

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Julia Mayerle

**mTOR Inhibition durch Aspirin – antiproliferative
Effekte auf neuroendokrine Tumorzellen *in vitro***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Matilde Pia Spampatti
aus Milano
2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München:**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Auenrhammer

Mitberichterstatter: PD Dr. Peter Düwell

Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2019



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Spampatti, Matilde Pia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

mTOR Inhibition durch Aspirin - antiproliferative Effekte auf neuroendokrine Tumorzellen in vitro

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 07.02.2019

Ort, Datum

Matilde Spampatti

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

1. EINLEITUNG.....	2
1.1 Neuroendokrine Tumore.....	2
1.1.1 Definition.....	2
1.1.2 Epidemiologie und Klassifikation.....	2
1.1.3 Klinik.....	5
1.1.4 Primariuslokalisation – Metastasierungshäufigkeit und Prognose.....	5
1.1.5 Diagnostik.....	6
1.1.6 Therapie.....	7
1.2 Antitumorigenes Potential von Aspirin.....	8
1.3 (PI3K)-AKT-mTOR Signalkaskade in NET.....	10
2. MATERIAL UND METHODEN.....	13
3. ERGEBNISSE.....	18
4. DISKUSSION.....	33
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	38
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	39
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	50
8. PUBLIKATIONEN.....	52
9. DANKSAGUNG.....	53

1. EINLEITUNG

1.1 Neuroendokrine Tumore

1.1.1 Definition

Neuroendokrine Tumore (NET) gehören zu einer heterogenen Gruppe von seltenen Tumoren. Sie sind spezifisch dadurch charakterisiert, dass sie sekretorische Vesikel bilden, die sowohl für endokrine Zellen als auch neuronale Synapsen charakteristisch sind, daher die Bezeichnung „neuroendokrin“ (Klöppel G, Endocr Relat Cancer 2011). Sie stammen vor allem aus dem gastroenteropankreatischen (GEP) oder aus dem bronchopulmonalen System (Frilling A et al., Endocr Relat Cancer 2012).

1.1.2 Epidemiologie und Klassifikation

NET sind seltene Tumoren: die Inzidenz der GEP-NET beträgt ca. 2,3-5/100000, jedoch ist die Prävalenz mit 35/100000 deutlich höher, auf Grund der in der Regel günstigen Prognose und relativ hoher 5-Jahres-Überlebensraten (Yao JC et al., J Clin Oncol 2008; Rindi G et al., J Natl Cancer Inst 2012; Jann H et al., Cancer 2011). Auch die Inzidenz stieg in den letzten Jahrzehnten, vornehmlich auf Grund der Fortschritte in der frühzeitigen Diagnosestellung durch verbesserte Bildgebungsmöglichkeiten, moderne Endoskopie und fortgeschrittene histopathologische Techniken (Frilling A et al., Endocr Relat Cancer 2012; Lawrence B et al., Endocrinol Metab Clin North Am 2011).

Für circa 100 Jahre hat man NET des Dünndarms als *Karzinoide* benannt, eine Terminologie mit der Siegfried Oberndorfer zum ersten Mal im Jahre 1907 diese Tumore beschrieben hatte (Klöppel G, Endocrine Pathol 2007), um sie von den Adenokarzinomen zu unterscheiden. In den folgenden Jahrzehnten folgten mehrere Klassifikationen, bis zur derzeit verwendeten Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation 2010 (World Health Organisation, WHO 2010) (Klöppel G, Endocr Relat Cancer 2011).

Die histologische Begutachtung ist sehr wichtig für die Diagnose und für die Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien (NEN) des GEP-Systems nach den Kriterien des WHO 2010 (**Tabelle 1**). Es werden diesbezüglich neben der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zusätzlich Standardtechniken der Immunhistochemie insbesondere mit Antikörpern gegen Synaptophysin und Chromogranin A (CgA) benutzt. Ein sehr wichtiger klinischer Punkt ist außerdem die Klassifikation in gut differenzierten NET und in gering differenzierten neuroendokrinen Karzinome (NEC), sowie die Bestimmung des Gradings, welches durch die Bestimmung des Proliferationsverhaltens der Zellen bestimmt wird. Es wird hier die Anzahl der Mitosen pro 10 *High Power Fields* (HPF) gezählt (mit Hematoxylin-Eosin-Färbung) und/oder der prozentuale Anteil der Tumorzellen mit positivem Proliferationsindex anhand Immunhistochemie des Proliferationsmarkers Ki-67 (monoklonaler Antikörper Mib-1) bestimmt. NEN dienen als Überbegriff und werden untergliedert in NET sowie NEC. Als Unterteilungskriterium gelten der Differenzierungsgrad und das Grading, welches vom Pathologen aufgrund der Mitoserate (Zellteilungsaktivität) und des Proliferationsindex (Wachstumsaktivität) bestimmt wird. Initial von der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) vorgeschlagen (Rindi G et al., Virchows Archive 2006; Rindi G et al., Virchows Archive 2007), und in der WHO Klassifikation 2010 (Klöppel G et al., Virchows Archive 2010, Klöppel G et al., Pathologie 2010; Klöppel G et al., Endocrine-Related Cancer 2011) unverändert übernommen, stellt das anhand des Proliferationsindex Ki-67 definierte Grading der NEN einen sehr guten Prognosefaktor dar (Rindi G et al., J Natl Cancer Inst 2012; Jann H et al., Cancer 2011). Es werden niedrig-proliferative Neoplasien Grad 1 mit Ki-67 $\leq 2\%$ (G1), von mässig-proliferativen Neoplasien mit Ki-67 3-20 % (G2) und

von hochproliferativen Neoplasien mit Ki67 >20% (G3) (**Tabelle 1**) unterschieden. Die Neoplasien Grad 1 und 2 sind gut oder mäßig differenzierte NET, während die Neoplasien Grad 3 meist schlecht differenziert sind und NEC entsprechen. Eine Sonderform stellen NET G3 dar (Basturk O et al., Am J Surg Pathol 2015; Heetfeld M et al., Endocrine-Related Cancer 2015).

Nicht nur das histologische Grading ist prognostisch wichtig (Rindi G et al., J Natl Cancer Inst 2012; Jann H et al., Cancer 2011), sondern auch die Stadieneinteilung der Neoplasien durch die TNM-Klassifikation (Rindi G et al., J Natl Cancer Inst 2012; Jann H et al., Cancer 2011), welche die Größe und Invasivität des Primärumors (T), die Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen (N) und von Fernmetastasen (M) berücksichtigt (**Tabelle 1**). Diese wurde für NEN erstmalig von der ENETS 2006/2007 vorgeschlagen (Rindi G et al., Virchows Archive 2006; Rindi G et al., Virchows Archive 2007) und - mit Ausnahme von Modifikationen bei NET des Pankreas und NET der Appendix - von der *Union for International Cancer Control* (UICC) 2009 und der WHO 2010 jeweils übernommen (Klöppel G et al., Virchows Arch 2010, Klöppel G et al., Pathologe 2010).

Bei den NET des bronchopulmonalen Systems werden typische und atypische Karzinoide der Lunge von den grosszelligen NEC und den kleinzelligen NEC (SCLC) der Lunge unterschieden (Caplin ME et al., Ann Oncol 2015; Filosso PL et al., J Thorac Disease 2015). Die Karzinoide der Lunge sind seltene Tumoren mit teilweise ähnlichen systemischen Therapieansätzen wie die GEP-NET.

WHO Bezeichnung	NET G1	NET G2	NET G3	NEC G3
Proliferation	<2 Mitosen/10HPF, Ki67 ≤ 2%	2-30 Mitosen/10HPF, Ki67 3-20%	>20 Mitosen/10 HPF, Ki67 > 20%	>20 Mitosen/10 HPF, Ki67 > 20%

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T2	N0	M0
IIB	T3	N0	M0
IIIA	T4	N0	M0
IIIB	Jeder T	N1	M0
IV	Jeder T	Jeder N	M1

Tabelle 1: Klassifikation der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP NEN) gemäss WHO 2010. Insbesondere werden hier das Grading und die Stadieneinteilung der GEP NEN gemäss UICC 2009 und WHO 2010 dargestellt.

Legende:

HPF: High Power Field

Ki67: Proliferationsmarker (monoklonaler Antikörper Mib-1)

NET: Neuroendokrine Tumore

NEC: Neuroendocrine Karzinome

UICC: Union for International Cancer Control

WHO: World Health Organization

Tis, Tumor in situ/Dysplasie (<5mm); **T1-T3**, unterscheiden sich durch Lokalisation des Primarius. **T4**, Tumor, der das Peritoneum oder die angrenzenden Organe betrifft

N0, keine metastasierte Lymphknoten; **N1**, lokoregionale Lymphknoten, vom Tumor betroffen

M0, keine Fernmetastasen; **M1**, Fernmetastasen

1.1.3 Klinik

Die Diagnosestellung von NET erfolgt oft über Jahre verzögert - die initialen Symptome können unspezifisch sein (Modlin IM et al., Gastroenterology 2005).

NEN können in „funktionell aktive Tumoren“ und in die häufigeren „nicht funktionellen Tumoren“ unterschieden werden. Bei den „funktionell aktiven Tumoren“ besteht ein klinisches Syndrom welches durch die Sekretion von spezifischen Hormonen bedingt ist, z.B. Karzinoidsyndrom bei Serotoninexzess, Zollinger-Ellison Syndrom bei Gastrinom, Whipple Trias bei Insulinom, Erythema necrolyticum migrans beim Glucagonom, Verner-Morrison-Syndrom beim *vasoactive intestinal peptide*-om (VIPom) (Fottner C, Weber MM. Internist 2012). Die Symptome der „nicht funktionellen Tumoren“, welche kein Hormon- oder Peptid-vermitteltes klinisches Syndrom verursachen, sind dagegen in der Regel von der Tumormasse und lokal durch die Tumoren verursachter Klinik abhängig. Somit entstehen Symptome wie abdominelle Beschwerden oder Zeichen eines Ileus häufig erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (Strosberg J et al., J Clin Oncol 2013).

1.1.4 Primariuslokalisation – Metastasierungshäufigkeit und Prognose

Die Metastasierungshäufigkeit bei Diagnosestellung unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primarius (Niederle MB et al., Endocrine Related Cancer 2010; Frilling A et al., Lancet Oncology 2014); während NET der Appendix, des Magens und des Rektums meist in lokalisierten Tumorstadien diagnostiziert werden, sind NET des Pankreas und NET des Ileums bei Diagnosestellung bereits in der Mehrzahl metastasiert und weisen sogar in 40-45 % bereits Lebermetastasen auf (Niederle MB et al., Endocrine Related Cancer 2010; Frilling A et al., Lancet Oncology 2014).

NET des Magens und des Rektums werden oft zufällig während endoskopischer Untersuchungen diagnostiziert; unter gewissen Voraussetzungen können kleine auf die Mukosa/Submukosa beschränkte G1 Tumoren des Magens Typ 1 und NET des Rektums meist endoskopisch abgetragen werden (Scherübl H et al., World J Gastrointest Endosc 2011, Delle Fave G et al., Neuroendocrinology 2012; Ramage J et al., Neuroendocrinology 2016). NET des Appendix werden meist im Rahmen einer Appendektomie (3-9/1000 Appendektomien) als Zufallsbefund diagnostiziert. Diese Tumoren sind meist < 1 cm gross und an der Appendixspitze lokalisiert. In diesen Fällen ist die stattgehabte Appendektomie ausreichend. Das Metastasierungsrisiko steigt mit zunehmender Grösse des Primarius an und erfordert bei Tumoren mit einer Grösse von 1 bis 2 cm bereits eine individualisierte Therapieplanung und bei NET der Appendix > 2 cm in jedem Fall eine erweiterte Chirurgie im Sinne einer rechtsseitigen Hemicolectomie (Pape UF et al., Neuroendocrinology 2016).

NET des Jejunum/Ileum, des Colon und des Pankreas sind bereits bei Diagnosestellung häufig metastasiert und weisen in 40-45% bereits Lebermetastasen auf (Niederle MB et al., Endocr Relat Cancer 2010; Frilling A et al., Lancet Oncol 2014). Das 5-Jahres-Überleben von NET des Jejunum/Ileum und NET des Pankreas im Stadium IV beträgt in verschiedenen Analysen zwischen 50,0 bis 84,8 % bzw. 27,0 bis 40,9 % (Yao JC et al., J Clin Oncol 2008; Modlin IM et al., Cancer 2003; Jann H et al., Cancer 2011). Das 5-Jahres-Überleben von typischen Karzinoiden der Lunge und atypischen Karzinoiden der Lunge im Stadium IV beträgt in verschiedenen Analysen nur zwischen 25,6 bis 27,0 % (Yao JC et al., J Clin Oncol 2008; Modlin IM et al., Cancer 2003).

1.1.5 Diagnostik

Tumormarker

Für die Verlaufskontrolle der NET spielt die Bestimmung von Tumormarkern im Blut eine große Rolle. Klinischer Standard ist die Bestimmung von CgA im Serum bei allen NET. Der Serumspiegel von CgA korreliert mit der Tumormasse (Nölting S et al., Cancers 2012) und mit dem Ansprechen auf die Therapie (Arnold R et al., Clin Gastroenterol Hepatol 2008). Neuere Multipanel Tests wie der aus 51 mRNA Markern bestehende NETest® sind hinsichtlich ihres prädiktiven Werts den Monoanalyten wie CgA deutlich überlegen (Oberg K, Modlin IM et al., Lancet Oncology 2015) und sollten in Zukunft im klinischen Alltag evaluiert werden.

Spezifische Hormone wie Insulin, C-Peptide, Pro-Insulin, Gastrin, VIP und Glucagon, sowie das katabole Stoffwechselprodukt vom Serotonin 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES), werden indikationsbezogen bei V.a. einen „funktionell aktiven NET“ jeweils eingesetzt (Fottner C & Weber MM, Internist 2012; Ramage IK et al., Gut 2012).

Bildgebende Verfahren

Für die Lokalisation des Primarius und der eventuellen Metastasen sind bildgebende Untersuchungen entscheidend. NET des Magens oder des Rektums können gut mit endoskopischen Verfahren untersucht werden. Mit der Gastroskopie kann man Neoplasien bis zum Treitz-Band identifizieren. Mit der Koloskopie kann man NET des Rektums, des Colons, sowie des terminalen Ileums diagnostizieren. Für die Diagnose von NET des Dünndarms können Kapselendoskopie und Doppelballon-Enteroskopie im Einzelfall gelegentlich hilfreich sein. Die Endosonographie ist ein endoskopisches Verfahren mit einer hohen Sensitivität für die Diagnose und für die präoperative Beurteilung von NET des Magens, Duodenums, sowie des Pankreas und des Rektums. Insbesondere können submukosale Läsionen diagnostiziert werden und wichtige Informationen für die Stadiation eruiert werden. Durch die Feinnadelbiopsie kann man Tumorgewebe für die histologische Begutachtung gewinnen. Vor allem ist die Endosonographie mit Feinnadelbiopsie bei NET des Pankreas hilfreich, besonders bei kleineren Herden. Die Sensitivität beträgt unter erfahrenen Endoskopikern 70-100% (Rockall AG et al., Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2007).

Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) sind bei der Erstdiagnose und bei dem follow-up von NET sehr wichtig, vor allem um die Ausdehnung der Tumormasse zu evaluieren und um Metastasen zu identifizieren (Sahani DV et al., Radiol 2013).

