht reduzierte Anfärbung von CXCR4. In QGP-1 zeigte sich keine sichtbare Veränderung. Bereits vor Behandlung mit den Wnt-Modulatoren war eine kräftige Antikörperfärbung für CXCR4 an beiden Zellreihen nachweisbar.

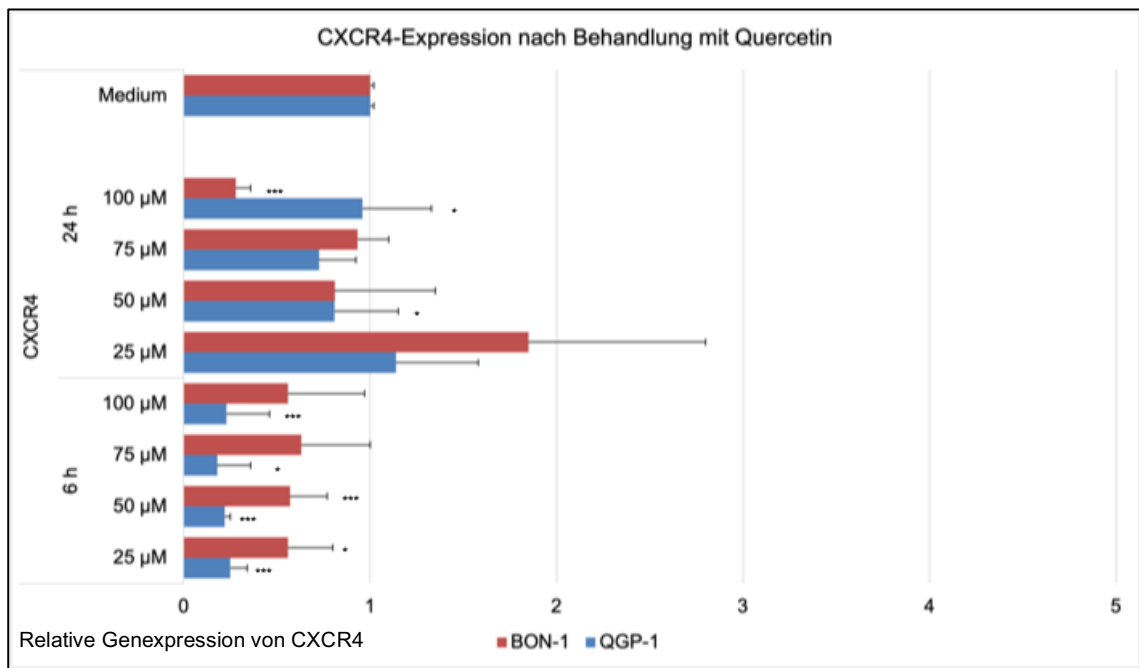


Abbildung 9: Ergebnisse der Real-time PCR an BON-1 und QGP-1: relative Genexpression von CXCR4 nach Behandlung mit Quercetin. Signifikanz-Niveau \* $p < 0,05$  und \*\*\* $p < 0,01$  angewandt.

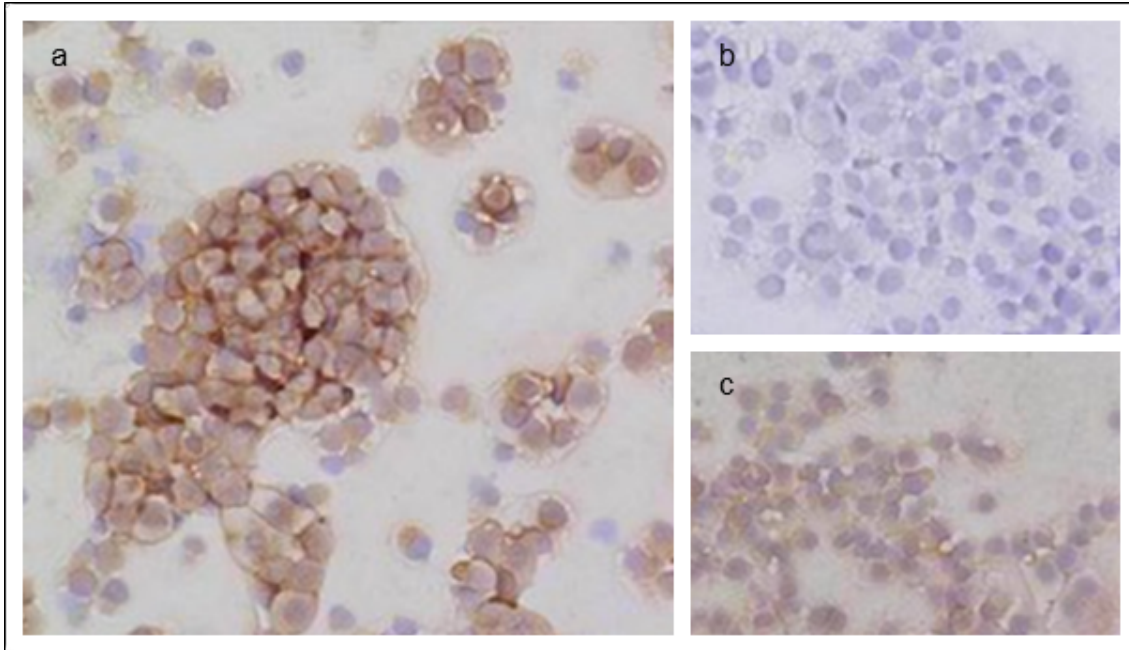


Abbildung 10: Immunhistochemie von QGP-1; a: CXCR4 Färbung nach 24 h Inkubation mit 75 µM Quercetin von QGP-1; b: Negativkontrolle an QGP-1 ohne Inkubation mit einem CXCR4 Antikörper; c: CXCR4 Färbung ohne Inkubation mit Quercetin an QGP-1

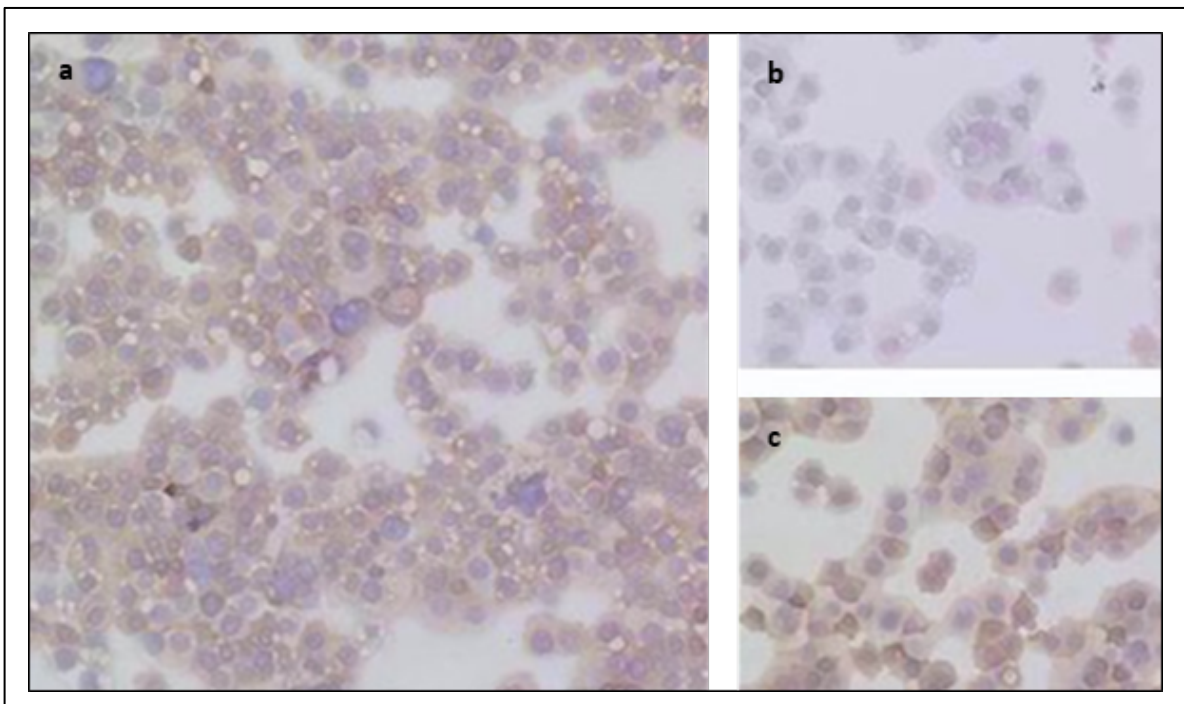


Abbildung 11: Immunhistochemie von BON-1; a: CXCR4 Färbung nach 24 h Inkubation mit 75 µM Quercetin von BON-1; b: Negativkontrolle an BON-1 ohne Inkubation mit einem CXCR4 Antikörper; c: CXCR4 Färbung ohne Inkubation mit Quercetin an BON-1.

### 3.2.2. Effekt von Lithiumchlorid auf CXCR4

Es zeigte sich ein geringer Effekt nach Inkubation mit Lithiumchlorid. Bei 5 mM zeigte sich eine leichte, in BON-1 jedoch nach 6 Stunden signifikante Zunahme der relativen Genexpression von CXCR4.