NET exprimieren in etwa 90% Somatostatin-Rezeptoren, insbesondere Typ 2 und Typ 5, und können somit, nach Injektion von radioaktiv markierten Somatostatinanaloga (SSA), die sich an die von der Tumorzelle exprimierten Rezeptoren binden, detektiert werden. Die Somatostatin-Rezeptor-basierte Bildgebung spielt bei den NET eine herausragende Rolle. Die bisherige Somatostatin-Rezeptor-basierte Szintigraphie (¹¹¹In-pentetreotide, OctreoScan®) wurde in den letzten Jahren durch die noch sensitivere Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/CT mit ⁶⁸Gallium-markierten SSA abgelöst (Treglia G et al., Endocrine 2012; Deppen SA et al., J Nucl Med 2016). Die ⁶⁸Ga-Dotatate-PET-CT kann ungefähr 30% mehr metastatische Läsionen im Vergleich zum OctreoScan diagnostizieren (Buchmann I et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007). Insbesondere können ösäre Metastasen und bisher okkulte Neoplasien, diagnostiziert werden (Prasad V et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging 2014).

1.1.6. Therapie

Chirurgie

Eine radikale chirurgische Therapie ist die Therapie der Wahl bei primären NET ± lokoregionäre Metastasen. Wenn Lebermetastasen vorhanden sind, kann eine chirurgische Tumormassereduktion erwogen werden, wenn > 90% der Tumormasse resektabel ist (Pavel M et al., Neuroendocrinology 2016). Eine palliative Chirurgie wird in bestimmten Fällen empfohlen: 1) Resektion des lebermetastasierten Primärtumors, wenn Symptome mit der Tumormasse korrelieren (besonders bei funktionell aktive Tumoren) (Pavel M et al., Neuroendocrinology 2016); 2) Resektion eines Primärtumor des Dünndarms, um einen Darmverschluss zu vermeiden; 3) wenn die Chirurgie andere weitere Behandlungen erlaubt, zum Beispiel lokoregionale therapeutische Behandlungen.

Systemische Therapie

Ziel der systemischen Therapie ist bei allen metastasierten NET die Tumorkontrolle und bei „funktionell aktiven NET“ zusätzlich die Kontrolle der spezifischen Symptome (Pavel M et al., Neuroendocrinology 2016).

Die medikamentöse Therapie ist unterschiedlich bei NET und NEC. Bei NET des Dünndarms kommen die SSA Octreotide (Rinke A et al. J Clin Oncol 2009) oder Lanreotide (Caplin ME et al. NEJM 2014), Interferon-alpha, die Radiorezeptorthherapie mit ¹⁷⁷Lutetium-DOTATATE und die molekular zielgerichtete Therapie mit Everolimus (Pavel M et al., Lancet 2011; Yao JC et al., Lancet 2016) jeweils als systemische Therapieoptionen in Frage (Pavel M et al., Neuroendocrinology 2016). Bei NET des Pankreas kommen das SSA Lanreotide (Caplin ME et al., NEJM 2014), Chemotherapie mit Streptozotocin/5-FU oder Capecitabin/Temozolomid, molekular zielgerichtete Therapie mit Everolimus (Yao JC et al., NEJM 2011) oder Sunitinib (Raymond E et al., NEJM 2011) und die Radiorezeptorthherapie mit ¹⁷⁷Lutetium-DOTATATE als systemische Therapieoptionen in Frage (Pavel M et al., Neuroendocrinology 2016).

Wenig differenzierte NEC (G3) werden dagegen als Standard mit Chemotherapie mit Cisplatin/Etoposid behandelt (Pavel M et al., Neuroendocrinology 2016).

Andere Therapiestrategien bei NET mit Lebermetastasen

In der letzten Zeit wurden außerdem vermehrt Therapiestrategien in der Behandlung von NET mit Lebermetastasen eingesetzt. Die Chirurgie bleibt die Therapie der Wahl bei gut differenzierten NET mit Lebermetastasen, wenn die Ausdehnung des Tumors in der Leber begrenzt ist. Nicht nur die klinischen Symptome verbessern sich, sondern das Gesamtüberleben verlängert sich durch die Chirurgie (Rossi RE et al., J Gastrointest Surg, 2012). Eine radikale Chirurgie der Lebermetastasen kann nur unter solchen Bedingungen stattfinden: 1) die Lebermetastase/n muss/müssen gut differenziert sein (G1), 2) ein Leberversagen muss ausgeschlossen werden, 3) Extrahepatische Metastasen müssen ausgeschlossen werden, 4) Morbidität und Mortalität des chirurgischen Verfahrens müssen gering sein. Auf Grund der häufigen Spätdiagnose und der multiplen Lebermetastasen ist somit eine radikale chirurgische Resektion in weniger als 20% der Patienten möglich (Frilling A et al., Endocr Rel Cancer 2012; Steinmüller T et al., Neuroendocrinology 2008). Außerdem sind Rezidive nach chirurgischen Verfahren bei NET mit Lebermetastasen sehr häufig (Sarmiento JM et al., J Am Coll Surg 2003).

Bei NET mit inoperablen Lebermetastasen können andere zytoreduktive Strategien benutzt werden. Diese sind lokoregionale Therapien: die arterielle Chemoembolisation (TACE), die Radiofrequenzablation (RFA) und die selektive interne Radiotherapie (SIRT). Diese Prozeduren können in der Kontrolle der Symptome sowie auch des Tumorwachstums hilfreich sein (Steinmüller T et al, Neuroendocrinology 2008).

Eine Lebertransplantation kann im Einzelfall bei ausgewählten Patienten diskutiert werden (Rossi RE et al., Ann Surg Oncol 2014), stellt jedoch in den allermeisten Fällen keine Therapieoption bei metastasierten NET dar (Pavel M et al., Neuroendocrinology 2016).

Zusammengefasst stehen heutzutage zahlreiche therapeutische Strategien zur Verfügung, um die Symptomen eines NET zu reduzieren und in der palliativen Situation um das Tumorwachstum zu reduzieren/verhindern. Eine komplette Remission gelingt allerdings nur bei einer lokalisierten NET-Erkrankung. Trotz einem bekannten hohen Prozentsatz von Rezidiven, gibt es aktuell keine adjuvante Therapie für NET mit R0 Status nach der Chirurgie (Kulke MH et al., J Clin Oncol 2011). Aus diesem Grund werden neue Therapiestrategien gesucht. Außerdem wäre auch bei Patienten mit einer Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN1), die eine hohe Wahrscheinlichkeit haben ein NET in ihrem Leben zu entwickeln, eine prophylaktische Therapie eine gute Option.

1.2. Antitumorogenes Potential von Aspirin

®Aspirin (Acetylsalicylsäure) ist seit mehr als hundert Jahren bekannt und wird weltweit in verschiedenen Indikationen wegen seiner antipyretischen, analgetischen, antiinflammatorischen und thrombozytenaggregationshemmenden Eigenschaften verwendet (Ugurlucan M et al., Recent Pat Cardiovasc Drug Discov 2012).

Aspirin ist ein nichtsteroidales entzündungshemmendes Medikament. Die wichtigste bekannte Wirkung von Aspirin ist die irreversible Hemmung der Cyclooxygenasen (COX) COX-1 und COX-2. Die Acetylierung an den aktiven Serinen 530 und 516 inhibiert die Prostaglandin- und Thromboxansynthese (Loll PJ et al., Nat Struct Biol 1995; Roth GJ et al., J Clin Invest 1975).

In letzter Zeit haben mehrere epidemiologische Studien gezeigt (Algra AM & Rothwell PM, Lancet Oncol 2012; Rothwell PM et al., Lancet 2012; Elwood PC et al., PLoS One 2016), dass Aspirin das Risiko und die Mortalität von verschiedenen Tumorerkrankungen reduzieren kann. Eine große Fall-Kontroll-Studie zeigte, dass eine niedrige Dosis von Aspirin (75 mg täglich) eine schützende Wirkung gegen die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms hatte (Din FV et al., Gut 2010). Eine systematische Metaanalyse, in der eine gute Übereinstimmung zwischen Fall-Kontroll-Studien und randomisierte kontrollierte Studien nachgewiesen werden konnte, zeigte, dass die regelmäßige Einnahme von Aspirin sowohl das Risiko eines kolorektalen Karzinoms, sowie das 20-Jahres-Risiko für Tod durch kolorektales Adenokarzinom reduzieren konnte (Algra AM & Rothwell PM, Lancet Oncol 2012). Eine gepoolte Analyse von 51 randomisierten kontrollierten Studien, welche die Kurzzeitwirkung von täglicher Aspirineinnahme auf Krebs untersuchte, zeigte, dass die Therapie mit Aspirin Krebstodesfälle reduzieren konnte, besonders nach Einnahme von Aspirin über 5 Jahren (Rothwell PM et al., Lancet 2012). In einer Metaanalyse, die 15 Fall-Kontroll-Studien und 15 Kohortenstudien analysierte, wurde nachgewiesen, dass unter Aspirin das Risiko eines kolorektalen Karzinoms sich um ~27% reduzieren konnte (Bosetti C et al., Ann Oncol 2012).

Eine aktuelle Review von Cuzick et al. zeigte, dass antitumorale Effekte von Aspirin sich erst nach mindestens 3-jähriger regelmäßiger Einnahme von 75 bis 325 mg Aspirin täglich ergeben (Cuzick J et al., Ann Oncol 2015).

Der antitumorale Mechanismus von Aspirin ist aber noch nicht vollständig verstanden (Dovizio M et al., Recent Results Cancer Res 2013). Ein sicherer antitumoraler Effekt von Aspirin ist durch die bekannte COX-Hemmung vermittelt (Bruno A et al., Best Pract Res Clin Gastroenterol 2012).

Eine abnormale Produktion von Prostaglandinen scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung der meisten epithelialen Tumoren aus Vorläuferläsionen spielt (Singh-Ranger G & Mokbel K, Eur J Surg Oncol 2002; Singh-Ranger G et al., Breast Cancer Res Treat 2008). Das gilt zum Beispiel für Mammakarzinom, Prostatakarzinom, sowie colorektales Karzinom. Sowohl Polypen des Colon als auch invasive kolorektale Karzinome enthalten erhöhte Prostaglandinkonzentrationen im Vergleich zu normalem Gewebe (Singh-Ranger G, Crit Rev Oncol Hematol 2016; Kettunen HL et al., Cancer Res 2003; Giardiello FM et al., Gastroenterology 2004). Sandler RS et al. zeigten in einer randomisierten doppelblinden Studie, wie die tägliche Einnahme von Aspirin mit einer signifikanten Reduktion der Inzidenz von kolorektalen Adenomen in Patienten mit früheren kolorektalen Krebs korrelierte (Sandler RS et al., NEJM 2003).

Als anderer Mechanismus wurde nachgewiesen, dass Aspirin die *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Signalkaskade in Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms hemmen kann (Din FV et al., Gastroenterology 2012).

Es wurde gezeigt, dass eine Mutation von *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha* (PI3KCA) das Ansprechen eines Tumors auf Aspirin verbessern könnte (Domingo E et al., J Clin Oncol 2013; Liao X et al., NEJM 2012, Kothari N et al., Acta Oncologica 2014). Eine signifikante Reduktion der Mortalität kann man in der Tat in Tumoren mit mutierten PI3KCA beobachten, während es unklar bleibt, ob Patienten ohne Mutation von Aspirin profitieren können. Mutiertes PI3KCA könnte ein nützlicher Biomarker für eine adjuvante Therapie mit Aspirin werden (Langley RE & Rothwell PM, Nat Rev Clin Oncol 2013).

Li L et al. schlagen einen anderen Wirkungsmechanismus von Aspirin in vivo vor: sie zeigen, wie Aspirin das Wachstum von Ovarialkarzinom in Ratten mit mutiertem Protein p53 hemmen kann, möglicherweise durch eine Hochregulation von der Expression von Caspase 3 und durch eine Herunterregulation von der Expression von *B-cell lymphoma 2* (BCL-2) (Li L et al., Oncol Lett 2016).

Vor kurzem wurde auch nachgewiesen, wie niedrig dosiertes Aspirin eine „Therapie induzierte Seneszenz“ in Zellen vom Kolorektalkarzinom durch Manipulation des Sirtuin 1-Wegs (SIRT 1) direkt verursachen könnte (Jung YR et al., Mol Pharmacol 2015).

Eine Inhibition des Tumorzellwachstums durch Aspirin wurde auch in vitro, sowie in vivo in Mäusen mit Ösophaguskarzinom gezeigt (Piazuelo E et al., Dig Dis Sci 2016). Eine Beobachtungsstudie zeigte, dass die Einnahme von Aspirin nach der Diagnose von Ösophaguskarzinom mit einer höheren Überlebensrate korreliert (Van Staalduinen J et al., Br J Cancer 2016). Randomisierte klinische Studien sind erforderlich, um dies zu überprüfen.

In einer großen amerikanischen Kohortstudie, die langfristige Einnahme von Aspirin wurde mit einem bescheidenen, aber deutlich reduzierten Risiko von Krebs assoziiert, vor allem von Magen-Darm-Tumoren. In derselben Studie, war die regelmäßige Einnahme von Aspirin nicht mit dem Risiko für Brust-, fortgeschrittenem Prostata- oder Lungenkrebs assoziiert (Cao Y et al., Yama Oncol 2016).

Eine vor kurzem publizierte retrospektive Studie zeigte wie niedrig dosiertes Aspirin mit einem verbesserten Überleben bei Frauen mit Endometriumkarzinom verbunden ist, vor allem bei jungen, übergewichtige Frauen, mit Low-Grade-Tumoren, und die eine postoperative Strahlentherapie erhielten (Matsuo K et al., Obstet Gynecol 2016).

Aspirin scheint auch adjuvante Wirkungen zu haben: dies erscheint vor allem durch Inhibition des Tumorwachstums und der Tumorangiogenese, durch Aktivierung von DNA-Mismatch-Reparatur und Apoptose, sowie Verzögerung der Metastasierung möglich zu sein (Chan AT et al., JAMA 2009; Langley RE et al., Brit J Cancer 2011).

Eine große observationelle Kohortenstudie zeigt wie die regelmäßige Einnahme von Aspirin nach der Diagnose von Kolorektalkarzinom mit einer verbesserten Tumor-assoziierten-Überlebenszeit, sowie mit der Gesamtüberlebenszeit korreliert (Bains SJ et al., J Clin Oncol 2016).

Zurzeit gibt es auch laufende randomisierte und oft multizentrische Studien, die das antitumorale Potential von Aspirin untersuchen. Ziel einer dieser Studien ist zum Beispiel die Wirksamkeit von Aspirin als prophylaktische Therapie in Patienten mit Hochrisiko auf Prostatakarzinom zu testen (<https://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT02757365). Mehrere laufende Studien haben als Ziel die adjuvante Wirksamkeit von Aspirin zu überprüfen. Insbesondere wird den Einfluss von Aspirin auf Rezidiv und Überlebenszeit in Patienten mit Kolorektalkarzinom in Stadium II und III getestet (<https://clinicaltrials.gov>; Identifiers: NCT02607072; NCT02467582; NCT02301286, NCT02804815), sowie auch in Patienten mit Brustkrebs und Prostatakarzinom (<https://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT02804815). Die Ergebnisse werden voraussichtlich ab 2020 publiziert werden.

1.3. PI3K-AKT-mTOR Signalkaskade in NET

Unter den aktuellen therapeutischen Strategien für metastasierte NET steht die zielgerichtete Hemmung der PI3K-Proteinkinase B (AKT)-mTOR Signalkaskade zur Verfügung. Pankreatische NET weisen etwa in 15% Mutationen in der PI3K-AKT-mTOR Signalkaskade auf (Jiao Y et al., Science 2011). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass die Mehrzahl der NET eine Überaktivierung der PI3K-AKT-mTOR Signalkaskade aufweisen und Tumoren mit überaktivierten pAKT eine erhöhte antitumorale Empfindlichkeit bezüglich der mTOR Hemmung aufweisen (Meri-Bernstam F et al., Clin Cancer Res 2012). Präklinische Daten haben auch das antitumorogene Potential durch die Hemmung von mTOR in verschiedenen neuroendokrinen Zellmodellen gezeigt (Zitzmann K et al., Neuroendocrinology 2007; Grozinsky-Glasberg S et al., Neuroendocrinology 2008). In drei großen klinischen Phase 3 Studien wurde nachgewiesen, dass der mTOR Inhibitor Everolimus in pankreatischen NET (Yao JC et al., N Engl J Med 2011), in NET mit Karzinoidsyndrom (Pavel ME et al., Lancet 2011) und in nicht-funktionellen NET des GI-Trakts und der Lunge (Yao JC et al., Lancet 2016) das progressionsfreie Überleben jeweils verlängern konnte. Everolimus ist zur Therapie von NET des Pankreas sowie zur Therapie von NET des GI-Trakts und NET der Lunge jeweils zugelassen.