Immunhistochemisch zeigte sich auf QGP-1 und BON-1 eine starke Färbung für CXCR4. Nach der Behandlung mit Lithiumchlorid stellte sich die Färbung ausgeprägter dar.

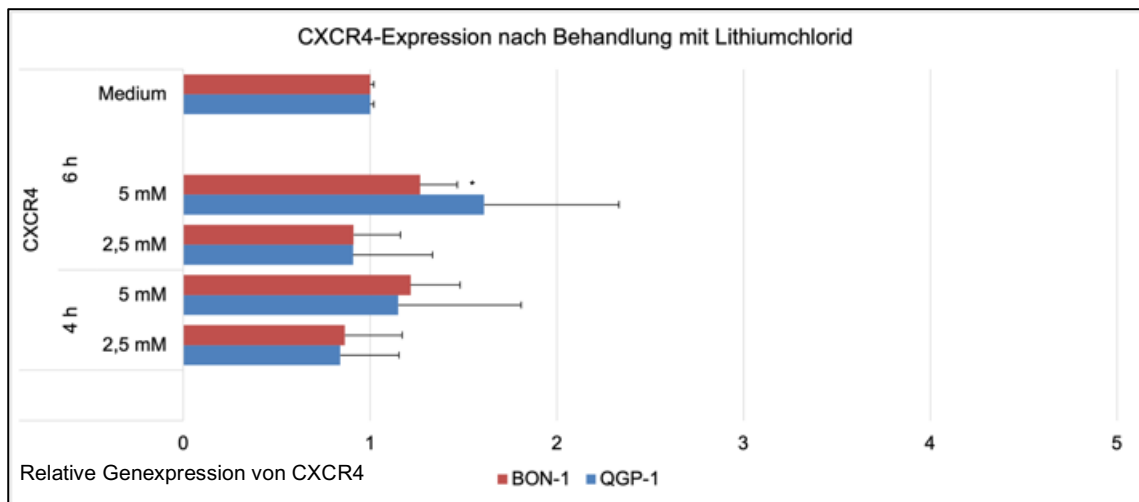


Abbildung 12: Ergebnisse der Real-time PCR an BON-1 und QGP-1: relative Genexpression von CXCR4 nach Behandlung mit Lithiumchlorid. Signifikanz-Niveau \* $p < 0,05$  und \*\*\* $p < 0,01$  angewandt.

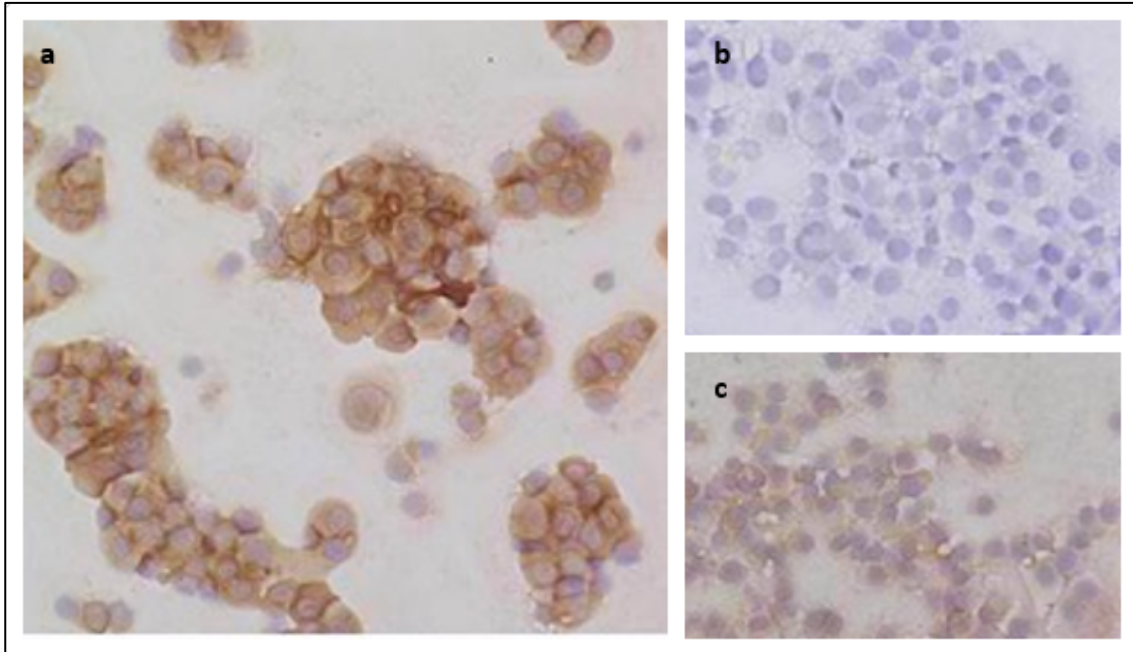


Abbildung 13: Immunhistochemie von QGP-1; a: CXCR4 Färbung nach 4 h Inkubation mit 5 mM Lithiumchlorid von QGP-1; b: Negativkontrolle ohne Inkubation mit einem CXCR4 Antikörper; c: CXCR4 Färbung ohne Inkubation mit Lithiumchlorid.

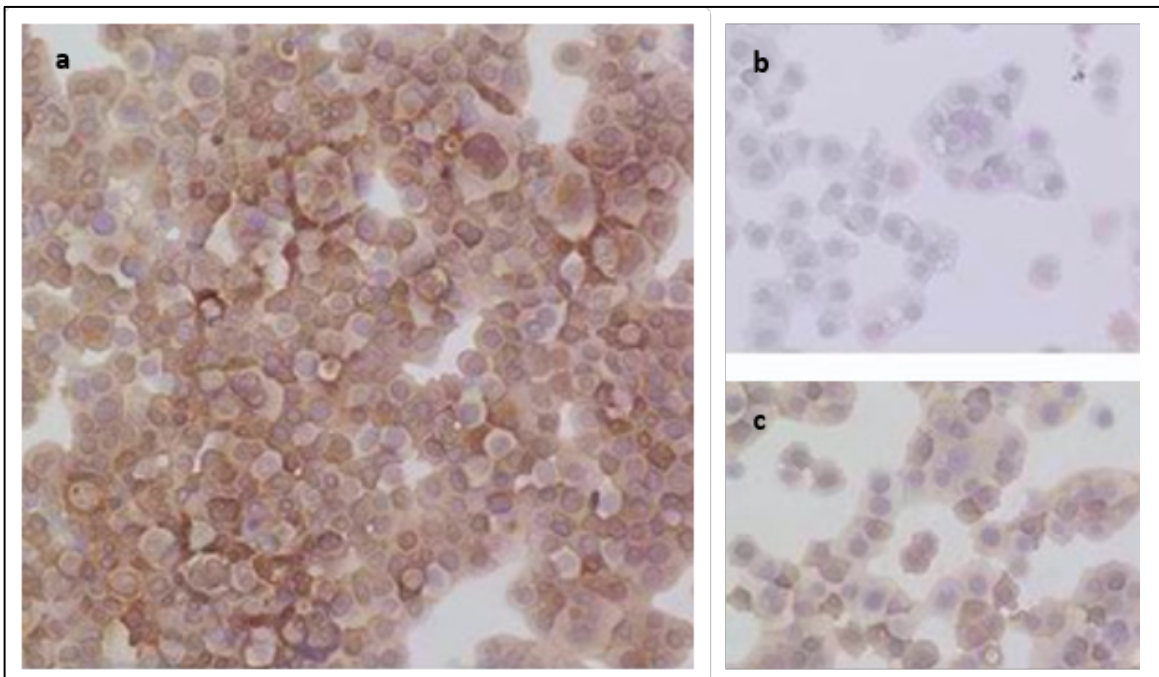


Abbildung 14: Immunhistochemie von BON-1; a: SSTR2 Färbung nach 4 h Inkubation mit 5 mM Lithiumchlorid von BON-1; b: Negativkontrolle ohne Inkubation mit einem CXCR4 Antikörper; c: CXCR4 Färbung ohne Inkubation mit Lithiumchlorid.

## 4. Diskussion

Am Modell der neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumorzelllinien QGP-1 und BON-1 wurde der Effekt der Wnt-Modulatoren Quercetin und Lithiumchlorid auf die Expression der Somatostatinrezeptoren 1,2 und 5 sowie von CXCR4 untersucht.

Unter Behandlung mit dem Wnt-Inhibitor Quercetin zeigte sich eine Steigerung der relativen Genexpression des *SSTR2* in BON-1, nicht jedoch in QGP-1-Zellen.

In beiden Zelllinien konnte kein wesentlicher Effekt auf die relative Genexpression von *SSTR1* und *SSTR5* gezeigt werden.