Ziele dieser Arbeit sind die antiproliferative Effekte von Aspirin auf pankreatische, intestinalen und bronchopulmonale neuroendokrinen Tumorzellen zu beschreiben, sowie die intrazelluläre Signalkaskaden in neuroendokrinen Tumorzellen unter der Wirkung von Aspirin zu untersuchen.

Insbesondere wird die *in vitro* Wirkung von Aspirin auf die Signalwege PI3K-AKT-mTOR und *Rat sarcoma (Ras)-rapid accelerated fibrosarcoma (Raf)-MAP/ERK Kinase (MEK)-extracellular signal regulated kinase (ERK)* untersucht. Wachstumsfaktoren können an Rezeptor-Thyrosinkinase binden und so eine Dimerisierung mit anschließender Autophosphorylierung der Rezeptoren verursachen. An diesen phosphorylierten Stellen des Rezeptors können dann weitere Moleküle binden und ebenfalls phosphoryliert werden. PI3K wird auf dieser Weise phosphoryliert und damit aktiviert. Die aktive PI3K kann dann bestimmte Stellen von Membranlipiden phosphorylieren und somit aktivieren. So kann PI3K die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat katalysieren. Diese Phosphorylierung bewirkt wiederum die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase AKT. AKT muss sowohl an Thr 308 als auch an Ser 473 phosphoryliert sein, um vollständig aktiviert zu werden. AKT kann viele Substrate aktivieren oder inhibieren und somit viele Abläufe in der Zelle beeinflussen. Ein wichtiges Target von AKT ist mTOR-Komplex 1 (mTORC1). Dieser Komplex kann Apoptose, Proliferation und Zellwachstum über eine Modulation des Zellzyklus beeinflussen. Mittels Aktivierung von 4E-bindendes Protein (4-EBP1) und P70 ribosomale Protein S6 Kinase (p70 S6K) vermittelt mTOR den Übergang von der G1- in die S-Phase (**Abb. 1**).

Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg führt über eine Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase zu einer Weiterleitung der extrazellulären Signale an Ras. Es kommt zu einer Abfolge von Phosphorylierungen, die mit der Aktivierung von Serin/Threonin-Kinase Raf beginnt. Raf verursacht wiederum die Aktivierung von MEK, worauf es zu einer Phosphorylierung von ERK kommt. Dies führt zu Aktivierung zahlreicher weiterer Substrate, welche dadurch Einfluss auf verschiedene Zellfunktionen haben (**Abb. 1**).

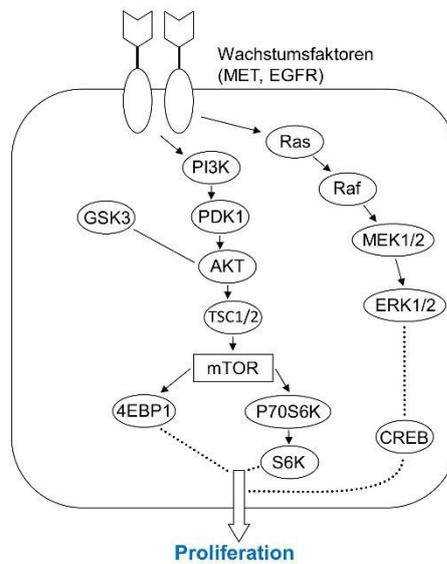


Abb. 1: Durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren werden verschiedene Signalwegen aktiviert, die Wirkung auf die Zellproliferation haben. In diesem Bild werden die Signalwege PI3K-AKT-mTOR und Ras/Raf/MEK/ERK schematisch dargestellt.

Legende:

AKT: Proteinkinase B

CREB: cAMP response element-binding protein

4EBP1: 4E-bindendes Protein 1

EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

ERK: extracellular-signal regulated Kinase

GSK3: Glykogensynthase-Kinase 3

MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase

MET: Mesenchymal-epithelialer Transitionsfaktor

mTOR: Mammalian target of rapamycin

P70S6K: P70 ribosomale Protein S6 Kinase

PDK1: protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1

PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase

RAF: rapid accelerated fibrosarcoma

RAS: Rat sarcoma

S6K: ribosomale Protein S6 Kinase

TSC: Tuberöses Skleroseprotein

2. MATERIAL UND METHODEN

Material

Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12 (DMEM)/F12 Medium, Penicillin und Streptomycin wurden von Gibco by Life Technologies (Paisley, United Kingdom) erworben.

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurden bei PAA (Pasching, Austria) bestellt.

Fetales Kälberserum (FKS) und Amphotericin B wurden von Biochrom (Berlin, Germany) gekauft. Amphotericin B wurde als Anti-Mycoticum eingesetzt, und wurde in einer Konzentration von 250 µg/ml als fertige Lösung erworben. Es wurde 0,4% in Medium eingesetzt (1µg/ml).

Insulin wurde von Sanofi-Aventis erworben (Insuman Rapid, 40 I.E./ml Durchstechflasche, Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland). Es wurden 1,68 ml in 500 ml Medium eingesetzt (0,135 I.E./ml).

Apo-Transferrin wurde von Sigma-Aldrich erworben (apo-Transferrin 100mg, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und ein Stock von 12,5µM bzw. 1mg/ml in H₂O hergestellt. Der Stock wurde 1/200 in Medium verdünnt auf eine Endkonzentration von 62,5 nM bzw. 5 µg/ml.

Aspirin wurde von Sigma-Aldrich (St. Louis, United States) bezogen. Aspirin wurde eingewogen (100mg) und in 37 ml Medium gelöst, danach sterilfiltriert bis zur Entstehung einer Stock Solution (15mmol).

Zellkultur

Humane neuroendokrine pankreatische Tumorzellen BON1 (Evers BM et al., Gastroenterology, 1991) wurden ursprünglich freundlicherweise von Göke R (Marburg, Germany) überlassen und im DMEM/F12 (1:1) Medium kultiviert (Zitzmann K et al., Neuroendocrinology 2007). Humane bronchopulmonale neuroendokrine Tumorzellen NCI-H727 wurden von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, United States) bezogen. Humane Mitteldarmkarzinoidzellen GOT1 (Kölby L et al., Am J Pathol 2001) wurden freundlicherweise von Ola Nilsson (Göteborg, Sweden) zur Verfügung gestellt. NCI-H727 und GOT1 Zellen wurden jeweils im RPMI Medium kultiviert (Zitzmann K et al., Neuroendocrinology 2007). Alle Medien wurden mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,4% Amphotericin B ergänzt. Das Kulturmedium für GOT1 wurde auch mit 0,135 IU/ml Insulin und 5 µg/ml Apo-Transferrin supplementiert.

Alle 3 NET Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, in Wasserdampf-gesättigter und 5% CO₂ enthaltender Atmosphäre kultiviert. Um das Risiko von Kontaminationen zu verhindern, erfolgten alle Arbeiten an den Zellkulturen an einer Sicherheitswerkbank. BON1, NCI-H727 und GOT1 wurden in den Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe 175 cm² (Falcon, München, Deutschland) kultiviert.

Die Zellzahl wurde mittels einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wurden die toten Zellen durch eine Trypanblau-Färbung (Endkonzentration 0,2%, Sigma-Aldrich, Deutschland) ausgeschlossen.

Zellviabilität

Für die Zellviabilitäts-Versuche wurden BON1- und NCI-H727-Zellen auf 96-Loch-Platten ausgesät, mit einer Zelldichte von ~750 Zellen/Loch und daraufhin für 24 Stunden herangezüchtet. Auf Grund ihres langsamen Wachstums wurden GOT1-Zellen bei einer Zelldichte von 50000 Zellen/Loch ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Aspirin in Kulturmedium mit 10% FKS inkubiert. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mittels Zellproliferationstest Cell Titer 96 Aqueous One Solution (Promega), nach 72, 144 und 216 Stunden Inkubation, entsprechend der Herstellerinstruktionen, gemessen. Nach 3 Stunden Inkubation mit Cell Titer 96 (20 µl Cell Titer in jedem Well) wurde die Proliferationsrate bei einer Extinktion von 492 nm im Photometer bestimmt. Es wurde ein „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) Plattenlesegerät (Photometer Sunrise von der Firma Tecan, Männergdorf, Deutschland) verwendet.

SYBR-DNA-labeling assay

Ein synergy brands (SYBR)-DNA-Markierungsversuch, wurde genau wie der Proliferation-Assay mit Cell Titer 96 durchgeführt.

Der Assay wurde nach den angegebenen Zeitabständen beendet. Die Zellen wurden daraufhin mit PBS gewaschen und für 40 Minuten mit destilliertem Wasser inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 100 µl/Loch vom SYBR® Green I (Lonza, Rockland, United States), 1:500 im distillierten Wasser verdünnt, für 5 Minuten gefärbt. Später wurden sie durch Cytofluorimetrie bei einer Extinction von 530 und 485 nm quantifiziert. Zur Messung wurde ein CytoFluor® Multi-Well Plate Reader Series 4000 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, United States) benutzt.

Zellzyklusanalyse

Mittels Propidiumiodidfärbung (PI) und Durchflusszytometrie wurden die Verteilung der Zellen im Zellzyklus, sowie der Prozentsatz von Zellen in Apoptose gemessen.

Die Zellen wurden in 6-Loch Platten kultiviert (3×10^5 BON1 Zellen/Loch und 4×10^5 NCI-H727 Zellen/Loch) und mit Aspirin in verschiedenen Konzentrationen, wie oben beschrieben behandelt. Danach wurden sie mit PBS gewaschen und mit 400 µl Trypsin bei 37°C für 4 Minuten behandelt. Als nächster Schritt wurden die Zellen dann gesammelt und bei 2000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Pelletts wurden mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit 350 µl PI resuspendiert und konnten somit mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Es wurde ein BD Accuri C6 Flow Cytometer-Gerät angewendet. Zellkerne, die links vom G0/1-Gipfel fielen, welche hypodiploide DNA enthielten, wurden als apoptotisch erachtet.

Proteinextraktion und Western Blot-Analyse

Um die Wirkung von Aspirin auf NET-Zelllinien auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden BON1 (3×10^5 Zellen/Loch), NCI-H727 (4×10^5 Zellen/Loch) und GOT1 (1×10^6 Zellen/Loch) auf 6-Loch-Platten kultiviert. Nach 24 Stunden Wachstum in 1ml komplettem Kulturmedium, wurde das Kulturmedium durch frisches serumfreies Kulturmedium ausgewechselt. Die Zellen wurden dann mit Aspirin in verschiedenen Konzentrationen (1 und 5 mMol) für

die angegebenen Zeiten kultiviert. Die Zellen wurden später in 200 µl Lysepuffer (M-PER® mammalian Protein Extraction Reagent mit Zusatz von Halt TM Protease Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA frei, Thermo Scientific, Rockford, United States) lysiert. Die Lysate wurden bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und die Überstände wurden auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt (20-50 µg/50 µl) (Rotiquant Universal, Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Natriumdodecylsulfat (SDS) Probenpuffer (0,25 mol/l Tris HCl, 40% Glycerin, 2% SDS, 1% Dithiothreitol und Bromphenolblau, pH 8,8) wurde hinzugefügt und die Proben aus der Proteinextraktion wurden für 5 Minuten aufgekocht und auf einem SDS-Polyacrylamid Gel getrennt. Die Proteine wurden mit der Verwendung von einer halbtrockenen Western-Blot-Transfertechnik für 60 Minuten auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) - Membran (Immobilone; Millipore, Eschborn, Germany) elektrotransferiert. Die Membranen konnten dann in einem Milchpulver-Puffer geblockt werden und über Nacht bei Raumtemperatur dem jeweiligen Erstantikörper ausgesetzt werden (siehe **Tabelle 2**).

Nachher konnte die Membran mit PBS gewaschen werden und mit Peroxidase-koniugierten Zweitantikörper (1:25000) für 2 Stunden inkubiert werden. Beim nächsten Schritt wurde die Membran mit dem Super Signal West Dura Chemolumineszenz Substrat (Thermo Scientific, Rockford, United States), benetzt und im Anschluss die dabei entstehende Chemolumineszenz auf dem Super RX-X-ray film (FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan) festgehalten.

Primärer Antikörper	Hersteller
Anti-pAKT (Ser 473), #4060	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-AKT, #2920	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pERK (Thr202/Tyr204)1/2, #4370	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pP70S6K (Thr389), #9234	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-P70S6K, #9202	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-p4EBP1 (Ser65), #9451	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-4EBP1, #9644	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pS6 (Ser235/6), #4858	Cell Signaling, Danvers, MA USA
Anti-pS6 (Ser240/4),#5364	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti S6, #2317	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pGSK3 (Ser21/9), #9331	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-GSK3, #9315	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pCREB (Ser133), #9198	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-CREB, #9197	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pmTOR (Ser2448), #2971	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-mTOR, #2972	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-CDK4, #2906	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Cyclin D3, #2936	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pEGFR (Tyr1068), #3777	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-EGFR, #4267	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pMET (Tyr1234/1235), #3077	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-MET, #3127	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-pTSC2 (Thr1462), #3617	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-TSC2, #4308	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-ERK ½, 06-182	Millipore, Massachusetts, USA
Anti-p21cip, 610233	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA

Tabelle 2: Verwendete Erstantikörper

Statistik

Die statistische Analyse für die Proliferationsassays und Zellzyklusanalysen erfolgte mittels zweiseitigen t-Tests. Dabei wurde $P < 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 oder 4 unabhängig durchgeführten Versuche dargestellt.

3. ERGEBNISSE

Aspirin hemmt die Zellproliferation von neuroendokrinen Tumorzellen

Die Inkubation von humanen pankreatischen NET Zellen BON1 mit Aspirin führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Suppression der Zellvitalität (**Abb. 2**). Deutliche Wirkungen wurden bereits bei Aspirin Dosierungen von 0,5 und 1 mmol/l gezeigt. Die stärkste Suppression der Zellvitalität wurde bei der höchsten getesteten Dosis von Aspirin beobachtet (5 mmol/l). Bei Cell Titer Versuchen reduzierte die Behandlung mit Aspirin 1 mmol/l für 72, 144 und 216 Stunden die Zellvitalität jeweils auf $78\% \pm 10\%$ ($P < 0,05$), $66\% \pm 13\%$ ($P < 0,05$) und $50\% \pm 2\%$ ($P < 0,001$) (**Abb. 2A**). Analoge Ergebnisse wurden auch mit den SYBR green Versuchen erreicht (**Abb. 2B**).

Die Behandlung von humanen bronchopulmonalen Karzinoidtumorzellen NCI-H727 mit den gleichen Konzentrationen von Aspirin führte auch zu einer zeit- und dosisabhängigen Reduktion der Zellvitalität (**Abb. 3**). Signifikante Effekte wurden in dieser Zelllinie bei einer initialen Aspirin Dosis von 0,5 und 1 mmol/l beobachtet. Die stärkste Wirkung konnte bei der höchsten getesteten Aspirin Konzentration von 5 mmol/l gezeigt werden. Die Behandlung mit Aspirin 1 mmol/l für 72, 144 und 216 Stunden supprimierte bei den Cell Titer Versuchen die Zellvitalität jeweils auf $85\% \pm 19\%$ ($P = 0,227$), $53\% \pm 8\%$ ($P < 0,01$) und $42\% \pm 39\%$ ($P = 0,129$) (**Abb. 3A**). Analoge Effekte wurden bei den SYBR green Versuchen gezeigt (**Abb. 3B**).