Auf Proteinebene konnten die Ergebnisse der Real-Time PCR in einer immunhistochemischen Antikörperfärbung gegen *SSTR2* nach 24 Stunden Inkubation mit Quercetin bestätigt werden. Die Immunhistochemie wurde nach 24 Stunden Inkubation durchgeführt, da auf mRNA Ebene nach 24 Stunden eine hochsignifikante Steigerung der relativen Genexpression erzielt werden konnte. Nach Behandlung mit Quercetin zeigte sich eine gesteigerte Anfärbung von Zytoplasma und Zellkernen.

Die relative Genexpression von *CXCR4* war nach Behandlung mit Quercetin nach sechs Stunden reduziert, dieser Effekt war nach 24 Stunden Inkubation weiterhin nachweisbar. In der Immunhistochemie zeigte sich dieser Effekt von Quercetin in BON-1 ebenso.

Die Behandlung mit Lithiumchlorid in der gewählten Konzentration zeigte in beiden Zelllinien keinen relevanten Effekt auf die relative Genexpression von *SSTR1*, *SSTR2* und *SSTR5*. Auch in der Immunhistochemie zeigte sich nach Behandlung mit Lithiumchlorid kein wesentlicher Effekt.

Die relative Genexpression von *CXCR4* zeigte nach Behandlung mit Lithiumchlorid in den untersuchten GEP-NET einen leichten Anstieg in BON-1. Dies konnte in der Immunhistochemie auf Proteinebene bestätigt werden.

Anteile dieser Dissertationsschrift wurden bereits im Rahmen einer Koautorenschaft in *Nuclear Medicine Communications* publiziert. (Weich et al. 2023)

## 4.1. Methodendiskussion

Es erfolgte die Auswertung der Versuche durch Real-Time PCR, Western Blot und Immunhistochemie.

Für die Real-Time PCR wurde das Housekeeping-Gen *HPRT1* verwendet, welches in Tumorzellen unverändert konstant exprimiert wird und somit für diesen Versuchsaufbau geeignet war (de Kok et al. 2005). In Voruntersuchungen wurde *GAPDH* als Housekeeping-Gen verwendet. Die Versuche erbrachten vergleichbare Ergebnisse.

Es wurden Antikörper verwendet, die zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente für die vorliegende Arbeit verfügbar und bis dato etabliert waren. Nachträglich wurde der für Western Blot und Immunhistochemie genutzte CXCR4-Antikörper von abcam (s. Material und Methoden) nicht mehr produziert, da sich in weiteren Untersuchungen eine zu geringe Bindungsspezifität dieses Antikörpers zeigte. Spätere Experimente der Arbeitsgruppe wurden mit einem anderen CXCR4-Antikörper durchgeführt.

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde im Rahmen eines Taqman Array der Effekt der Wnt-Modulatoren Quercetin und Lithiumchlorid an QGP-1 und BON-1-Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Quercetin die Expression von Zielgenen des Wnt-Pfades inhibierte und somit für die Bearbeitung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit geeignet war. So fand sich eine Reduktion der relativen Genexpression unter anderem von *TCF*, *MYC*, *CTNB1* (Gene für TCF7, MYC sowie  $\beta$ -Catenin) nach Behandlung mit Quercetin. Es konnte eine Wnt-Aktivierung in BON-1 und QGP-1 durch Lithiumchlorid gezeigt werden. Lithiumchlorid führte zur gesteigerten relativen Genexpression von  $\beta$ -Catenin und zahlreichen weiteren Targetgenen (Weich et al. 2021).

In dieser Arbeit konnte die Veränderung der Expression der SSTR und CXCR4 nach Behandlung mit einem Wnt-Modulator und damit eine mögliche Assoziation zwischen der Aktivität des Wnt-Signalweg und der Rezeptorexpression aufgezeigt werden.

Bei den pankreatischen NET Zelllinien QGP-1 und BON-1 handelt es sich um die bekanntesten und am weitesten etablierten GEP NET Zelllinien (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018). Für sie liegen Exom Charakterisierungen vor (Vandamme et al. 2015).

Die Übertragbarkeit von Versuchen an GEP NET Zelllinien auf die klinischen GEP NET ist durch deren hohe Mutationsrate begrenzt (Vandamme et al. 2015). Zellkulturversuche sind gerade im Hinblick darauf kritisch auszuwerten. Vor allem die Vergleichbarkeit mit

gut differenzierten GEP NET ist beschränkt. Allerdings war eine Etablierung von Zelllinien aus G1 GEP NET bisher nicht erfolgreich, so dass diese nicht für Zellversuche zur Verfügung standen (Boora et al. 2015). Somit musste auf Zelllinien aus weniger differenzierten Tumoren mit entsprechend geringerer basaler Expression von SSTR zurückgegriffen werden.

Die Eigenschaften von BON-1 und QGP-1 lassen darauf schließen, dass sie am ehesten aus GEP NEC gewonnen wurden (Hofving et al. 2018). Die Ergebnisse sind dementsprechend nur mit Vorbehalt auf NET anwendbar. Die Auswertung der Zellversuche erfolgte unter dem Wissen um diese Limitierung.

An beiden Zelllinien wurde bereits eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs beschrieben (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018).

Die Fähigkeit der SSTR-Expression von QGP-1 und BON-1 ist strittig. So beschrieben Krug et al. eine starke Expression von SSTR2 in BON-1 und eine im Vergleich etwas niedrigere Expression in QGP-1. Auch SSTR1 und SSTR5 war in beiden Zelllinien gut nachweisbar. Lediglich SSTR3 und SSTR4 war schlecht zu detektieren (Krug et al. 2019).

Hofving et al. beschrieben die SSTR2 Expression in BON-1 als gering und in QGP-1 als kaum nachweisbar (Hofving et al. 2018).

Hier zeigte sich eine Varianz zu den laboreigenen Zelllinien. Um das Expressionsverhalten der laboreigenen QGP-1 und BON-1 Kulturen besser einordnen zu können wurde dieses vor Beginn der Zellkulturversuche an den nativen Zellen charakterisiert.

In unseren unbehandelten QGP-1 und BON-1 konnte eine Expression von SSTR1, SSTR2 und SSTR5 mittels Real-Time PCR und im Western Blot nachgewiesen werden. SSTR3 und SSTR4 konnte lediglich auf RNA-Ebene nachgewiesen werden.

Aufgrund der nur geringen basalen SSTR-Expression in den Zellkulturmodellen geschah die Veränderung der Genexpression nach Behandlung mit den Wnt Modulatoren auf einem niedrigen Niveau, welches für den Nachweis von Veränderungen auf Proteinebene am Western Blot nicht sensitiv genug ist.

Immunhistochemisch war SSTR2 dementsprechend auf den nativen Zellen nicht nachweisbar.



Aufgrund der fortgeschrittenen Entdifferenzierung der Zellen zu am ehesten Karzinomzellen lag nur eine niedrige basale SSTR-Expressionsrate vor. Darum könnten mögliche klinisch relevante Effekte unterschätzt werden. Deutlichere Effekte könnten sich bei NET mit höherer SSTR-Expressionsrate zeigen.

CXCR4 wird in beiden Zelllinien deutlich exprimiert (Cives et al. 2017). Dies wurde an den laboreigenen Zellen bestätigt.

Die gewählten Dosierungen der Wnt-Modulatoren Quercetin und Lithiumchlorid wurden gemäß den Protokollen der Forschungsgruppe gewählt. Bei höher gewählten Dosierungen von Quercetin könnten eventuell stärkere Effekte erzielt werden. Auch eine Toxizität ist möglich (Panche, Diwan, and Chandra 2016). Lithiumchlorid wirkt bei höheren Dosierungen zytotoxisch (Jope 2003; Hart 2016).

## 4.2. Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1. Einfluss der Wnt-Modulation auf die SSTR

Die Somatostatinrezeptoren stellen für die Therapie mit SSA sowie die PPRT ein wichtiges Therapietarget bei GEP NET dar (Strosberg and Krenning 2017; Rinke et al. 2009) .

Nach Aktivierung des G-Protein SSTR werden abhängig vom Rezeptor-Subtyp verschiedene Signalkaskaden gestartet. So reguliert SSTR2 p21 und Rb auf und führt damit zum Zellzyklusarrest. SSTR3 vermittelt Apoptose durch p53 und BAX und inhibiert vascular endothelial growth factor (VEGF). SSTR5 aktiviert PTP wie SHP1 und 2 sowie PTP $\gamma$ . Gegensätzlich dazu steht die Aktivierung der SSTR1 und SSTR4. Diese regulieren den MAPK/ERK1/2- Signalweg hoch und vermitteln so eine gesteigerte proliferative Aktivität. Weiterhin sind Effekte der SSTR auf die Adenylatzyklase, auf die Proteinkinase A, auf Kaliumkanäle, auf spannungsabhängige Kalzium-Kanäle, auf Natrium-Protonen-Antiporter und auf Glutamat-Kanäle bekannt (Alonso-Gordoa, Capdevila, and Grande 2015).

In der Tumorthherapie mit SSA werden diese Funktionen der SSTR genutzt. Man unterscheidet zwischen direkt und indirekt über SSA vermittelten Effekten, welche zum Zellzyklusarrest führen und die Proliferation inhibieren (Wang et al. 2013).

Die Nutzung des SSTR als Therapietarget kommt nur dann infrage, wenn ein GEP-NET SSTR exprimiert. Kaemmerer et al. konnten zeigen, dass eine zunehmende Entdifferenzierung mit einem Verlust von SSTR einhergeht (Kaemmerer et al. 2015). Eine Aktivierung sowie Steigerung der Expression von SSTR könnten einen möglichen Ansatz für die Optimierung der bisherigen Therapiestrategien darstellen.

In den Versuchen zu dieser Arbeit, ebenso wie in früheren Experimenten mit 5-aza-CdR, konnte eine Steigerung der Genexpression von *SSTR2* in GEP NET-Zelllinien nach Behandlung mit dem Wnt-Inhibitor Quercetin gezeigt werden.

Durch Real-Time PCR und Immunhistochemie konnte dies auf RNA- und Proteinebene bestätigt werden.

Auch in später durchgeführten Reuptake Versuchen mit radioaktiv markiertem Octreotid konnten die Ergebnisse auf Proteinebene veranschaulicht werden. (Weich et al. 2023)

Quercetin entfaltet seine Wirkung über die Inhibition des Wnt-Signalweg sowie PI3K/Akt/mTOR und MAPK/ERK1/2 in Tumorzellen. So können Regulationsmechanismen des Zellzyklus wieder wirksam werden und eine Apoptose dedifferenzierter Zellen induzieren. (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019)

Eine relevante Beeinflussung des Expressionsverhaltens der Rezeptoren SSTR1 und SSTR5 durch Quercetin fand in der verwendeten Konzentration und Inkubationszeit nicht statt.

Nach Behandlung mit dem Wnt-Aktivator Lithiumchlorid zeigte sich in beiden Zelllinien kein relevanter Effekt auf die relative Genexpression von *SSTR1*, *SSTR2* und *SSTR5*. Jedoch konnten Weich et al. nach Behandlung mit Lithiumchlorid bei ähnlichen Ergebnissen der Real-Time PCR, ein deutlich reduziertes Uptake von radioaktiv markiertem Octreotid nachweisen und konnten somit einen Effekt des Wnt-Aktivators im Sinne einer reduzierten SSTR Aktivität auf SSTR1, SSTR2 und SSTR5 auf Proteinebene zeigen. (Weich et al. 2023)

#### 4.2.2. Einfluss der Wnt-Modulation auf CXCR4

Über diverse Signalkaskaden fördert das G-Protein CXCR4 die Karzinogenese, die Angiogenese und die Invasivität von Tumorzellen. Die Adenylatcyclase wird inhibiert. Das Zellüberleben, die Proliferation und die Chemotaxis werden gefördert. Dies wird über die NF- $\kappa$ B-, JAK-STAT- und PI3-Akt-Signalwege sowie mTOR und das JNK/p38 MAPKs vermittelt (Scala 2015).

Neben CXCL12 binden an den CXCR4 auch non-Chemokin-Liganden wie beispielsweise extrazelluläres Ubiquitin und der MIF- (Macrophage migration inhibitory factor) Ligand (Cives et al. 2017).

Eine Überexpression des CXCR4 wurde bereits in mehr als 20 verschiedenen Tumorarten nachgewiesen (Chatterjee, Behnam Azad, and Nimmagadda 2014). Auch bei GEP NET/NEC ist er mit Entdifferenzierung und einer schlechteren Prognose assoziiert (Kaemmerer et al. 2015). Verschiedene Studien haben bestätigt, dass CXCR4-vermittelte Effekte zu Tumorwachstum, Angiogenese, Metastasierung und der therapeutischen Resistenz von Tumoren beitragen (Chatterjee, Behnam Azad, and Nimmagadda 2014).

Eine erhöhte CXCR4-Expression in NET des Pankreas, des Ileum und der Lunge korreliert (gegenläufig zur SSTR-Expression) mit einem höheren Malignitätsgrad sowie einem schlechterem Patienten-Outcome (Kaemmerer et al. 2015).

Werner et al. konnten anhand einer Kohorte mittels PET/CT und dem Tracer Gallium 68 markiertes PentixaFor ( $^{68}\text{Ga}$ ] Ga-PentixaFor) erstmalig in vivo zeigen, dass CXCR4 vor allem in hochproliferativen G3 Tumoren der GEP-NET nachweisbar, in gut differenzierten Tumoren jedoch nicht in relevanter Menge nachweisbar war. Gegensätzlich dazu präsentierten sich SSTR (Werner et al. 2017).

Als therapeutisches Äquivalent für  $^{68}\text{Ga}$ ] Ga-PentixaFor ist Lutetium 177 gebundenes PentixaTher ( $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PentixaTher) als interessante, mögliche Therapieoption für NEN zu betrachten.  $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PentixaTher wurde bereits bei austherapierten, hämatoonkologischen Neoplasien mit CXCR4 Expression erfolgreich eingesetzt. Jedoch muss im Hinblick auf einen Therapieeinsatz der Effekt der Myeloablation Erwähnung finden. Diese kann bei hämatoonkologischen Erkrankungen der Therapie zur Vorbereitung auf eine Stammzelltransplantation dienlich sein, bei soliden Tumoren wie den NEN stellt sie jedoch eine relevante Nebenwirkung dar. (Buck et al. 2022)

Eine Überexpression von CXCR4 im Primärtumor gilt als Prädiktor für eine Knochenmetastasierung (Cives et al. 2017). Cives et al. konnten am Modell

neuroendokriner Tumorzelllinien, unter anderem von BON-1 und QGP-1, zeigen, dass durch die CXCL12/CXCR4-Achse vermittelte Signale die epithelial-mesenchymale Transition fördern und schließlich zu einem gesteigerten Osteotropismus von NET-Zellen führen.

Song et al. zeigten in Zellkulturversuchen an Kolonkarzinomzellen, dass durch Inhibition der CXCL12/CXCR4-Achse eine Reduktion der Aktivität des Wnt-Signalweges und gleichzeitig eine Reduktion der Zellproliferation erreicht werden kann (Song et al. 2015). Die Reduktion der CXCR4-Expression bzw. -Aktivität in NET ist darum möglicherweise ein interessanter therapeutischer Angriffspunkt (Cives et al. 2017).

In dieser Arbeit wurde durch den Wnt- Inhibitor Quercetin auf Genebene eine Reduktion der CXCR4 – Genexpression in QGP-1 und BON-1 nach sechs Stunden gezeigt. Auf Proteinebene konnte der Effekt an BON-1 anhand eines reduzierten Uptakes des radioaktiv markierten CXCR4-Ligand [<sup>68</sup>Ga] Ga-PentixaFor gezeigt werden (Weich et al. 2021).

Nach Behandlung mit Lithiumchlorid zeigte sich ein geringer Effekt auf CXCR4 in BON-1. In QGP-1 zeigte sich kein Effekt. Jedoch konnte auf Proteinebene in beiden Zelllinien ein gesteigertes [<sup>68</sup>Ga] Ga-PentixaFor Uptake für beide Zelllinien verzeichnet werden, was für einen Effekt im Sinne einer gesteigerten Aktivität von CXCR4 auf Proteinebene nach Inkubation der Zellen mit Lithiumchlorid spricht (Weich et al. 2021).

Letztlich ist der Effekt von Lithiumchlorid auf CXCR4 unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit eher als gering einzustufen.

In der Immunhistochemie mit Antikörperfärbung gegen CXCR4 zeigte sich kein Effekt durch die Behandlung mit Lithiumchlorid. Es zeigte sich in nativen und mit Lithiumchlorid inkubierten Zellen eine starke Antikörperfärbung. Diese spricht für eine hohe CXCR4 Expression der QGP-1 und BON-1 Zellen. Es ist fraglich ob eine Steigerung der CXCR4 Expression bei entsprechender Behandlung, insbesondere im Hinblick auf die Toxizität höherer Lithiumchlorid-Konzentrationen, möglich wäre oder ob bereits ein Maximum erreicht wurde.

#### 4.2.3. Einordnung des Effekts von Quercetin

Durch Behandlung mit dem Wnt-Inhibitor Quercetin zeigte sich eine Aufregulation der SSTR2 Expression sowie eine Abregulation der CXCR4 Expression.

Quercetin inhibiert neben dem Wnt-Weg auch den PI3K/Akt/mTOR Signalweg (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019).

Daher ist die Hypothese, dass die Regulation der Rezeptoren ausschließlich über die Quercetin vermittelte Wnt-Inhibition über den LEF/TCF-Komplex bewirkt wurde, im Rahmen dieses Versuches nicht sicher zu bestätigen.

Vielmehr muss beachtet werden, dass eine gegenseitige Regulation des PI3K/Akt/mTOR und des Wnt-Wegs stattfindet.

Bei aktiviertem PI3K/Akt/mTOR-Weg, inaktiviert Akt GSK3 und sorgt so für eine Wnt-Aktivierung. Bei PI3K/Akt/mTOR-Inhibition, bleibt GSK3 aktiv,  $\beta$ -Catenin wird degradiert und es werden keine Wnt-Zielgene exprimiert.