Die Behandlung der aus dem humanen Mitteldarm stammenden neuroendokrinen GI-Tumorzellen GOT1 mit Aspirin führte auch zu einer zeit- und dosisabhängigen Reduktion der Zellvitalität (**Abb. 4**). Signifikante Wirkungen wurden bei dieser Zelllinie unter der initialen Aspirin Dosis von 1 mmol/l gezeigt. Der stärkste Effekt wurde bei der höchsten getesteten Aspirin Konzentration von 5 mmol/l beobachtet. Die Behandlung mit Aspirin 2,5 mmol/l für 72, 144 und 216 Stunden supprimierte bei den Cell Titer Versuchen die Zellvitalität jeweils auf $90\% \pm 4\%$ ($P < 0,05$), $78\% \pm 4\%$ ($P < 0,01$) und $81\% \pm 11\%$ (NS) (**Abb. 4**). Aufgrund der schweren Kultivierbarkeit und geringen Verfügbarkeit der GOT1 Zellen wurde auf parallele Versuche mit SYBR green Assay verzichtet.

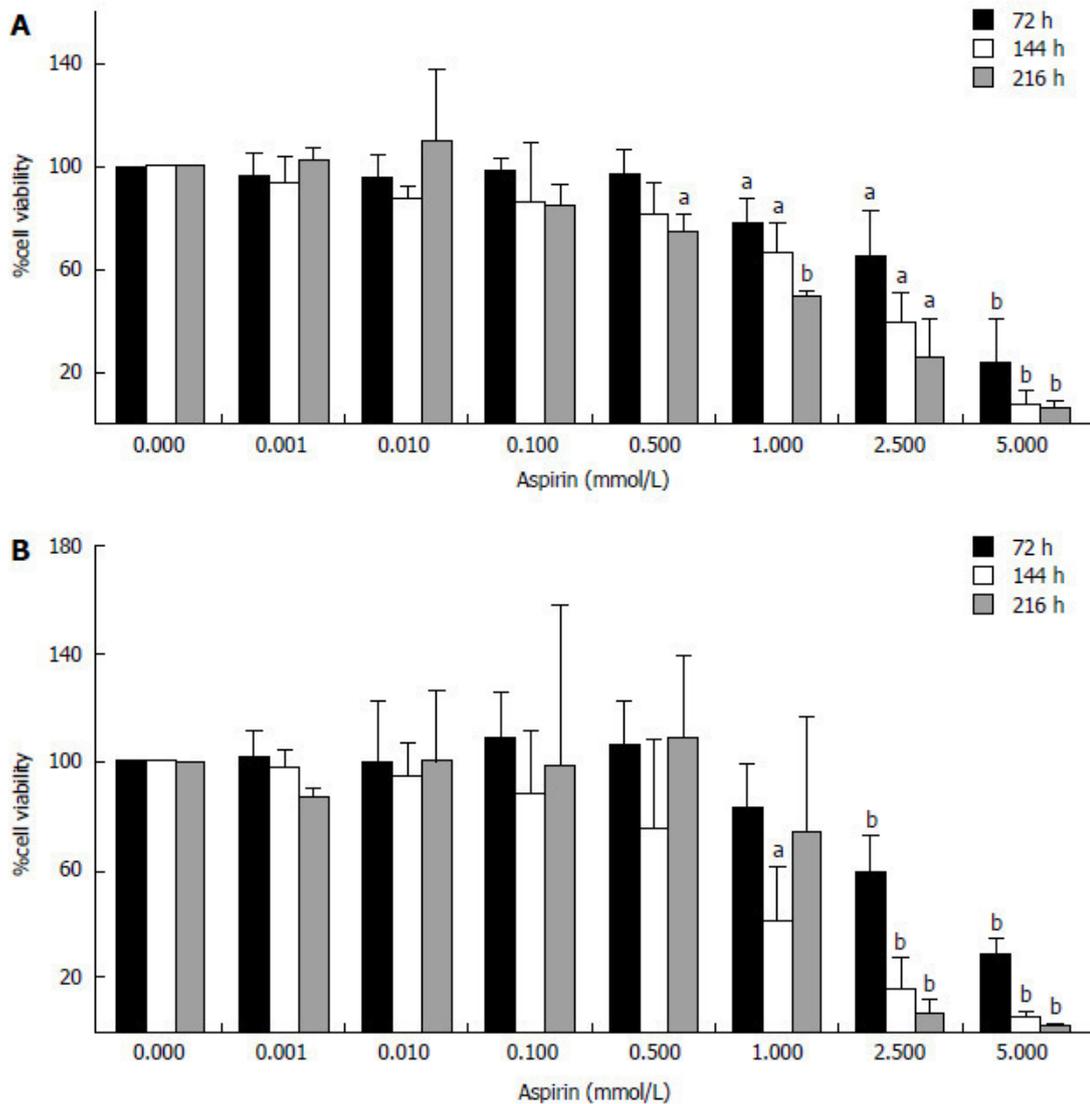


Abb. 2: Suppression der Zellvitalität von neuroendokrine Zellen BON1 durch Aspirin. Humane pankreatische BON1 Tumorzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Aspirin für 72, 144 und 216 Stunden behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde durch die Quantifizierung der Stoffwechselaktivität mittels Cell Titer 96 kit (Promega) (A) sowie durch DNA basierte Markierungsexperimente mittels SYBR green (Lonza) (B) gemessen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 verschiedenen und unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt. ^aP < 0,05, ^bP < 0,01 vs unbehandelt.

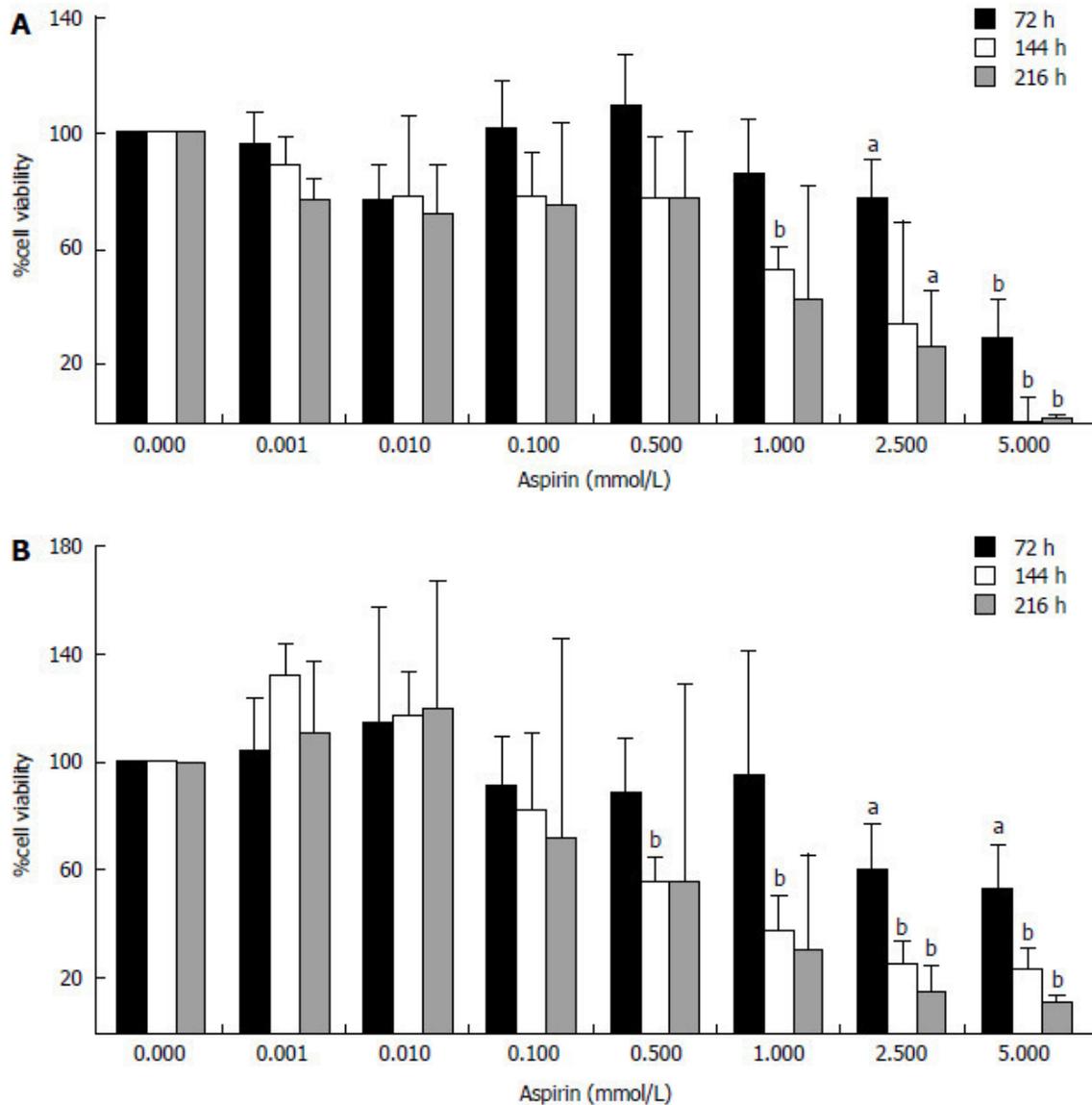


Abb. 3: Suppression der Zellvitalität von neuroendokrine Zellen NCI-H727 durch Aspirin. Humane bronchopulmonale NCI-H727 Tumorzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Aspirin für 72, 144 und 216 Stunden behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde durch die Quantifizierung der Stoffwechselaktivität mittels Cell Titer 96 kit (Promega) (A) sowie durch DNA basierte Markierungsexperimente mittels SYBR green (Lonza) (B) gemessen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 verschiedenen und unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt. ^aP < 0,05, ^bP < 0,01 vs unbehandelt.

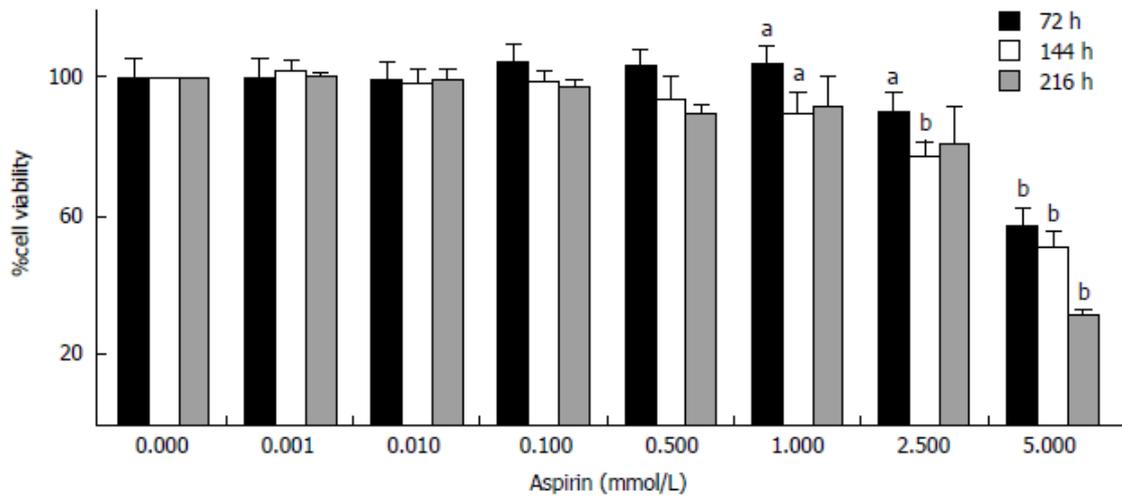


Abb. 4: Suppression der Zellvitalität von neuroendokrine Zellen GOT1 durch Aspirin. Humane GI-Trakt GOT1 Tumorzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Aspirin für 72, 144 und 216 Stunden behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde durch die Quantifizierung der Stoffwechselaktivität mittels Cell Titer 96 kit (Promega) gemessen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von 4 verschiedenen und unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt. ^aP < 0.05, ^bP < 0,01 vs unbehandelt.

Zeit- und dosisabhängige Effekte von Aspirin auf PI3K/AKT/mTOR-Signalweg in neuroendokrinen Tumorzellen

Es wurde in der Literatur berichtet, dass Aspirin die mTOR-Signalkaskade in Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms hemmen kann (Din FV et al., Gastroenterology 2012). Um die Mechanismen der Aspirin-vermittelten Hemmung der Zellvitalität von neuroendokrinen Zellen zu untersuchen, haben wir deshalb die zeit- und dosisabhängigen Effekte von Aspirin auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg analysiert. Um dies zu untersuchen haben wir das Effekt von Aspirin auf die Phosphorylierung von 2 direkte Substrate von mTOR analysiert: 4EBP1 und P70S6K.

Die Behandlung von humanen pankreatischen BON1 Zellen (**Abb. 5A**) mit zunehmenden Konzentrationen von Aspirin für 24 und 48 Stunden führte zu einer moderaten Hemmung der Phosphorylierung von 4EBP1 und P70S6K, besonders nach 48 Stunden, und zu einer ausgeprägten Suppression der S6 Phosphorylierung. Ähnliche Effekte wurden bei der Behandlung mit Aspirin von bronchopulmonalen neuroendokrinen NCI-H727 Zellen (**Abb. 5B**), sowie von Darm- GOT1 Zellen (**Abb. 5C**) gezeigt.

Wir untersuchten auch die Effekte von Aspirin auf die Phosphorylierung der Proteine oberhalb von mTOR in der Signalkaskade. Die Behandlung mit Aspirin verursachte in allen drei Zelllinien die Phosphorylierung von AKT und von tuberösem Skleroprotein vom Typ 2 (TSC2) in einer dosisabhängigen Weise. Eine leichte Phosphorylierung von mTOR (Serin 2448) wurde auch gezeigt (**Abb.6**).

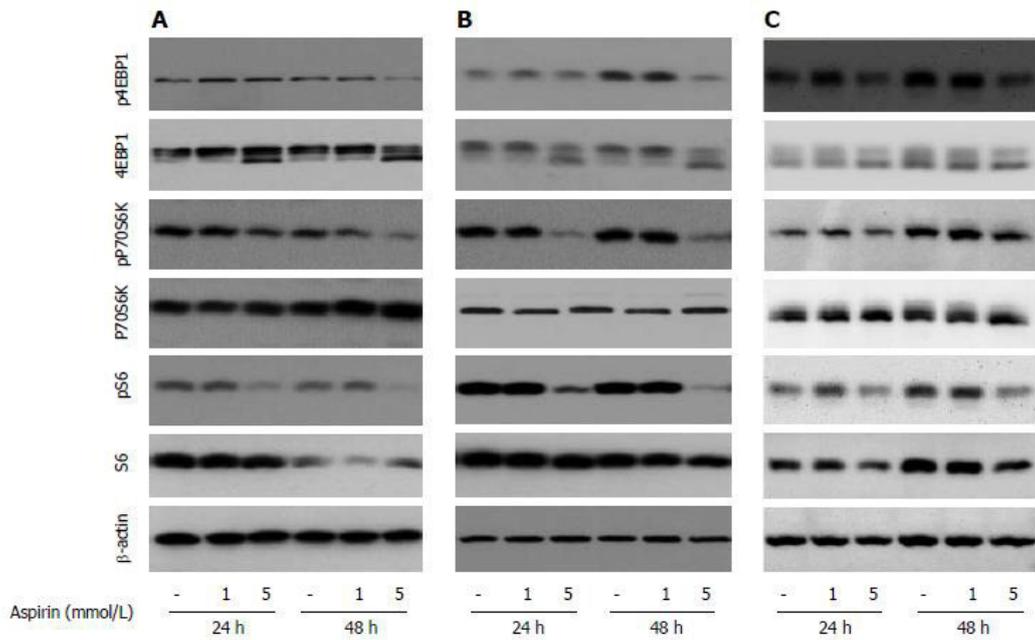


Abb. 5: Effekte von Aspirin auf den mTORC1-Signalweg in NET-Zellen BON1, NCI-H727 und GOT1. BON1 (A), NCI-H727 (B) und GOT1 (C) Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Aspirin für 24 und 48 Stunden behandelt. Die Expression von p4EBP1, 4EBP1, pP70S6K, P70S6K, pS6, S6 und β-Aktin-Ladekontrolle wurden anschließend durch Western Blot-Analyse ausgewertet. Hier wird ein repräsentativer Blot von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt.