Zusätzlich zu Wnt-Aktivierung vermittelt der PI3K/Akt/mTOR-Weg eine Transkription weiterer Onkogene und trägt so zur Karzinogenese bei (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019).

Eine Aktivierung beider Signalwege ist in GEP-NET, BON-1 und QGP-1 beschrieben. Bisher dient vor allem der PI3K/Akt/mTOR-Weg und dessen Inhibition mit Everolimus als Ansatz für eine Therapie von GEP NET (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018). Auch durch Inhibition des MAPK/ERK1/2-Signalwegs und durch Modulation weiterer, regulatorisch auf den Zellzyklus und die Zellproliferation einwirkenden, Proteine wirkt Quercetin antikanzerogen (Reyes-Farias and Carrasco-Pozo 2019).

Für die These, dass der Effekt auf SSTR und CXCR4 durch die Quercetin induzierte Wnt- Inhibition erreicht wird, sprechen die Ergebnisse weiterer Versuche mit anderen Wnt-Inhibitoren. In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe konnte unter Behandlung mit den Wnt- Inhibitoren 5-aza-CdR und Niclosamid, ebenso wie in den vorliegenden Experimenten mit Quercetin, eine Steigerung auf die Expression der SSTR sowie die Reduktion von CXCR4 in NET-Zelllinien erreicht werden. Da Quercetin, 5-aza-CdR und Niclosamid über verschiedene Mechanismen wirken, jedoch alle auch als Wnt-Inhibitoren, wird die Hypothese gestützt, dass die in dieser Arbeit beobachteten Effekte tatsächlich über eine Wnt-Inhibition vermittelt wurden (Weich et al. 2021).

Die durch Quercetin vermittelte Wnt-Inhibition führte zur Steigerung der SSTR2-Expression auf Gen- und Proteinebene und Reduktion der CXCR4-Rezeptorexpression auf Genebene.

Quercetin könnte über die Wnt-Inhibition sowie den Effekt auf die Rezeptorexpression und die geringe Toxizität eine für die Therapie von GEP NET interessante Substanz sein. Weitere Untersuchungen zu Quercetin an spezifischeren Zellsystemen könnten dies genauer evaluieren.

#### 4.2.4. Einordnung des Effekts von Lithiumchlorid

Für Lithiumchlorid sind antiproliferative und toxische Eigenschaften beschrieben (Greenblatt et al. 2010) (Hart 2016). Lithiumchlorid ist ein GSK3-Inhibitor und Wnt-Aktivator (Jope 2003). Die Aktivierung des Wnt-Wegs birgt ein kanzerogenes Potential. Jedoch ist für Lithiumchlorid auch eine proapoptotischen Wirkung und ein antikanzerogener Effekt auf Zellebene bei Versuchen mit BON-1 beschrieben worden (Jope 2003).

In den Zellkulturversuchen von Greenblatt et al. wurde bei 10-30 mM Lithiumchlorid eine proapoptotischen Wirkung in BON-1 erzielt (Greenblatt et al. 2010) .

In vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Lithiumchlorid an unseren Zellkulturen ab 7,5 mM zytotoxisch wirkt.

Die in dieser Arbeit gewählte Konzentration von 5 mM Lithiumchlorid hatte keinen zytotoxischen Effekt. Vielmehr kam es durch die Behandlung mit Lithiumchlorid in weiteren Versuchen sogar zu einem Anstieg der relativen Genexpression von CXCR4, was für ein Fortschreiten des malignen Potentials der Tumorzellen spricht. Ein proapoptotischer Effekt wurde nicht beobachtet.

Der von Greenblatt et al. an Zellkulturen beobachtete Effekt konnte an GEP-NET Patienten im Rahmen einer Phase 2 Studie nicht bestätigt werden (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018).

Als Ursache dafür wurde angenommen, dass der erreichte Serumspiegel von Lithiumchlorid nicht hoch genug war, um GSK3 zu inhibieren (Greenblatt et al. 2010) (Lubner et al. 2011).

Trotz multipler Mechanismen, über welche Lithiumchlorid die Karzinogenese und Proliferation potenziell fördern könnte, liegen bislang keine Daten vor, welche einen solchen Effekt in vivo tatsächlich bestätigen würden (McCubrey et al. 2014).

Bisher konnte anhand von Daten aus der Langzeit-Lithiumtherapie an Patienten mit bipolarer affektiver Störung kein kanzerogenes Potenzial festgestellt werden (Jope 2003).

Daraus ergibt sich, dass Lithiumchlorid zwar in Zellkulturversuchen geeignet ist, als Wnt-Aktivator zu fungieren, in vivo dieser Effekt jedoch im klinischen Einsatz des Medikamentes bisher nicht nachgewiesen wurde.

In dieser Arbeit wurde Lithiumchlorid gewählt um mit der gegenläufigen Wirkung zu Quercetin auf den Wnt-Weg eine Wnt-Aktivierung bzw. -Inhibition bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Expression der SSTR sowie CXCR4 zu vergleichen.

Lithiumchlorid wirkt dabei nicht nur über eine Wnt-Aktivierung, sondern auch über andere zelluläre Mechanismen wie die Inhibition der Inositol-Monophosphatase (Jope 2003; Alda 2015). Dies führt zu einer Reduktion der Umwandlung von Inositolmonophosphat zu Inositol. Unter einer Langzeittherapie mit Lithium, wird so Diacylglycerol (DAG) angehäuft und die DAG-abhängigen Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Lenox and Wang 2003).

Die PKC ist in vielen Karzinomen aktiviert. Unter anderem konnten unter PKC Einfluss eine Überexpression von Cyclin D1 und eine NF- $\kappa$ B- Aktivierung gezeigt werden (Lenox and Wang 2003). Eine Interaktion des IP/PKC- Wegs mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg ist bekannt. So bewirken diverse Isoformen der PKC eine Inhibition der GSK3, wohingegen andere, atypische PKC eine Degradierung von  $\beta$ -Catenin auslösen. Außerdem wird eine aktivierende Wirkung des Dishevelled-Proteins auf die PKC angenommen (Lenox and Wang 2003).

Ein zusätzlicher Effekt ist die reduzierte Expression und Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB durch Lithiumchlorid. Eine Suppression von CREB, unter anderem durch GSK3-Suppression, hat eine erhöhte p53- und BAX- sowie eine erniedrigte bcl-2-Aktivität zur Folge und wirkt damit proapoptotisch. (Alda 2015)

Auch der IP/PKC- Weg könnte Effekte in GEP-NET vermitteln. Allerdings beschreiben Jope et al. erst nach Langzeittherapie mit Lithiumchlorid eine Aktivierung des IP/ PKC- Wegs, welcher einen Einfluss auf die Genexpression verschiedener potenziell kanzerogen wirkender Proteine, wie beispielsweise Cyclin D1, hat (Jope 2003).

Da in dieser Arbeit kurze Inkubationszeiten von vier und sechs Stunden gewählt wurden, ist es unwahrscheinlich, dass eine Aktivierung des IP/PKC-Wegs bewirkt wurde. Vielmehr ist anzunehmen, dass vor allem die Wirkung des Lithiumchlorid auf den Wnt-Signalweg zu Veränderungen führte.

In vorherigen Versuchen konnten an den untersuchten Zelllinien BON-1 und QGP-1 mittels Taqman Array nach Behandlung mit Lithiumchlorid ein Anstieg der Wnt-Zielgene TCF7, MYC und Cyclin D1 nachgewiesen werden (Weich et al. 2021).

Die Behandlung mit Lithiumchlorid hatte unter den Versuchsbedingungen der Experimente der vorliegenden Arbeit keinen relevanten Effekt auf die SSTR-Expression. Es zeigte sich für CXCR4 bei einer Konzentration von 5 mM jedoch ein leichter Anstieg der relativen Genexpression in BON-1.

An dieser Zelllinie konnte so schließlich die formulierte Hypothese einer Wnt-Aktivierung durch Lithiumchlorid und der damit einhergehenden Modulation des CXCR4 gestützt werden. An QGP-1 wurde dieser Effekt nicht nachgewiesen.

Die in der Immunhistochemie gezeigte starke Färbung für CXCR4 und die geringe SSTR2 Anfärbung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen spricht für deren fortgeschrittene Entdifferenzierung (Kaemmerer et al. 2015).

#### 4.2.5. Einordnung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Behandlung von QGP-1 und BON-1 mit dem Wnt-Inhibitor Quercetin eine Steigerung der SSTR2 Expression erzielt werden. Eine gesteigerte SSTR2-Expression durch Wnt-Inhibitoren könnte eine therapeutische Perspektive bei GEP NET bieten. Eine höhere Rezeptorexpression kann für die SSTR-abhängige Therapien genutzt werden.

Somit ist Quercetin als ein Vertreter dieser Pharmaka eine interessante Substanz für die Tumorthherapie von GEP NET.

Die Diskrepanz der Ergebnisse der Untersuchungen an QGP-1 und BON-1 dürfte in unterschiedlichen zellbiologischen Eigenschaften bzw. unterschiedlicher Wnt-Aktivität der beiden Zelllinien begründet liegen.