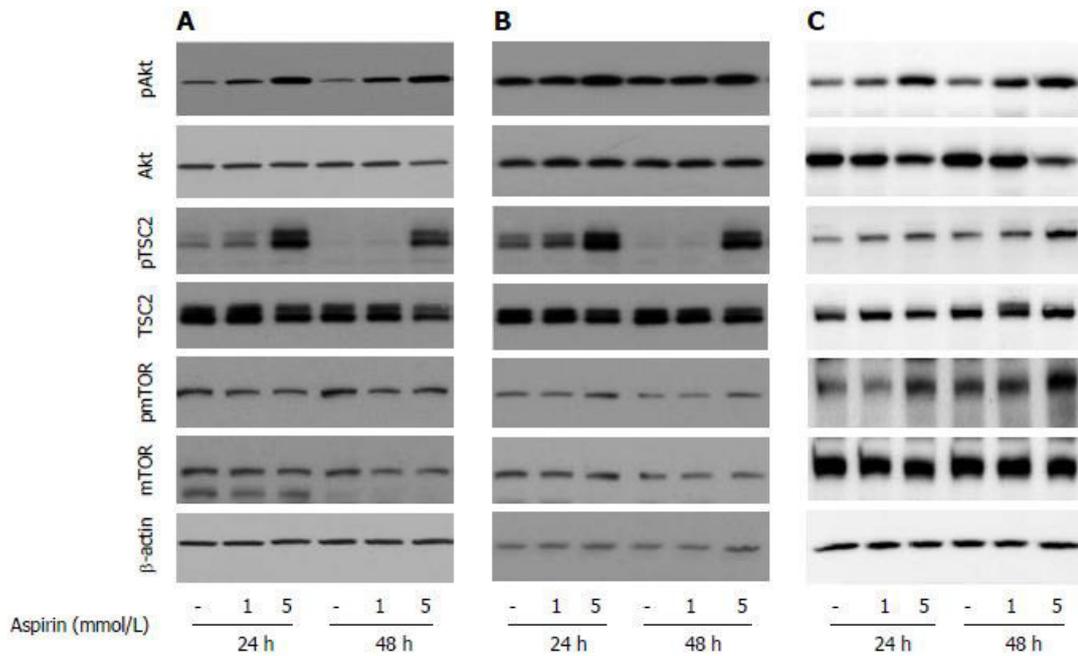


Abb. 6: Effekte von Aspirin auf AKT/mTORC-Signalweg in NET-Zellen BON1, NCI-H727 und GOT1. Pankreaszellen BON1 (A), bronchopulmonale Zellen NCI-H727 (B) und Darmzellen GOT1 (C) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Aspirin für 24 und 48 Stunden behandelt. Die Expression von pAkt, Akt, pTSC2, TSC2, pmTOR, mTOR und β -Aktin-Ladekontrolle wurden anschließend durch Western Blot-Analyse ausgewertet. Hier wird ein repräsentativer Blot von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt.

Zeit- und dosisabhängige Effekte von Aspirin auf ERK, GSK3 und Wachstumsfaktoren in neuroendokrinen Tumorzellen

Wir untersuchten auch die Wirkung von Aspirin auf die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signaltransduktionswege, insbesondere die Effekte von Aspirin auf *extracellular-signal regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) und auf *cAMP response element-binding protein* (CREB), beide Mitglieder der Signalkaskade Ras/Raf/MEK/ERK. Außerdem wurde auch die Wirkung von Aspirin auf die Phosphorylierung von der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK 3) untersucht, ein weiteres Protein mit wichtiger Rolle in den Signalkaskaden, die die Zellproliferation und Zellüberleben beeinflussen.

Die Behandlung von pankreatischen BON1 Zellen mit Aspirin verursachte die Phosphorylierung von ERK1/2 und von CREB, in einer zeit- und dosisabhängigen Weise (**Abb. 7A**). Die Inkubation von BON1 Zellen mit Aspirin führte auch zur Phosphorylierung von der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) (**Abb. 7A**). Analoge Effekte wurden auch bei bronchopulmonalen Zellen NCI-H727 (**Abb. 7B**) und tumoralen Darmzellen GOT1 (**Abb. 7C**) gezeigt.

Als nächster Schritt wurde die Wirkung von Aspirin auf die Wachstumsfaktoren *Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor* (EGFR) und *Mesenchymal-epithelialer Transitionsfaktor* (c-MET) untersucht, beide aktiv oberhalb der schon untersuchten Signalkaskaden PI3K-AKT-mTOR und Ras/Raf/MEK/ERK Signalkaskaden. Die Aktivierung von ERK und GSK Signalwege in BON1, NCI-H727 und GOT1 Zellen, war nicht die Folge einer erhöhter Aktivierung durch Wachstumsfaktoren am Anfang der Signalkaskade. Aspirin supprimierte im Gegenteil die Phosphorylierung der tumoralen Wachstumsfaktoren EGFR und c-MET (**Abb. 8A und B**).

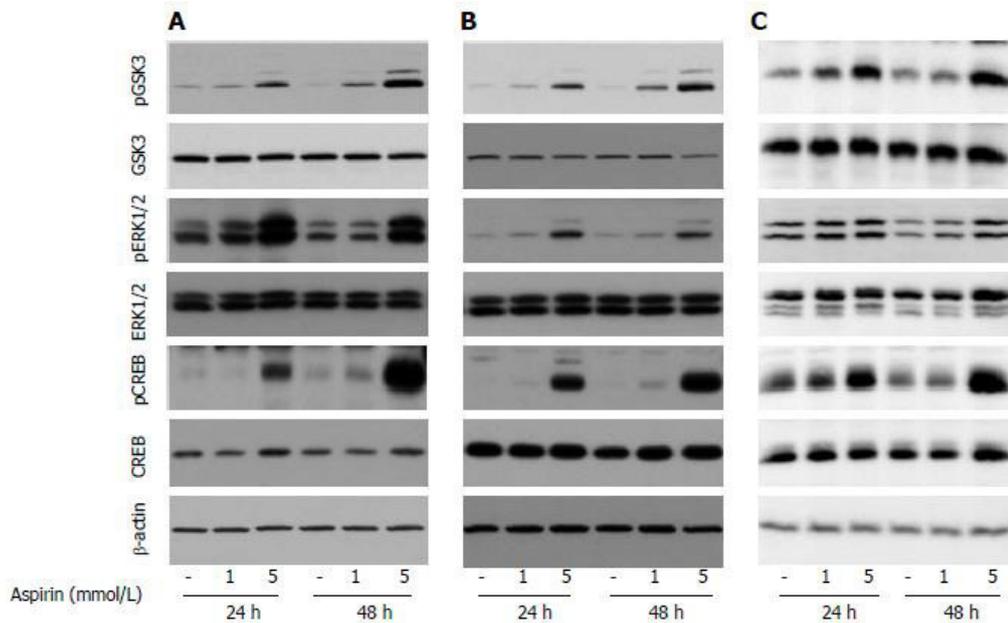


Abb. 7: Effekte von Aspirin auf GSK3 und ERK1/2 in NET-Zellen BON1, NCI-H727 und GOT1. Humane Pankreaszellen BON1 (A), bronchopulmonale Zellen NCI-H727 (B) und Darmzellen GOT1 (C) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Aspirin für 24 und 48 Stunden behandelt. Die Expression von pGSK3, GSK, pERK1/2, ERK 1/2, pCREB, CREB und β -Aktin-Ladekontrolle wurden anschließend durch Western Blot-Analyse ausgewertet. Hier wird ein repräsentativer Blot von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt.

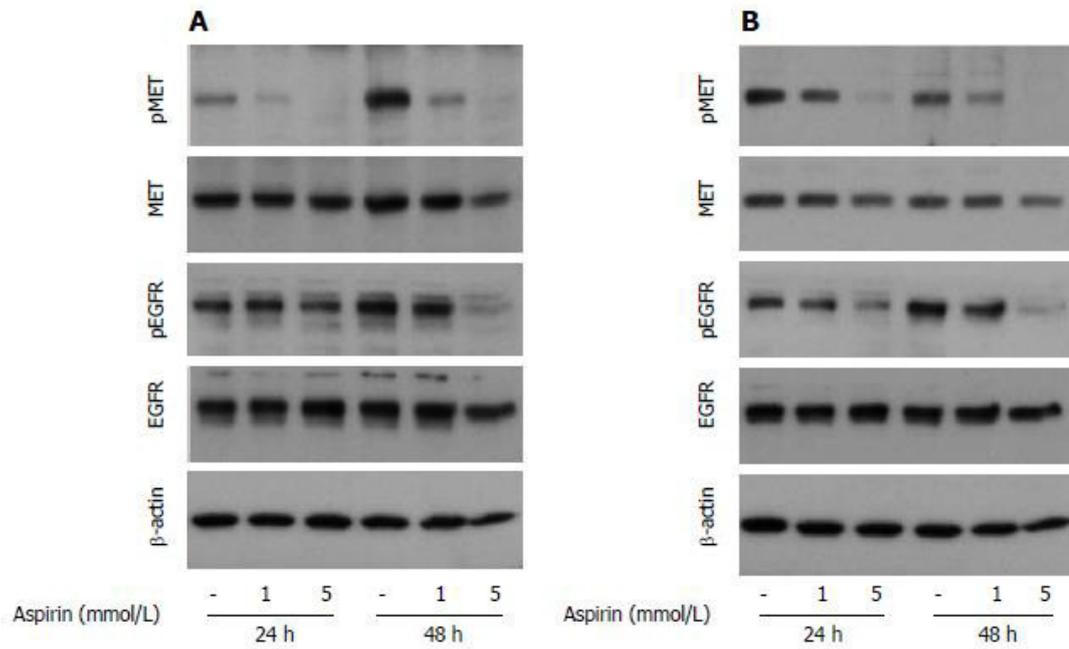


Abb. 8: Effekte von Aspirin auf EGFR und c-MET in NET-Zellen BON1 und NCI-H727. Humane Pankreaszellen BON1 (A) und bronchopulmonale Zellen NCI-H727 (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Aspirin für 24 und 48 Stunden behandelt. Die Expression von pMET, MET, pEGFR, EGFR und β -Aktin-Ladekontrolle wurden anschließend durch Western Blot-Analyse ausgewertet. Hier wird ein repräsentativer Blot von 3 unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt.

Effekte von Aspirin auf den Zellzyklus in neuroendokrinen Tumorzellen

Um die Effekte von Aspirin auf den Zellzyklus in NET-Zellen zu untersuchen, wurde das Ausmass der DNA-Fragmentation mittels Durchflusszytometrie (FACS Analyse) quantifiziert. Die Prozentsätze der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zyklus konnten somit gemessen werden. Des Weiteren wurde mittels Western Blot Analysen die Wirkung von Aspirin auf die relevantesten Proteine, die den Zellzyklus beeinflussen (p21, p53, Cyclin-abhängige Kinasen), analysiert.

Die Behandlung mit Aspirin für 48 Stunden von teilweise synchronisierten BON1 Zellen, die in 0,2% bovine serum albumin (BSA) kultiviert wurden, reduzierte den Prozentsatz der Zellen in Phase S in einer dosisabhängigen Weise von $18\% \pm 2\%$ auf $14\% \pm 2\%$ ($P < 0,01$; 5 mmol/l) und führte zu einer Steigerung des Prozentsatzes der Zellen in Phase G2/M von $16\% \pm 2\%$ auf $21\% \pm 1\%$ ($P < 0,01$; 5 mmol/L) (**Abb. 9A**).

Ähnliche Effekte wurden für NCI-H727 Zellen gezeigt (**Abb.9B**). Aspirin reduzierte den Eingang in Phase S in einer dosisabhängigen Weise von $23\% \pm 8\%$ auf $12\% \pm 2\%$ ($P < 0,05$; 5 mmol/l). Der Effekt auf Phase G2/M war kleiner (**Abb. 9B**).

Western Blot Analysen ergaben eine Aspirin-induzierte Expression von Protein p21 nach 24 und 48 Stunden in BON1 Zellen (**Abb. 10A**), sowie in NCI-H727 Zellen (**Abb. 10B**). Aspirin supprimierte auch die Expression der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) und von Cyclin D3 in beiden Zelllinien (**Abb. 10**). Im Gegensatz, zeigte Aspirin keine große Wirkung auf das Tumorsuppressorprotein p53 (**Abb. 10**), auf den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p27, auf die Cyclin-abhängige Kinase 6 (CDK6) sowie auf Cyclin D1. Des Weiteren, ergab sich keine Aspirin-induzierte *poly ADP ribose polymerase* (PARP)-Spaltung in BON1 und NCI-H727 Zellen (**Abb.11**).

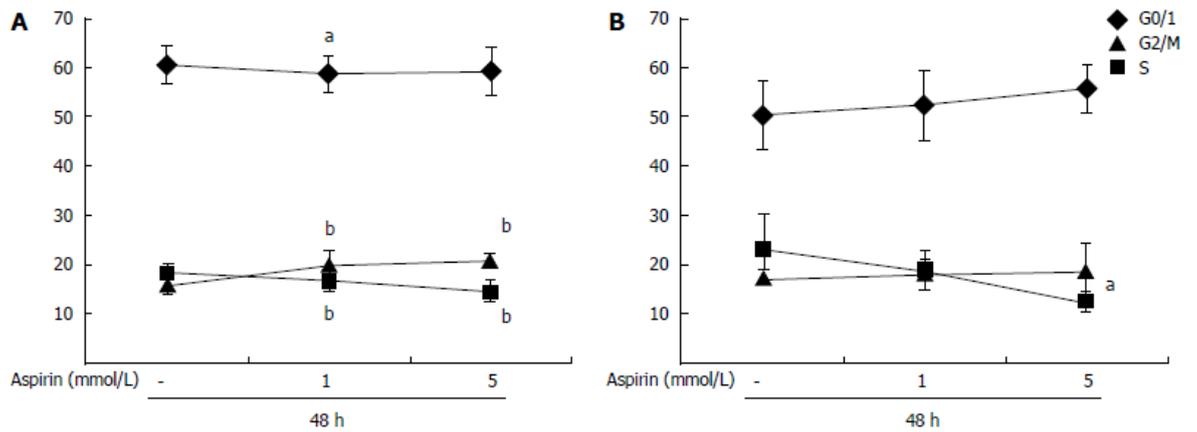


Abb. 9: Effekte von Aspirin auf Zellzyklus in NET-Zellen BON1 und NCI-H727. Humane Pankreaszellen BON1 (A) und bronchopulmonale Zellen NCI-H727 (B) wurden für 24 Stunden im Serum-freien Medium kultiviert (0,2% BSA), und dann mit den angegebenen Konzentrationen von Aspirin für 48 Stunden behandelt. Hier werden die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 8 unabhängig durchgeführten Versuchen in Duplikaten gezeigt.

^aP < 0,05, ^bP < 0,01 vs unbehandelt.