Im Taqman Array zur Beurteilung der Wnt-Aktivität in BON-1 zeigte sich ein stärkeres Ansprechen auf die Wnt-Inhibition durch Quercetin. Die Zielgene wurden stärker als bei QGP-1 supprimiert. Auch auf QGP-1 konnte eine Wnt-Inhibition mit Suppression der Wnt-Zielgene beschrieben werden, jedoch weniger stark ausgeprägt. Im Gegenzug dazu



waren die Effekte auf die Wnt-Zielgene nach Behandlung mit dem Wnt-Aktivator Lithiumchlorid in QGP-1 ausgeprägter als in BON-1. (Weich et al. 2021)

Denkbar wäre, dass aufgrund der fortgeschrittenen Entdifferenzierung der Tumorzellen der Wnt-Weg bereits vor Behandlung mit Lithiumchlorid aktiviert war.

Durch den Wnt-Aktivator Lithiumchlorid konnte so nur noch ein geringer Effekt, erzielt werden.

Gegensätzlich dazu war durch Wnt- Inhibition in BON-1, der Zelllinie mit dem mutmaßlich aktiveren Wnt-Weg, der Effekt durch die Wnt Inhibition deutlich stärker ausgeprägt. In BON-1 konnte damit eine stärkere Suppression der Wnt-Zielgene erzielt werden.

Somit scheint der Wnt-Weg in den beiden Zelllinien in unterschiedlichem Maß konstitutionell aktiv zu sein.

Die Wnt-Inhibition gilt als vielversprechendes Target der Therapie von GEP NET. Aktuell werden bereits erste klinische Studien zur Therapie von GEP NET mit Wnt-Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse stehen noch aus (Aristizabal Prada and Auernhammer 2018).

## 5. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten haben Inzidenz und Prävalenz von GEP NET deutlich zugenommen (Yao et al. 2008). Den SSTR kommt eine entscheidende Rolle bei zahlreichen etablierten Therapieverfahren zu. Allerdings stoßen die meisten Therapien bei G3 Tumoren oder bei langfristigem Einsatz an ihre Grenzen, was die Etablierung neuer, molekular zielgerichteter Therapien notwendig macht. Die Inhibition des Wnt-Signalweges stellt einen möglichen Ansatzpunkt für Therapien dar.

Ziel dieser Arbeit war es die Wirkung der Wnt-Modulatoren Quercetin und Lithiumchlorid auf die Wnt-Aktivität sowie die Expression von Somatostatinrezeptoren und CXCR4 in den neuroendokrinen Tumorzelllinien QGP-1 und BON-1 zu untersuchen.

Durch Real-Time PCR, Western Blots und Immunhistochemie wurden die Effekte auf RNA-, und Proteinebene sowie morphologisch analysiert und ausgewertet.

An den verwendeten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Quercetin die Wnt-Signalgebung inhibierte, die SSTR-Expression steigerte und die CXCR4-Expression senkte. Lithiumchlorid bewirkte eine Wnt-Aktivierung und konnte über diesen Weg eine gesteigerte Expression von CXCR4 erzielen.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Wnt-Signalwegs und der Befähigung der GEP-NET Zelllinien zur SSTR- und CXCR4-Expression bestand.

Die Wnt-Inhibierung kann über den Effekt der Steigerung von SSTR Teil neuer Therapiestrategien sein. So ist z.B. eine „add-on“ Therapie von Wnt-Inhibitoren wie Quercetin zusammen mit der PRRT denkbar.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alda, M. 2015. 'Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics', *Mol Psychiatry*, 20: 661-70.
- Alonso-Gordoa, T., J. Capdevila, and E. Grande. 2015. 'GEP-NETs update: Biotherapy for neuroendocrine tumours', *Eur J Endocrinol*, 172: R31-46.
- Aristizabal Prada, E. T., and C. J. Auernhammer. 2018. 'Targeted therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: preclinical strategies and future targets', *Endocr Connect*, 7: R1-R25.
- Belei, O. A., E. R. Heredea, E. Boeriu, T. M. Marcovici, S. Cerbu, O. Marginean, E. R. Iacob, D. Iacob, A. G. M. Motoc, and E. S. Boia. 2017. 'Verner-Morrison syndrome. Literature review', *Rom J Morphol Embryol*, 58: 371-76.
- Boora, G. K., R. Kanwar, A. A. Kulkarni, J. Pleticha, M. Ames, G. Schroth, A. S. Beutler, and M. S. Banck. 2015. 'Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines', *Cancer Genet*, 208: 374-81.
- Buck, A. K., S. E. Serfling, T. Lindner, H. Hanscheid, A. Schirbel, S. Hahner, M. Fassnacht, H. Einsele, and R. A. Werner. 2022. 'CXCR4-targeted theranostics in oncology', *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 49: 4133-44.
- Caplin, M. E., M. Pavel, J. B. Cwikla, A. T. Phan, M. Raderer, E. Sedlackova, G. Cadiot, E. M. Wolin, J. Capdevila, L. Wall, G. Rindi, A. Langlely, S. Martinez, J. Blumberg, P. Ruzsniwski, and Clarinet Investigators. 2014. 'Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors', *N Engl J Med*, 371: 224-33.
- Caplin, M. E., M. Pavel, J. B. Cwikla, A. T. Phan, M. Raderer, E. Sedlackova, G. Cadiot, E. M. Wolin, J. Capdevila, L. Wall, G. Rindi, A. Langlely, S. Martinez, E. Gomez-Panzani, P. Ruzsniwski, and Clarinet Investigators. 2016. 'Anti-tumour effects of lanreotide for pancreatic and intestinal neuroendocrine tumours: the CLARINET open-label extension study', *Endocr Relat Cancer*, 23: 191-9.
- Chatterjee, S., B. Behnam Azad, and S. Nimmagadda. 2014. 'The intricate role of CXCR4 in cancer', *Adv Cancer Res*, 124: 31-82.
- Cives, M., D. Quaresmini, F. M. Rizzo, C. Felici, S. D'Oronzo, V. Simone, and F. Silvestris. 2017. 'Osteotropism of neuroendocrine tumors: role of the CXCL12/ CXCR4 pathway in promoting EMT in vitro', *Oncotarget*, 8: 22534-49.
- de Herder, W. W., L. J. Hofland, A. J. van der Lely, and S. W. Lamberts. 2003. 'Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours', *Endocr Relat Cancer*, 10: 451-8.
- de Kok, J. B., R. W. Roelofs, B. A. Giesendorf, J. L. Pennings, E. T. Waas, T. Feuth, D. W. Swinkels, and P. N. Span. 2005. 'Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes', *Lab Invest*, 85: 154-9.
- Galli, C., M. Piemontese, S. Lumetti, E. Manfredi, G. M. Macaluso, and G. Passeri. 2013. 'GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of

- Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces', *Clin Oral Implants Res*, 24: 921-7.
- Garg, R., A. Bal, A. Das, N. Singh, and H. Singh. 2019. 'Proliferation Marker (Ki67) in Sub-Categorization of Neuroendocrine Tumours of the Lung', *Turk Patoloji Derg*, 35: 15-21.
- Greenblatt, D. Y., M. Ndiaye, H. Chen, and M. Kunnimalaiyaan. 2010. 'Lithium inhibits carcinoid cell growth in vitro', *Am J Transl Res*, 2: 248-53.
- Gunther, T., G. Tulipano, P. Dournaud, C. Bousquet, Z. Csaba, H. J. Kreienkamp, A. Lupp, M. Korbonits, J. P. Castano, H. J. Wester, M. Culler, S. Melmed, and S. Schulz. 2018. 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature', *Pharmacol Rev*, 70: 763-835.
- Hankus, J., and R. Tomaszewska. 2016. 'Neuroendocrine neoplasms and somatostatin receptor subtypes expression', *Nucl Med Rev Cent East Eur*, 19: 111-7.
- Hart, D. A. 2016. 'Sex-specific effects of LiCl treatment on preservation of renal function and extended life-span in murine models of SLE: perspective on insights into the potential basis for survivorship in NZB/W female mice', *Biol Sex Differ*, 7: 31.
- Hofving, T., Y. Arvidsson, B. Almobarak, L. Inge, R. Pfragner, M. Persson, G. Stenman, E. Kristiansson, V. Johanson, and O. Nilsson. 2018. 'The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines', *Endocr Relat Cancer*, 25: 367-80.
- Jope, R. S. 2003. 'Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes', *Trends Pharmacol Sci*, 24: 441-3.
- Kaemmerer, D., T. Trager, M. Hoffmeister, B. Sipos, M. Hommann, J. Sanger, S. Schulz, and A. Lupp. 2015. 'Inverse expression of somatostatin and CXCR4 chemokine receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms of different malignancy', *Oncotarget*, 6: 27566-79.
- Kim, J. H., S. Y. Park, Y. Jun, J. Y. Kim, and J. S. Nam. 2017. 'Roles of Wnt Target Genes in the Journey of Cancer Stem Cells', *Int J Mol Sci*, 18.
- Kim, J. T., J. Li, E. R. Jang, P. Gulhati, P. G. Rychahou, D. L. Napier, C. Wang, H. L. Weiss, E. Y. Lee, L. Anthony, C. M. Townsend, Jr., C. Liu, and B. M. Evers. 2013. 'Deregulation of Wnt/beta-catenin signaling through genetic or epigenetic alterations in human neuroendocrine tumors', *Carcinogenesis*, 34: 953-61.
- Kim, J. Y., and S. M. Hong. 2016. 'Recent Updates on Neuroendocrine Tumors From the Gastrointestinal and Pancreatobiliary Tracts', *Arch Pathol Lab Med*, 140: 437-48.
- Kjaer, A., and U. Knigge. 2015. 'Use of radioactive substances in diagnosis and treatment of neuroendocrine tumors', *Scand J Gastroenterol*, 50: 740-7.
- Krug, S., J. P. Mordhorst, F. Moser, K. Theuerkorn, C. Ruffert, M. Egidi, A. Rinke, T. M. Gress, and P. Michl. 2019. 'Interaction between somatostatin analogues and targeted therapies in neuroendocrine tumor cells', *PLoS One*, 14: e0218953.
- Kumar, Manish, Manish Kumar, Ashita Sharma, Praveen Kumar, and SpringerLink. 2020. *Pharmacotherapeutic Botanicals for Cancer Chemoprevention* (Springer Singapore : Imprint: Springer: Singapore).