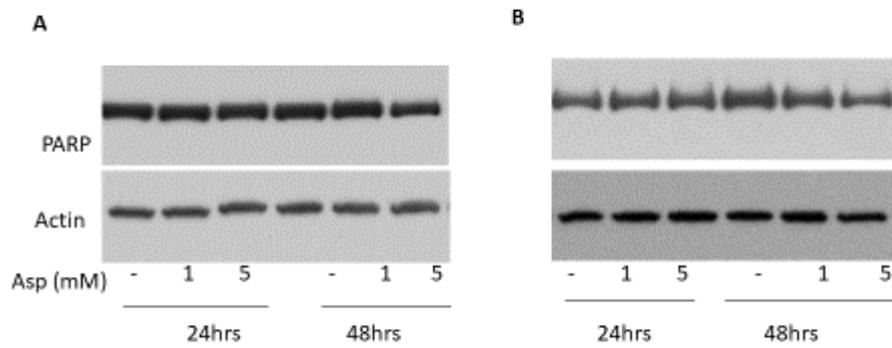


Abb. 11: Effekte von Aspirin auf PARP, ein Apoptose-beteiligtes-Protein, in NET-Zellen BON1 und NCI-H727. Humane Pankreaszellen BON1 (A) und bronchopulmonale Zellen NCI-H727 (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Aspirin für 24 und 48 Stunden behandelt. Die Expression von PARP und β -Aktin-Ladekontrolle wurden anschließend durch Western Blot-Analyse ausgewertet. Es ergab sich keine Aspirin induzierte PARP-Spaltung.

pH-Wert-Messung des Kulturmediums

Um ausschließen zu können, dass die Ergebnisse durch eine pH-Wert-Verschiebung des Kulturmediums durch Aspirin beeinflusst gewesen sein könnten, erfolgten wiederholte Messungen des pH-Wertes des Kulturmediums mit Aspirin in verschiedenen Konzentrationen. Wir konnten eine pH-Wert-Verschiebung des Kulturmediums bei Aspirin-Konzentrationen von 0,1 bis 5 mM ausschließen. Es ergab sich eine relevante pH-Wert-Verschiebung bei Aspirin-Konzentrationen von 15mM im Medium. In der Tabelle unten werden die Durchschnitt-pH-Werte von 3 verschiedenen Versuche dargestellt.

Aspirin Konzentration im Medium	pH-Wert des Mediums
0 (Kontrolle)	7,86
100 μ M	7,82
1mM	7,81
5mM	7,57
15mM	6,74

4. DISKUSSION

Die Mechanismen, durch die Aspirin auf die Karzinogenese wirkt sind noch nicht abschliessend geklärt (Dovizio M et al., Recent Results Cancer Res, 2013; Bruno A et al., Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2012). COX-2 ist ein bekanntes Target von Aspirin und die Inhibition von COX-2 führt zu einer reduzierten Produktion von potentiell neoplastischen Prostaglandinen (Elwood PC et al., Lancet 2009). Prostaglandine können in der Tat die Tumorzellproliferation promovieren, durch Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, unter anderem PI3K und MAPK. Des Weiteren kann Aspirin durch die Hemmung von COX-1 zu einer Dysfunktion der Thrombozyten führen, welche auch zu einer Reduktion der Metastasenbildung und der Angiogenese führen kann (Ma J et al., Biomed Pharmacother 2017; Mehta P, Blood 1984; Xu XR et al., Blood 2018). Ein wichtiger Effekt von Aspirin ist in der Tat die Wirkung auf das Endothel. Mehrere Studien *in vitro* und *in vivo* (Mausmodelle), haben gezeigt, wie eine pro-inflammatorische Mikroumgebung in verschiedenen Tumorentitäten zur Bildung von Metastasen führen kann. Interaktionen zwischen Tumorzellen und Endothelialzellen, sowie inflammatorische Zellen spielt eine große Rolle in Metastasenbildung. Aspirin zeigte einen anti-Adhäsion-Effekt *in vitro* in einigen Tumorentitäten, durch die Inhibition der Adhäsion von Tumorzellen auf Endothelialzellen. Eine Erklärung von dieser Aspirin-Wirkung könnte die Regulation der Tumor-induzierte-Angiogenese durch COX sein. COX kann die Tumor-induzierte-Angiogenese durch zwei Mechanismen modulieren: 1) durch die COX-2-induzierte Produktion von Pro-angiogenetische-Faktoren durch Tumorzellen; 2) durch die Regulation von Angiogenese in Endothelialzellen durch COX-1 (z.B. durch die COX-1 induzierte Produktion von *vascular endothelial growth factor* – VEGF). Durch diese zwei Mechanismen würde die Wirkung von Aspirin auf 2 verschiedene Weisen die Angiogenese und somit die Tumorzellproliferation und die Bildung von Metastasen beeinflussen. Die *in vitro* Daten, die diese zwei Mechanismen beweisen, wurden auch in *in vivo* xenograft-Modellen bestätigt (Ma J et al., Biomed Pharmacother 2017; Bischofs E et al., Anticancer Res 2012; Tsujii M et al., Cell 1998). Diese Effekte wurden jedoch noch nie auf NET-Zellen bewiesen. Diese Arbeit fokussiert sich allerdings auf die Effekte von Aspirin auf die Signalkaskaden PI3K-AKT-mTOR und MAPK, sowie auf die Effekte von Aspirin auf den Zellzyklus. Es wäre interessant in Zukunft zu untersuchen, ob auch in NET-Zellen Aspirin durch Inhibition von COX-1 und COX-2, die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothelium beeinflussen könnte und somit die Aggregation von Tumorzellen und die Bildung von Metastasen beeinflussen könnte.

Andere Mechanismen mittels denen Aspirin Entzündung, Apoptosis und Karzinogenese beeinflussen könnte, umfassen die Inhibition des Transkriptionsfaktors NFκB und die Hochregulation von Tumorsuppressorgenen wie Tumor Protein 53 Gen (TP53-Gen), Inhibitor vom Cyclin-abhängige Kinase 1A (CDKN1A) und B-Zell-Lymphom (BCL)-assoziiertes X (BAX) (Elwood PC et al., Lancet 2009).

Din et al (Din FV et al., Gastroenterology 2012) zeigten, dass Aspirin durch die Hemmung der mTOR-downstream Mediatoren S6K1 und 4EBP1 die Signalkaskade von mTOR in Kolorektalkarzinomzelllinien hemmte.

Die regelmäßige Einnahme von Aspirin nach der Diagnose von Kolorektalkarzinom in Patienten mit einer Mutation des Polypeptidgens PIK3CA - welche eine Hochregulation von der Signalkaskade PI3K/AKT/mTOR haben - war mit einem besseren Kolorektalkarzinom-spezifischen Überleben assoziiert (Liao X et al., NEJM 2012). Aspirin könnte somit das Tumorwachstum möglicherweise durch die Inhibition der PI3K-Akt-mTOR Signalkaskade hemmen (Liao X et al., NEJM 2012).

Der Signalweg PI3K/AKT/mTOR ist auch kritisch für das Tumorwachstum der neuroendokrinen Zellen (Zitzmann K et al., Neuroendocrinology 2007; Grozinsky-Glasberg S et al., Neuroendocrinology 2008; Yao JC et al., N Engl J Med 2011; Pavel ME et al., Lancet 2011). Viele NET weisen eine Überaktivierung des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs auf (Meric-Bernstam F et al., Clin Cancer Res 2012) und deswegen ist die mTOR Hemmung ein attraktives therapeutisches Target in NETs (Öberg K, Semin Oncol 2013; Pavel M et al., Neuroendocrinology, 2013; Zitzmann K et al., Neuroendocrinology, 2007; Elwood PC et al., Lancet 2009; Zitzmann K et al., Endocr Relat Cancer 2012; Weber HC, Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2013).

Der mTOR Inhibitor Everolimus wurde, aufgrund seiner signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens, für die Therapie von fortgeschrittenen NETs des Pankreas zugelassen (Yao JC et al., N Engl J Med 2011) als auch von NETs des GI-Trakts und der Lunge (Yao JC et al., Lancet 2016).

Die Effekte von Aspirin auf Tumorzellwachstum und auf den Proliferations-Signalwegen in NET sind nicht bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war die Wirkung von Aspirin auf neuroendokrinen Tumorzellregulation zu untersuchen. Es wurden die Effekte von Aspirin in humanen pankreatischen neuroendokrinen Tumorzellen BON1, in humanen bronchopulmonalen Tumorzellen NCI-H727 sowie in Darmtumorzellen GOT1 untersucht und ausgewertet. Die geprüften Aspirinkonzentrationen waren im Bereich von 0,001 bis 5 mmol/l. Laut Literatur, liegen die therapeutischen Peak-Serumspiegel von Aspirin zwischen 0,003 bis 5,2 mmol/l. Die oralen Aspirin-Dosierungen in vivo variieren in der Tat von 75 mg Gesamttagesdosis bis 25 mg/kg Körpergewicht jede 8 Stunden (Gajula R et al., Sci Pharm 2012; Cerletti C et al., Clin Pharmacokinet 2003; Kershaw RA et al., J Clin Pharmacol 1987; Nordt SP et al., West J Emerg Med 2011; Juárez Olgún H et al., Biopharm Drug Dispos 2004).

Aspirin supprimierte die Zellproliferation in allen 3 getesteten NET Zelllinien in einer zeit- und dosisabhängigen Weise, ab Konzentrationen von 0,5-1 mmol/l, welche innerhalb des therapeutischen Serum-Peaks von Aspirin nach oraler Einnahme sind.

Die Hemmung der Zellproliferation wurde durch SYBR green DNA-Markierungsassays in BON1 und NCI-H727 sowie durch Cell Titer Proliferationsassays in allen 3 Zelllinien bestätigt. Um die Mechanismen der Aspirin-vermittelten Hemmung des Zellwachstums zu untersuchen, wurde hier die Wirkung von Aspirin auf wichtige intrazellulären Signalwege überprüft. Es ergab sich die Suppression von 4EBP1 und (in geringerem Maße) von P70S6K Phosphorylierung (**Abb. 5 und 12**). Beides sind Substrate von mTOR-Signalwegen. Die Phosphorylierung von S6 - einem Substrat von P70S6K - wurde stark gehemmt (**Abb. 5 und 12**). Das zeigt die zentrale Rolle von mTOR „Downstream signaling“ in der Aspirin-vermittelte Hemmung von NET Zellwachstum. Dieser Effekt ist ähnlich zu den in Kolorektalkarzinomzelllinien gezeigten Effekten (Din FV et al., Gastroenterol 2012). S6 und 4EBP1 fördern normalerweise die Zellproliferation. Die Dephosphorylierung von 4EBP1, p70S6K und S6 könnte die Hemmung von Zellproliferation und Zellüberleben vor allem mittels einer Reduktion der Proteinsynthese verursachen (Hay N et al., Genes Dev 2004).

In dieser Arbeit wird auch eine Überaktivierung von AKT und eine (gegebenenfalls AKT-vermittelte (Manning BD et al., Mol Cell 2002) Tuberin Phosphorylierung bei Thr 1462 (pTSC2) gezeigt. Aus diesem Grund, könnte die Aspirin-vermittelte Inhibition von S6 und 4EBP1 Aktivität die TSC1/TSC2-vermittelte Hemmung von mTORC1 Signalwegen reflektieren (Huang J et al., Biochem J 2008; Nobukini T et al., Novartis Found Symp 2004). Trotz der erhöhten Phosphorylierung von TSC2 wurde nur ein minimaler Effekt auf die mTOR Phosphorylierung bei Serin 2448 gezeigt. Eine reduzierte Phosphorylierung von mTOR an anderen Stellen (und die assoziierte Hemmung von mTORC1 Aktivität) oder ein kompensatorisches mTORC2-vermitteltes

positives feedback Signal können jedoch nicht ausgeschlossen werden (Wolin EM et al., *Cancer Lett* 2013). Die Behandlung mit Aspirin und die Hemmung des mTOR Signalwegs waren auch mit einer Überaktivierung des Raf/MEK/ERK1/2 Signalwegs verbunden. Dies wurde aufgrund einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 und CREB gezeigt (**Abb. 7 und 12**). Ähnlich zu den beobachteten Effekten auf AKT, könnte die Aktivierung von ERK/CREB einen kompensatorischen Mechanismus reflektieren. Es bleibt unklar, ob diese kompensatorische Effekte als Antwort auf mTOR-Hemmung, ein Zeichen von klinischer Resistenz (Svejda B et al., *Cancer* 2011; Zitzmann K et al., *Cancer Lett* 2010) oder im Gegenteil von Wirksamkeit der Behandlung sind (Merics-Bernsam F et al., *Clin Cancer Res* 2012). Die Aktivierung von ERK wurde in der Literatur schon mit Inhibition des Zellwachstums von gastrointestinalen Karzinoiden (Cook MR et al., *Mol Cancer Ther* 2010) sowie mit der Regulation des „G2/M checkpoint“ assoziiert (Nam HJ et al., *Cell Signal* 2008). Die gleichzeitige Hemmung von mTOR und die kompensatorische Aktivität von AKT (und/oder ERK) könnten die Inhibition von NET Zellwachstum verstärken (Zitzmann K et al., *Cancer Letter* 2010). Diese Ausgleichs-Effekte auf AKT und ERK sind wahrscheinlich nicht durch die Induktion von upstream-Signalwegen verursacht. Aspirin hemmte in der Tat die Phosphorylierung von EGFR und c-MET in einer dosisabhängigen Weise. Beide Rezeptoren sind wichtige Wachstumsfaktoren, die in der Tumorgenese beteiligt sind und als zielgerichtete Therapie betrachtet werden (Puri N et al., *J Carcinog* 2008; Gan HK et al., *Cancer Res* 2012; Robinson KW et al., *Oncologist* 2013). Es wurde schon in der Literatur gezeigt, dass Aspirin specificity proteins (Sp)-regulierten Genprodukte wie c-MET in Kolonkrebiszellen hemmen kann (Pathi S et al., *PLoS One* 2012). Das könnte einen Teil der potentiellen antitumoralen Effekte von Aspirin erklären.

In allen 3 geprüften Zelllinien verursachte Aspirin die Phosphorylierung von GSK3 in einer zeit- und dosisabhängigen Weise (**Abb. 7**). GSK3 ist eine Serin/Threonin Protein Kinase, welche von AKT oder MAP Kinase Signalwege phosphoryliert werden kann (Carter Y et al., *Neuroendocrinology* 2013). Die Phosphorylierung von GSK3 verursacht die Hemmung von GSK3 selbst und das ist der primäre Weg durch den diese Protein-Kinase die Hemmung von Zellwachstum verursachen kann (Rayasam GV et al., *Br J Pharmacol* 2009). Die Inhibition von GSK3 spielt eine große Rolle in Überleben-Signalwegen: die transgene Überexpression von GSK3 verursacht in der Tat proapoptotische Effekte (Woodgett JR, *Sci STKE* 2001). Trotzdem, bleibt die genaue Rolle von GSK3 in der Tumorgenese schwer definierbar und GSK3 Inhibitoren wurden als eine neue Klasse von therapeutischen Mitteln gegen Kolonkarzinom vorgeschlagen (Shakoori A et al., *Cancer Sci* 2007).

Die Aspirin-vermittelte Inhibition von Zellproliferation war nicht mit Induktion von Apoptosis in BON 1 und NCI-H727 Zellen assoziiert. In dieser Arbeit wurden in der Tat keine Steigerung im Prozentsatz der Zellen in sub-G0/1-Phase oder eine PARP-Spaltung beobachtet (**Abb. 11**), sondern Veränderungen in der Verteilung der Zellen im Zellzyklus und einen reduzierten Eingang in der S-Phase.