- Lawrence, B., B. I. Gustafsson, M. Kidd, and I. Modlin. 2010. 'New pharmacologic therapies for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors', *Gastroenterol Clin North Am*, 39: 615-28.
- Lenox, R. H., and L. Wang. 2003. 'Molecular basis of lithium action: integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks', *Mol Psychiatry*, 8: 135-44.
- Lodish, M. B., A. C. Powell, M. Abu-Asab, C. Cochran, P. Lenz, S. K. Libutti, J. F. Pingpank, M. Tsokos, and P. Gorden. 2008. 'Insulinoma and gastrinoma syndromes from a single intrapancreatic neuroendocrine tumor', *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 1123-8.
- Lubner, S. J., M. Kunnimalaiyaan, K. D. Holen, L. Ning, M. Ndiaye, N. K. Loconte, D. L. Mulkerin, W. R. Schelman, and H. Chen. 2011. 'A preclinical and clinical study of lithium in low-grade neuroendocrine tumors', *Oncologist*, 16: 452-7.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, F. E. Bertrand, N. M. Davis, M. Sokolosky, S. L. Abrams, G. Montalto, A. B. D'Assoro, M. Libra, F. Nicoletti, R. Maestro, J. Basecke, D. Rakus, A. Gizak, Z. N. Demidenko, L. Cocco, A. M. Martelli, and M. Cervello. 2014. 'GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer', *Oncotarget*, 5: 2881-911.
- Pai, S. G., B. A. Carneiro, J. M. Mota, R. Costa, C. A. Leite, R. Barroso-Sousa, J. B. Kaplan, Y. K. Chae, and F. J. Giles. 2017. 'Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response', *J Hematol Oncol*, 10: 101.
- Panche, A. N., A. D. Diwan, and S. R. Chandra. 2016. 'Flavonoids: an overview', *J Nutr Sci*, 5: e47.
- Park, C. H., J. Y. Chang, E. R. Hahm, S. Park, H. K. Kim, and C. H. Yang. 2005. 'Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 328: 227-34.
- Peng, D., B. Cao, Y. J. Zhou, and Y. Q. Long. 2018. 'The chemical diversity and structure-based evolution of non-peptide CXCR4 antagonists with diverse therapeutic potential', *Eur J Med Chem*, 149: 148-69.
- Pongracz, J. E., and R. A. Stockley. 2006. 'Wnt signalling in lung development and diseases', *Respir Res*, 7: 15.
- Qian, Z. R., T. Li, M. Ter-Minassian, J. Yang, J. A. Chan, L. K. Brais, Y. Masugi, A. Thiaglingam, N. Brooks, R. Nishihara, M. Bonnemarie, A. Masuda, K. Inamura, S. A. Kim, K. Mima, Y. Sukawa, R. Dou, X. Lin, D. C. Christiani, F. Schmidlin, C. S. Fuchs, U. Mahmood, S. Ogino, and M. H. Kulke. 2016. 'Association Between Somatostatin Receptor Expression and Clinical Outcomes in Neuroendocrine Tumors', *Pancreas*, 45: 1386-93.
- Reyes-Farias, M., and C. Carrasco-Pozo. 2019. 'The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism', *Int J Mol Sci*, 20.
- Rinke, A., and T. M. Gress. 2017. 'Neuroendocrine Cancer, Therapeutic Strategies in G3 Cancers', *Digestion*, 95: 109-14.
- Rinke, A., H. H. Muller, C. Schade-Brittinger, K. J. Klose, P. Barth, M. Wied, C. Mayer, B. Aminossadati, U. F. Pape, M. Blaker, J. Harder, C. Arnold, T. Gress, R. Arnold, and Promid Study Group. 2009. 'Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic

- neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group', *J Clin Oncol*, 27: 4656-63.
- Rinke, A., M. Wittenberg, C. Schade-Brittinger, B. Aminossadati, E. Ronicke, T. M. Gress, H. H. Muller, R. Arnold, and Promid Study Group. 2017. 'Placebo-Controlled, Double-Blind, Prospective, Randomized Study on the Effect of Octreotide LAR in the Control of Tumor Growth in Patients with Metastatic Neuroendocrine Midgut Tumors (PROMID): Results of Long-Term Survival', *Neuroendocrinology*, 104: 26-32.
- Scala, S. 2015. 'Molecular Pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis--Untapped Potential in the Tumor Microenvironment', *Clin Cancer Res*, 21: 4278-85.
- Severi, S., I. Grassi, S. Nicolini, M. Sansovini, A. Bongiovanni, and G. Paganelli. 2017. 'Peptide receptor radionuclide therapy in the management of gastrointestinal neuroendocrine tumors: efficacy profile, safety, and quality of life', *Onco Targets Ther*, 10: 551-57.
- Song, Z. Y., Z. H. Gao, J. H. Chu, X. Z. Han, and X. J. Qu. 2015. 'Downregulation of the CXCR4/CXCL12 axis blocks the activation of the Wnt/beta-catenin pathway in human colon cancer cells', *Biomed Pharmacother*, 71: 46-52.
- Srivastava, A., and J. L. Hornick. 2009. 'Immunohistochemical staining for CDX-2, PDX-1, NESP-55, and TTF-1 can help distinguish gastrointestinal carcinoid tumors from pancreatic endocrine and pulmonary carcinoid tumors', *Am J Surg Pathol*, 33: 626-32.
- Strosberg, J., and E. Krenning. 2017. '177Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors', *N Engl J Med*, 376: 1391-2.
- Uccella, S., F. Sessa, and S. La Rosa. 2015. 'Diagnostic Approach to Neuroendocrine Neoplasms of the Gastrointestinal Tract and Pancreas', *Turk Patoloji Derg*, 31 Suppl 1: 113-27.
- Uri, I., and S. Grozinsky-Glasberg. 2018. 'Current treatment strategies for patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs)', *Clin Diabetes Endocrinol*, 4: 16.
- Vandamme, T., M. Peeters, F. Dogan, P. Pauwels, E. Van Assche, M. Beyens, G. Mortier, G. Vandeweyer, W. de Herder, G. Van Camp, L. J. Hofland, and K. Op de Beeck. 2015. 'Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1', *J Mol Endocrinol*, 54: 137-47.
- Wang, S., Z. Bao, Q. M. Liang, J. W. Long, Z. S. Xiao, Z. J. Jiang, B. Liu, J. Yang, and Z. X. Long. 2013. 'Octreotide stimulates somatostatin receptor-induced apoptosis of SW480 colon cancer cells by activation of glycogen synthase kinase-3beta, A Wnt/beta-catenin pathway modulator', *Hepatogastroenterology*, 60: 1639-46.
- Weich, A., D. Rogoll, S. Gawlas, L. Mayer, W. Weich, J. Pongracz, T. Kudlich, A. Meining, and M. Scheurlen. 2021. 'Wnt/beta-Catenin Signaling Regulates CXCR4 Expression and [(68)Ga] Pentixafor Internalization in Neuroendocrine Tumor Cells', *Diagnostics (Basel)*, 11.
- Weich, A., D. Rogoll, M. Peschka, W. Weich, J. Pongracz, M. Brand, M. Frohlich, S. E. Serfling, S. P. Rowe, A. Kosmala, F. P. Reiter, A. Meining, R. A. Werner, and M. Scheurlen. 2023. 'Wnt/beta-catenin modulating drugs regulate somatostatin receptor expression and internalization of

- radiolabelled octreotide in neuroendocrine tumor cells', *Nucl Med Commun*.
- Werner, R. A., A. Weich, T. Higuchi, J. S. Schmid, A. Schirbel, M. Lassmann, V. Wild, M. Rudelius, T. Kudlich, K. Herrmann, M. Scheurlen, A. K. Buck, S. Kropf, H. J. Wester, and C. Lapa. 2017. 'Imaging of Chemokine Receptor 4 Expression in Neuroendocrine Tumors - a Triple Tracer Comparative Approach', *Theranostics*, 7: 1489-98.
- Wolin, E. M. 2012. 'The expanding role of somatostatin analogs in the management of neuroendocrine tumors', *Gastrointest Cancer Res*, 5: 161-8.
- Yao, J. C., M. Hassan, A. Phan, C. Dagohoy, C. Leary, J. E. Mares, E. K. Abdalla, J. B. Fleming, J. N. Vauthey, A. Rashid, and D. B. Evans. 2008. 'One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States', *J Clin Oncol*, 26: 3063-72.
- Zimmermann, N., J. Knief, T. Kacprowski, P. Lazar-Karsten, T. Keck, F. Billmann, S. Schmid, K. Luley, H. Lehnert, G. Brabant, and C. Thorns. 2018. 'MicroRNA analysis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and metastases', *Oncotarget*, 9: 28379-90.





## I Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous polyposis coil
APS	Ammonium Persulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	cycle threshold
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Deoxyribonucleid acid
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
FBS	Fetal Bovine Serum
FDG	Fluor-Desoxy-Glucose
GEP NEN	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasie
GEP NET	Gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumor
GSK-3	Glycogen synthase kinase - 3
GSK3	Glykogensynthase Kinase 3
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	humane immunodeficiency virus
HPF	high-power field / Hauptgesichtsfeld
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IGF1	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
LEF 1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NEC	Neuroendokrines Karzinom
NEN	Neuroendokrine Neoplasien
NET	Neuroendokriner Tumor
NSE	neuronenspezifische Enolase
ntc	non template control
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Positronenemissionstomographie
PKC	Proteinkinase C
PRRT	Peptid Rezeptor Radionuklid Therapie

PTP ..... Protein-Tyrosin-Phosphatase  
PVDF ..... Polyvinylidendifluorid  
qPCR..... Quantitative Polymerase Chain Reaction  
Rb..... Retinoblastomprotein  
RNA..... Ribonucleic Acid  
RT-PCR..... Real-Time Polymerase Chain Reaction  
SDS ..... sodium dodecyl sulfate  
SDS-Page ..... sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
TBS ..... Tris-buffered saline  
Tcf ..... T Zell Faktor  
VEGFR..... vascular endothelial growth factor

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ergebnisse der Real-time PCR: Die relative Genexpression von SSTR1, SSTR2 und SSTR5 in BON-1 und QGP-1 nach Behandlung mit Quercetin. Signifikanz-Niveau *p < 0,05 und ***p < 0,01 angewandt. ....	32
Abbildung 2: Western Blot für SSTR2 von QGP-1 nach Behandlung mit Quercetin und der Positivkontrolle HEK293. ....	33
Abbildung 3: Western Blot für SSTR2 von BON-1 nach Behandlung mit Quercetin und der Positivkontrolle HEK293. ....	33
Abbildung 4: Immunhistochemie an QGP-1; a: SSTR2 Färbung nach 24 h Inkubation mit 75 µM Quercetin von QGP-1; b: Negativkontrolle ohne Färbung mit einem SSTR2 Antikörper mit Quercetin; c: SSTR2 Färbung ohne Inkubation mit Quercetin. ....	34
Abbildung 5: Immunhistochemie von BON-1; a: SSTR2 Färbung nach 24 h Inkubation mit 75 µM Quercetin von BON-1; b: Negativkontrolle ohne Färbung mit einem SSTR 2 Antikörper mit Quercetin; c: SSTR2 Färbung ohne Inkubation mit Quercetin. ....	34
Abbildung 6: Ergebnisse der Real-time PCR: relative Genexpression von SSTR1, SSTR2 und SSTR5 in BON-1 und QGP-1 nach Behandlung mit Lithiumchlorid. Signifikanz-Niveau *p < 0,05 und ***p < 0,01 angewandt. ....	35
Abbildung 7: Immunhistochemie von QGP-1; a: SSTR2 Färbung nach 4 h Inkubation mit 5 mM Lithiumchlorid von QGP-1; b: Negativkontrolle ohne Färbung mit einem SSTR-Antikörper; c: SSTR2 Färbung ohne Inkubation mit Lithiumchlorid. ....	36
Abbildung 8: Immunhistochemie von BON-1; a: SSTR2 Färbung nach 4 h Inkubation mit 5 mM Lithiumchlorid von BON-1; b: Negativkontrolle ohne Färbung mit einem SSTR-Antikörper; c: SSTR2 Färbung ohne Inkubation mit Lithiumchlorid. ....	36
Abbildung 9: Ergebnisse der Real-time PCR an BON-1 und QGP-1: relative Genexpression von CXCR4 nach Behandlung mit Quercetin. Signifikanz-Niveau *p < 0,05 und ***p < 0,01 angewandt. ....	37
Abbildung 10: Immunhistochemie von QGP-1; a: CXCR4 Färbung nach 24 h Inkubation mit 75 µM Quercetin von QGP-1; b: Negativkontrolle an QGP-1 ohne Inkubation mit einem CXCR4 Antikörper; c: CXCR4 Färbung ohne Inkubation mit Quercetin an QGP-1 .....	38

Abbildung 11: Immunhistochemie von BON-1; a: CXCR4 Färbung nach 24 h Inkubation mit 75 $\mu$ M Quercetin von BON-1; b: Negativkontrolle an BON-1 ohne Inkubation mit einem CXCR4 Antikörper; c: CXCR4 Färbung ohne Inkubation mit Quercetin an BON-1.....	38
Abbildung 12: Ergebnisse der Real-time PCR an BON-1 und QGP-1: relative Genexpression von CXCR4 nach Behandlung mit Lithiumchlorid. Signifikanz-Niveau *p < 0,05 und ***p < 0,01 angewandt. ....	39
Abbildung 13: Immunhistochemie von QGP-1; a: CXCR4 Färbung nach 4 h Inkubation mit 5 mM Lithiumchlorid von QGP-1; b: Negativkontrolle ohne Inkubation mit einem CXCR4 Antikörper; c: CXCR4 Färbung ohne Inkubation mit Lithiumchlorid. ....	40
Abbildung 14: Immunhistochemie von BON-1; a: SSTR2 Färbung nach 4 h Inkubation mit 5 mM Lithiumchlorid von BON-1; b: Negativkontrolle ohne Inkubation mit einem CXCR4 Antikörper; c: CXCR4 Färbung ohne Inkubation mit Lithiumchlorid. ....	40

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	13
Tabelle 3: Chemikalien .....	14
Tabelle 4: Fertigsätze .....	15
Tabelle 5: Standardlösungen.....	16
Tabelle 6: Antikörper für den Western Blot.....	18
Tabelle 7: Antikörper für die RT-PCR.....	18
Tabelle 8: Antikörper für die Immunhistochemie .....	19
Tabelle 9: Enzyme .....	19
Tabelle 10: Zelllinien.....	19
Tabelle 11: Zellkulturversuch mit Quercetin .....	20
Tabelle 12: Zellkulturversuch mit Lithiumchlorid.....	20
Tabelle 13: Reaktionsansatz cDNA-Synthese.....	21
Tabelle 14: PCR Reaktionsprotokoll.....	22
Tabelle 15: Verwendete Sonden für die RT-PCR.....	22
Tabelle 16: Reaktionsansatz Real Time RT-PCR .....	22
Tabelle 17: Sammelgel.....	24
Tabelle 18: Trenngel.....	25
Tabelle 19: Antikörperverdünnung .....	25
Tabelle 20: PBS/BSA Lösung.....	27
Tabelle 21: DAB Reaktionsgemisch .....	27



## IV Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Scheurlen für intensive und geduldige Unterstützung zur Vollendung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Dr. Alexander Weich für die Überlassung des Themas sowie langjährige Betreuung mit viel Einsatz und persönlichem Engagement in jedem Schritt dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Priv. Doz. Dr. Rudolf Werner welcher freundlicherweise als Zweitgutachter der Dissertation fungierte.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Dorothee Rogoll für die zeitintensive Unterstützung im Hinblick auf Labormethodik und naturwissenschaftliches Arbeiten während meiner Zeit im Labor bedanken. Hier danke ich auch Antje Volk und Kerstin Backhaus für die tatkräftige Einweisung und Unterstützung bei der Durchführung der Real-Time PCR, dem Western Blot sowie der Immunhistochemie. Mein Dank geht außerdem an Ivonne Breusing für die Hilfe bei der Zellaufzucht und Durchführung der Zellkulturversuche.

Auch meinen Großeltern Renate und Horst Kunz möchte ich danken, die mich während der gesamten Zeit unterstützen und der Fertigstellung dieser Arbeit ebenso entgegenfierten wie ich.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, meinen Eltern Monika und Jürgen sowie meinen Geschwistern Marie, Julien, Megen und Jerret. Danke dass ihr immer an meiner Seite wart und mich zu jedem Zeitpunkt ermutigt und unterstützt habt. Ohne euch wäre das nicht möglich gewesen.