Die Behandlung mit Aspirin induzierte die Expression von Protein p21 (p21) und reduzierte die Expression von CDK4 und Cyclin D3. p21 könnte die Zellzyklusprogression durch Bindung mit Cyclinen und CDK Komplexen hemmen, sowie durch Verhinderung der Aktivierung der Apoptose (Coqueret O, *Trends Cell Biol* 2003). Deswegen könnte die Aspirin-vermittelte Hemmung von NET Zellproliferation auch durch eine erhöhte Aktivität von p21 erklärt werden. Diesbezüglich wurde eine Suppression der Zellproliferation durch Überaktivierung der p21 Signalwegen in hepatozellulären Karzinomzellen HepG2 schon beschrieben (Feng X et al., *Int J Mol Med* 2011).

Interessanterweise untersuchten Fendrich V et al. (Fendrich V et al., *Endocr Relat Cancer* 2014) vor kurzem die Wirkung von Aspirin in Rip 1-Tag 2 Mäuse. Die Rip 1-Tag 2 Maus ist ein Modell von spontaner multistep Tumorigenese von soliden

pankreatischen NEN. Aspirin wurde mit einer täglichen Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die mediane Tumorgroße von den entwickelten pankreatischen NEN in den Rip 1-Tag 2 Mäusen reduzierte sich signifikant nach Behandlung mit Aspirin (67%). Aspirin führte auch zu einer Reduktion der mittleren Tumorzahl um 45%.

Die Studie von Fendrich et al. ergab eine deutliche antiproliferative Wirkung von Aspirin auf Inselzelltumoren in vivo in einem transgenen Mausmodell. Daher zogen die Autoren die Schlussfolgerung, dass Aspirin ein wertvolles chemopräventives Mittel bei Patienten mit einem hohen Risiko für pNENs sein könnte.

Immer mehr Studien zeigen wie Aspirin ein potentieller antitumoraler Effekt in Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten haben kann. Eine sehr aktuelle Meta-Analyse von observationellen Studien zeigt interessanterweise, wie die Einnahme von Aspirin, unter anderem Krebsentitäten, auch mit einer Reduktion von NET des Dünndarms assoziiert ist (Qiao Y et al., BMC Cancer 2018). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt wie Aspirin die Inhibition von NET Zellwachstum und von NET intrazellulären Signalwegen vermitteln kann. Angesichts der fehlenden etablierten pharmakologischen adjuvante Therapien nach vollständiger (R0) Resektion von NETs, sind weitere präklinische und klinische Studien erforderlich, um die potentielle Verwendung von Aspirin in neuroendokrinen Tumorerkrankungen zu etablieren. Als wichtiger Forschungsausblick würden insbesondere randomisierte kontrollierte Studien wichtige Daten ergeben, um in der Klinik mit größerer Validität Aspirin als antitumorelles Mittel einsetzen zu können (Elwood et al., Plos One 2016).

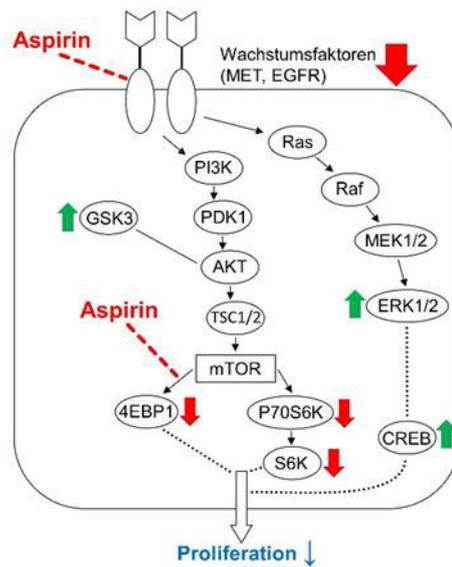


Abb. 12: Effekte von Aspirin auf intrazellulären Signalwegen in neuroendokrinen Tumor-Zellen. Die ausführlichen Effekte sind in den Ergebnissen und in der Diskussion beschrieben.

Legende:

- AKT:** Proteinkinase B
- CREB:** cAMP response element-binding protein
- 4EBP1:** 4E-bindendes Protein 1
- EGFR:** Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
- ERK:** extracellular-signal regulated Kinase
- GSK3:** Glykogensynthase-Kinase 3
- MEK:** Mitogen-activated protein kinase kinase
- MET:** Mesenchymal-epithelialer Transitionsfaktor
- mTOR:** Mammalian target of rapamycin
- P70S6K:** P70 ribosomale Protein S6 Kinase
- PDK1:** protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
- PI3K:** Phosphoinositol-3-Kinase
- RAF:** rapid accelerated fibrosarcoma
- RAS:** Rat sarcoma
- S6K:** ribosomale Protein S6 Kinase
- TSC:** Tuberöses Skleroseprotein

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es *in vitro* an humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien die potentiellen Effekte von Aspirin auf das Zellwachstum, auf die intrazellulären Signalwege, sowie auf den Zellzyklus zu untersuchen.

Es wurde herausgefunden, dass die Behandlung von BON1-, NCI-H727- und GOT1-Zellen mit Aspirin in verschiedenen geprüften Konzentrationen die Proliferation der NET Zellen *in vitro* hemmte. Signifikante Effekte wurden ab einer beginnenden Aspirin-Dosis von 0,5 bis 1,0 mmol/l gezeigt und wurden am stärksten bei der höchsten getesteten Dosis von 5,0 mmol/l beobachtet.

Aspirin hemmte den Signalweg von mTOR. Dies wurde mit der Hemmung der Phosphorylierung von den mTOR Substraten 4EBP1, p70S6K und S6 gezeigt, sowie auch mit der Inhibition der GSK3-Aktivität. Des Weiteren wurden auch eine Aspirin-vermittelte (am ehesten kompensatorische) Aktivierung von TSC2 und AKT und eine Suppression von c-MET und EGFR-Phosphorylierung beobachtet. In Assoziation mit diesen Effekten zeigte sich ein reduzierter Eingang der Zellen in Phase S des Zellzyklus, die Induktion von dem Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21, und die reduzierte Expression von der Zyklin-abhängigen Kinase 4 und von der Zyklin D3.

In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint eine Behandlung mit Aspirin *in vitro* eine potentielle antitumorale Wirkung in NET zu haben. Weitere präklinische *in vivo* Studien und klinische Untersuchungen als Bestätigung sind erforderlich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Algra AM, Rothwell PM. Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol* 2012; 13: 518-527

Arnold R, Wilke A, Rinke A, Mayer C, Kann PH, Klose KJ, Scherag A, Hahmann M, Müller HH, Barth P. Plasma chromogranin A as marker for survival in patients with metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008, 6(7): 820-827

Bains SJ, Mahic M, Myklebust TÅ, Småstuen MC, Yaqub S, Dørum LM, Bjørneth BA, Møller B, Brudvik KW, Taskén K. Aspirin As Secondary Prevention in Patients With Colorectal Cancer: An Unselected Population-Based Study. *J Clin Oncol* 2016; 34(21): 2501-2508

Basturk O, Yang Z, Tang LH, Hruban RH, Adsay V, McCall CM, Krasinskas AM, Jang KT, Frankel WL, Balci S, Sigel C, Klimstra DS. The high-grade (WHO G3) pancreatic neuroendocrine tumor category is morphologically and biologically heterogeneous and includes both well differentiated and poorly differentiated neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2015; 39(5): 683-690

Bischofs E, Lubs D, Fritzsche F, Meyer AS, Bruckner T, Sohn C, Eichbaum MH. In vitro blockade of adhesion of breast cancer cells to endothelial cells using anti-inflammatory drugs. *Anticancer Res* 2012; 32: 767-771

Bosetti C, Rosato V, Gallus S, Cuzick J, La Vecchia C. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011. *Ann Oncol* 2012; 23: 1403-1415

Bruno A, Dovizio M, Tacconelli S, Patrignani P. Mechanisms of the antitumoural effects of aspirin in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26: e1-e13

Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S, Eisenhut M, Runz A, Schäfer M, Schilling T, Haufe S, Herrmann T, Haberkorn U. Comparison of 68Ga-DOTATOC PET and 111In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007, 34(10): 1617-1626

Cao Y, Nishihara R, Wu K, Wang M, Ogino S, Willett WC, Spiegelman D, Fuchs CS, Giovannucci EL, Chan AT. Population-wide Impact of Long-term Use of Aspirin and the Risk for Cancer. *JAMA Oncol* 2016; 2(6): 762-769

Caplin ME, Pavel M, Ćwikła JB, Phan AT, Raderer M, Sedláčková E, Cadiot G, Wolin EM, Capdevila J, Wall L, Rindi G, Langle A, Martinez S, Blumberg J, Ruszniewski P; CLARINET Investigators: Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2014; 371(3): 224-233.

Caplin ME, Baudin E, Ferolla P, Filosso P, Garcia-Yuste M, Lim E, Oberg K, Pelosi G, Perren A, Rossi RE, Travis WD. ENETS consensus conference participants. Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids. *Ann Oncol* 2015; 26(8): 1604-1620

Carter Y, Jaskula-Sztul R, Chen H, Mazeh H. Signaling pathways as specific pharmacologic targets for neuroendocrin tumor therapy: RET, PI3K, MEK, growth factors, and Notch. *Neuroendocrinology* 2013; 97: 57-66

Cerletti C, Dell'Elba G, Manarini S, Pecce R, Di Castelnuovo A, Scorpiglione N, Feliziani V, de Gaetano G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic differences between two low dosages of aspirin may affect therapeutic outcomes. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 1059-1070

Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA* 2009; 302(6): 649-658

Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2003; 13: 65-70

Cook MR, Pinchot SN, Jaskula-Sztul R, Luo J, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Identification of a novel Raf-1 pathway activator that inhibits gastrointestinal carcinoid cell growth. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 429-437

Cuzick J, Thorat MA, Bosetti C, Brown PH, Burn J, Cook NR, Ford LG, Jacobs EJ, Jankowski JA, La Vecchia C, Law M, Meyskens F, Rothwell PM, Senn HJ, Umar A. Estimates of benefits and harms of prophylactic use of aspirin in the general population. *Ann Oncol* 2015; 26: 47-57

Delaunoy T, Ducreux M, Boige V, Dromain C, Sabourin JC, Duvallard P, Schlumberger M, de Baere T, Rougier P, Ruffie P, Elias D, Lasser P, Baudin E. The doxorubicin-streptozotocin combination for the treatment of advanced well-differentiated pancreatic endocrine carcinoma; a judicious option? *Eur J Cancer* 2004, 40(4): 515-520

Delle Fave G, Kwekkeboom DJ, Van Cutsem E, Rindi G, Kos-Kudla B, Knigge U, Sasano H, Tomassetti P, Salazar R, Ruszniewski P; Barcelona Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with gastroduodenal neoplasms. *Neuroendocrinology* 2012; 95(2): 74-87

Deppen SA, Blume J, Bobbey AJ, Shah C, Graham MM, Lee P, Delbeke D, Walker RC. 68Ga-DOTATATE Compared with 111In-DTPA-Octreotide and Conventional Imaging for Pulmonary and Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Nucl Med* 2016; 57(6): 872-878

Din FV, Valanciute A, Houde VP, Zibrova D, Green KA, Sakamoto K, Alessi DR, Dunlop MG. Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2012; 142: 1504-1515

Din FV, Theodoratou E, Farrington SM, Tenesa A, Barnetson RA, Cetnarskyj R, Stark L, Porteous ME, Campbell H, Dunlop MG. Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer. *Gut* 2010; 59: 1670-1679

Domingo E, Church DN, Sieber O, Ramamoorthy R, Yanagisawa Y, Johnstone E, Davidson B, Kerr DJ, Tomlinson IP, Midgley R. Evaluation of PIK3CA mutation as a predictor of benefit from NSAID drug therapy in colorectal cancer. *J clin Oncol* 2013; 31(34): 4297-4305

Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. Mode of action of aspirin as a chemopreventive agent. *Recent Results Cancer Res* 2013; 191: 39-65

Elwood PC, Gallagher AM, Duthie GG, Mur LA, Morgan G. Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet* 2009; 373: 1301-1309

Elwood PC, Morgan G, Pickering JE, Galante J, Weightman AL, Morris D, Kelson M, Dolwani S. Aspirin in the Treatment of Cancer: Reductions in Metastatic Spread and in Mortality: A Systematic Review and Meta-Analyses of Published Studies. *PLoS One* 2016; 11(4): e0152402

Evers BM, Townsend CM, Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* 1991; 101: 303-311

Fendrich V, Lopez CL, Manoharan J, Maschuw K, Wichmann S, Baier A, Holler JP, Ramaswamy A, Bartsch DK, Waldmann J. Enalapril and ASS inhibit tumor growth in a transgenic mouse model of islet cell tumors. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21(5): 813-824.

Feng X, Lu B, Xu Y, Li Q, Zhou W, Yang Z, Yang Z, Zhao W, Shen Z, Hu R. Aspirin reduces the apoptotic effect of etoposide via Akt activation and up-regulation of p21(cip). *Int J Mol Med* 2011; 28: 637-643

Filosso PL, Ferolla P, Guerrera F, Ruffini E, Travis WD, Rossi G, Lausi PO, Oliaro A; European Society of Thoracic Surgeons Lung Neuroendocrine Tumors Working-Group Steering Committee. Multidisciplinary management of advanced lung neuroendocrine tumors. *J Thorac Dis* 2015; 7(Suppl 2): S163-171

Fottner C, Weber MM. Neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract. Classification, clinical presentation and diagnosis. *Internist (Berl)* 2012; 53(2): 131-144

Frilling A, Modlin IM, Kidd M, Russell C, Breitenstein S, Salem R, Kwekkeboom D, Lau WY, Klersy C, Vilgrain V, Davidson B, Siegler M, Caplin M, Solcia E, Schilsky R; Working Group on Neuroendocrine Liver Metastases. Recommendations for management of patients with neuroendocrine liver metastases. *Lancet Oncol* 2014; 15(1): e8-21

Frilling A, Akerström G, Falconi M, Pavel M, Ramos J, Kidd M, Modlin IM. Neuroendocrine tumor disease: an evolving landscape. *Endocr Relat Cancer* 2012, 19(5): R163-185

FT B: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (2010) WHO classification of tumours of the digestive system, 4th edn. International Agency for Research on Cancer, Lyon, p.417

Gajula R, Pilli NR, Ravi VB, Maddela R, Inamadugu JK, Polagani SR, Busa S. Simultaneous Determination of Atorvastatin and Aspirin in Human Plasma by LC-MS/MS: Ist Pharmacokinetic Application. *Sci Pharm* 2012; 80: 923-940

Gan HK, Burgess AW, Clayton AH, Scott AM. Targeting of a conformationally exposed, tumor-specific epitope of EGFR as a strategy for cancer therapy. *Cancer Res* 2012; 72: 2924-2930

Giardiello FM, Casero Jr. RA, Hamilton SR, Hylind LM, Trimbath JD, Geiman DE, Judge KR, Hubbard W, Offerhaus GJ, Yang VW. Prostanoids, ornithine decarboxylase, and polyamines in primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2004; 126 (2), 425-431

Grozinsky-Glasberg S, Franchi G, Teng M, Leontiou CA, Ribeiro de Oliveira A, Dalino P, Salahuddin N, Korbonits M, Grossman AB. Octreotide and the mTOR inhibitor

RAD001 (everolimus) block proliferation and interact with the AktmTOR-p70S6K pathway in a neuro-endocrine tumour cell Line. *Neuroendocrinology* 2008; 87: 168-181

Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malferttheiner MV, Modlin IM. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer* 2008, 113(1): 5–21

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-1945

Heetfeld M, Chougnet CN, Olsen IH, Rinke A, Borbath I, Crespo G, Barriuso J, Pavel M, O'Toole D, Walter T; other Knowledge Network members. Characteristics and treatment of patients with G3 gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer*. 2015; 22(4): 657-664

Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 2008; 412: 179-190

Jann H, Roll S, Couvelard A, Hentic O, Pavel M, Müller-Nordhorn J, Koch M, Röcken C, Rindi G, Ruszniewski P, Wiedenmann B, Pape UF. Neuroendocrine tumors of midgut and hindgut origin: tumor-node-metastasis classification determines clinical outcome. *Cancer*. 2011; 117(15): 3332-3341

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

Juárez Olguín H, Flores Pérez J, Lares Asseff I, Loredó Abdalá A, Carbajal Rodríguez L. Comparative pharmacokinetics of acetyl salicylic acid and its metabolites in children suffering from autoimmune diseases. *Biopharm Drug Dispos* 2004; 25: 1-7

Jung YR, Kim EJ, Choi HJ, Park JJ, Kim HS, Lee YJ, Park MJ, Lee M. Aspirin targets SIRT1 and AMPK to induce senescence of colorectal carcinoma cells. *Mol. Pharmacol* 2015; 88(4): 708-719

Kershaw RA, Mays DC, Bianchine JR, Gerber N. Disposition of aspirin and its metabolites in the semen of man. *J Clin Pharmacol* 1987; 27: 304-309

Kettunen HL, Kettunen AS, Rautonen NE. Intestinal immune responses in wild-type and *Apc^{min/+}* mouse, a model for colon cancer. *Cancer Res* 2003; 63 (16): 5136-5142

Klöppel G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18 Suppl 1: S1-16

Klöppel G. Oberndorfer and his successors: from carcinoid to neuroendocrine carcinoma. *Endocr Pathol* 2007; 18(3): 141-144

Klöppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Arch* 2010; 456(6): 595-597

Klöppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. The ENETS and UICC TNM classification of neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: comment. *Pathologie* 2010; 31(5): 353-354

Kölby L, Bernhardt P, Ahlman H, Wängberg B, Johanson V, Wigander A, Forssell-Aronsson E, Karlsson S, Ahrén B, Stenman G, Nilsson O. A transplantable human carcinoid as model for somatostatin receptor-mediated and amine transporter-mediated radionuclide uptake. *Am J Pathol* 2001; 158: 745-755

Kothari N, Kim R, Jorissen RN, Desai J, Tie J, Wong HL, Faragher I, Jones I, Day FL, Li S, Sakthinandeswaren A, Palmieri M, Lipton L, Schell M, Teer JK, Shibata D, Yeatman T, Sieber OM, Gibbs P, Tran B. Impact of regular aspirin use on overall and cancer-specific survival in patients with colorectal cancer harbouring a PIK3CA mutation. *Acta Oncologica* 2014; 54(4): 487-492

Kouvaraki MA, Ajani JA, Hoff P, Wolff R, Evans DB, Lozano R, Yao JC. Fluorouracil, doxorubicin, and streptozocin in the treatment of patients with locally advanced and metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *J Clin Oncol* 2004; 22(23): 4762-4771

Kulke MH, Siu LL, Tepper JE, Fisher G, Jaffe D, Haller DG, Ellis LM, Benedetti JK, Bergsland EK, Hobday TJ, Van Cutsem E, Pingpank J, Oberg K, Cohen SJ, Posner MC, Yao JC. Future directions in the treatment of neuroendocrine tumors: consensus report of the National Cancer Institute Neuroendocrine Tumor clinical trials planning meeting. *J Clin Oncol* 2011; 29: 934-943

Kvols LK, Oberg KE, O'Dorisio TM, Mohideen P, de Herder WW, Arnold R, Hu K, Zhang Y, Hughes G, Anthony L et al. Pasireotide (SOM230) shows efficacy and tolerability in the treatment of patients with advanced neuroendocrine tumors refractory or resistant to octreotide LAR: results from a phase II study. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19(5): 657-666

Kwekkeboom DJ, Kam BL, van Essen M, Teunissen JJ, van Eijck CH, Valkema R, de Jong M, de Herder WW, Krenning EP. Somatostatin-receptor-based imaging and therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(1): R53-73

Langley RE, Burdett S, Tierney JF, Cafferty F, Parmar MK, Venning G. Aspirin and cancer: has aspirin been overlooked as an adjuvant therapy? *Br J cancer* 2011; 105(8): 1107-1113

Langley RE, Rothwell PM. Potential biomarker for aspirin use in colorectal cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10(1): 8-10

Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, Svejda B, Kidd M, Modlin IM. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011; 40(1):1-18

Liao X, Lockhead P, Nishara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Qian ZR, Baba Y, Shima K, Sun R, Nosho K, Meyerhardt JA, Giovannucci E, Fuchs CS, Chan AT, Ogino S. Aspirin use, tumour PIK3CA mutation and colorectal cancer survival. *NEJM* 2012; 367: 1597-1606

Li L, Mao X, Qin X, Zhou M, Xing H, Dong F, Jiang X, Zhuang W. Aspirin inhibits growth of ovarian cancer by upregulating caspase-3 and downregulating bcl-2. *Oncol Lett* 2016; 12: 93-96

Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* 1995; 2: 637-643

- Ma J, Cai Z, Wei H, Liu X, Zhao Q, Zhang T.** The anti-tumor effect of aspirin: What we know and what we expect. *Biomed Pharmacother* 2017; 95: 656-661
- Mahmoud NN, Dannenberg AJ, Mestre J, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, Newmark H, Bertagnolli MM. Aspirin prevents tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Surgery* 1998; 124(2): 225-231
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 2002; 10: 151-162
- Massironi S, Sciola V, Peracchi M, Ciafardini C, Spampatti MP, Conte D. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *World J Gastroenterol* 2008; 14(35): 5377-5384
- Matsuo K, Cahoon SS, Yoshihara K, Shida M, Kakuda M, Adachi S, Moeini A, Machida H, Garcia-Sayre J, Ueda Y, Enomoto T, Mikami M, Roman LD, Sood AK. Association of Low-Dose Aspirin and Survival of Women With Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol* 2016; 128(1): 127-137
- Mehta P. Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. *Blood* 1984; 63: 55-63
- Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, Do KA, Sangai T, Adkins F, Gonzalez-Angulo AM, Rashid A, Crosby K, Dong M, Phan AT, Wolff RA, Gupta S, Mills GB, Yao J. PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res* 2012; 18(6): 1777-1789
- Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003; 97(4): 934-959
- Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Shapiro MD. Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* 2005; 128(6): 1717-1751
- Nam HJ, Kim S, Lee MW, Lee BS, Hara T, Saya H, Cho H, Lee JH.** The ERK-RSK1 activation by growth factors at G2 phase delays cell cycle progression and reduces mitotic aberrations. *Cell Signal* 2008; 20: 1349-1358
- Niederle MB, Hackl M, Kaserer K, Niederle B. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification: an analysis based on prospectively collected parameters. *Endocr relat Cancer* 2010; 17(4): 909-918
- Nobukini T, Thomas G. The mTOR/S6K signalling pathway: the role of the TSC1/2 tumour suppressor complex and the proto-oncogene Rheb. *Novartis Found Symp* 2004; 262: 148-154
- Nölting S, Kuttner A, Lauseker M, Vogeser M, Haug A, Herrmann KA, Hoffmann JN, Spitzweg C, Göke B, Auernhammer CJ. Chromogranin a as serum marker for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a single center experience and literature review. *Cancers (Basel)* 2012; 4(1): 141-155
- Nordt SP, Clark RF, Castillo EM, Guss DA. Comparison of three aspirin formulations in human volunteers. *West J Emerg Med* 2011; 12: 381-385
- Oberg K, Modlin IM, De Herder W, Pavel M, Klimstra D, Frilling A, Metz DC, Heaney A, Kwekkeboom D, Strosberg J, Meyer T, Moss SF, Washington K, Wolin E, Liu**

E, Goldenring J. Consensus on biomarkers for neuroendocrine tumour disease. *Lancet Oncol* 2015; 16(9): 435-446

Oberg K. The genetics of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol* 2013; 40: 37-44

Pape UF, Niederle B, Costa F, Gross D, Kelestimur F, Kianmanesh R, Knigge U, Öberg K, Pavel M, Perren A, Toumpanakis C, O'Connor J, Krenning E, Reed N, O'Toole D. Vienna Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines for Neuroendocrine Neoplasms of the Appendix (Excluding Goblet Cell Carcinomas). *Neuroendocrinology* 2016; 103(2): 144-152

Pathi S, Jutooru I, Chadalapaka G, Nair V, Lee SO, Safe S. Aspirin inhibits colon cancer cell and tumor growth and downregulates specificity protein (Sp) transcription factors. *PLoS One* 2012; 7: e48208

Pavel M, O'Toole D, Costa F, Capdevila J, Gross D, Kianmanesh R, Krenning E, Knigge U, Salazar R, Pape UF, Öberg K. Vienna Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site. *Neuroendocrinology* 2016; 103(2): 172-185

Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Hörsch D, Winkler RE, Klimovsky J, Lebwohl D, Jehl V, Wolin EM, Oberg K, Van Cutsem E, Yao JC. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2011; 378: 2005-2012

Pavel M. Translation of molecular pathways into clinical trials of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2013; 97: 99-112

Piazuelo E, Esquivias P, De Martino A, Cebrián C, Conde B, Santander S, Emperador S, García-González MA, Carrera-Lasfuentes P, Lanás A. Acetylsalicylic Acid Exhibits Antitumor Effects in Esophageal Adenocarcinoma Cells In Vitro and In Vivo. *Dig Dis Sci* 2016; 61(10): 2896-2907

Prasad V, Bodei L, Kidd M, Modlin IM. Whither peptide receptor radionuclide therapy for neuroendocrine tumors: an Einsteinian view of the facts and myths. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41(10): 1825-1830

Puri N, Salgia R. Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *J Carcinog* 2008; 7: 9

Qiao Y, Yang T, Gan Y, Li W, Wang C, Gong Y, Lu X. Associations between aspirin use and the risk of cancers: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer* 2018; 18: 288

Ramage JK, De Herder WW, Delle Fave G, Ferolla P, Ferone D, Ito T, Ruszniewski P, Sundin A, Weber W, Zheng-Pei Z, Taal B, Pascher A. Vienna Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines Update for Colorectal Neuroendocrine Neoplasms. *Neuroendocrinology* 2016; 103(2): 139-143

Ramage JK, Ahmed A, Ardill J, Bax N, Breen DJ, Caplin ME, Corrie P, Davar J, Davies AH, Lewington V, Meyer T, Newell-Price J, Poston G, Reed N, Rockall A, Steward W, Thakker RV, Toumpanakis C, Valle J, Verbeke C, Grossman AB. UK and Ireland Neuroendocrine Tumour Society. Guidelines for the management of

gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours (NETs). *Gut* 2012; 61(1): 6-32

Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 885-898

Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Hörsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzsniwski P. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011; 364(6): 501-513

Rindi G, Falconi M, Klersy C, Albarello L, Boninsegna L, Buchler MW, Capella C, Caplin M, Couvelard A, Doglioni C, Delle Fave G, Fischer L, Fusai G, de Herder WW, Jann H, Komminoth P, de Krijger RR, La Rosa S, Luong TV, Pape U, Perren A, Ruzsniwski P, Scarpa A, Schmitt A, Solcia E, Wiedenmann B. TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: results from a large international cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(10): 764-777

Rindi G, Klöppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006; 449(4): 395-401

Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2007; 451(4): 757-762

Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Bläker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold R; PROMID Study Group. 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* 2009; 27(28): 4656-4663

Rinke A, Michl P, Gress T. Medical treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancers (Basel)* 2012; 4(1): 113-129

Robinson KW, Sandler AB. The role of MET receptor tyrosine kinase in non-small cell lung cancer and clinical development of targeted anti-MET agents. *Oncologist* 2013; 18: 115-122

Rockall AG, Reznick RH. Imaging of neuroendocrine tumours (CT/MR/US). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21(1): 43-68

Rossi RE, Massironi S, Spampatti MP, Conte D, Ciafardini C, Cavalcoli F, Peracchi M. Treatment of liver metastases in patients with digestive neuroendocrine tumors. *J Gastrointest Surg* 2012; 16(10): 1981-1992

Rossi RE, Burroughs AK, Caplin ME. Liver transplantation for unresectable neuroendocrine tumor liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(7): 2398-2405

Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 1995; 56: 624-632

Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG, Zanchetti A, Roncaglioni MC, Tognoni G, Lee R, Belch JF, Wilson M, Mehta Z, Meade TW. Short-term effects of daily aspirin on cancer

incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials. *Lancet* 2012; 379: 1602-1612

Sahani DV, Bonaffini PA, Fernández-Del Castillo C, Blake MA. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: role of imaging in diagnosis and management. *Radiology* 2013; 266(1): 38-61

Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(10): 883-890

Santilli F, Boccatonda A, Davì G. Aspirin, platelets, and cancer: The point of view of the internist. *Eur J Intern Med* 2016; 34: 11-20

Sarmiento JM, Heywood G, Rubin J, Ilstrup DM, Nagorney DM, Que FG. Surgical treatment of neuroendocrine metastases to the liver: a plea for resection to increase survival. *J Am Coll Surg* 2003; 197(1): 29-37

Scherübl H, Jensen RT, Cadiot G, Stölzel U, Klöppel G. Management of early gastrointestinal neuroendocrine neoplasms. *World J Gastrointest Endosc* 2011; 3(7): 133-139

Shakoori A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, Kawakami K, Minamoto T. Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci* 2007; 98: 1388-1393

Singh-Ranger G, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer, and implications of COX-2 inhibition. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28 (7), 729-737

Singh-Ranger G, Salhab M, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109: 189-198

Singh-Ranger G. The role of aspirin in colorectal cancer chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 104: 87-90

Steinmüller T, Kianmanesh R, Falconi M, Scarpa A, Taal B, Kwekkeboom DJ, Lopes JM, Perren A, Nikou G, Yao J, Delle Fave GF, O'Toole D. Frascati Consensus Conference participants. Consensus guidelines for the management of patients with liver metastases from digestive (neuro)endocrine tumors: foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology* 2008; 87(1): 47-62

Strosberg JR, Weber JM, Feldman M, Coppola D, Meredith K, Kvols LK. Prognostic validity of the American Joint Committee on Cancer staging classification for midgut neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol* 2013; 31(4): 420-425

Strosberg J, Gardner N, Kvols L. Survival and prognostic factor analysis of 146 metastatic neuroendocrine tumors of the mid-gut. *Neuroendocrinology* 2009; 89(4): 471-476

Svejda B, Kidd M, Kazberouk A, Lawrence B, Pfragner R, Modlin IM. Limitations in small intestinal neuroendocrine tumor therapy by mTOR kinase inhibition reflect growth factor-mediated PI3K feedback loop activation via ERK1/2 and AKT. *Cancer* 2011; 117: 4141-4154

Treglia G, Castaldi P, Rindi G, Giordano A, Rufini V. Diagnostic performance of Gallium-68 somatostatin receptor PET and PET/CT in patients with thoracic and

gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: a meta-analysis. *Endocrine* 2012; 42(1): 80-87

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-16.

Ugurlucan M, Caglar IM, Caglar FN, Ziyade S, Karatepe O, Yildiz Y, Zencirci E, Ugurlucan FG, Arslan AH, Korkmaz S, Filizcan U, Cicek S. Aspirin: from a historical perspective. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2012; 7(1): 71-76

Van Staalduinen J, Frouws M, Reimers M, Bastiaannet E, van Herk-Sukel MP, Lemmens V, de Steur WO, Hartgrink HH, van de Velde CJ, Liefers GJ. The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use after diagnosis on survival of oesophageal cancer patients. *Br J Cancer*. 2016; 114(9): 1053-1059

Weber HC. Medical treatment of neuroendocrine tumours. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013; 20: 27-31

Wolin EM. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in the therapy of pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Lett* 2013; 335: 1-8

Woodgett JR. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE* 2001; 2001: re12

Xu XR, Yousef GM, Ni H. Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other anti-platelet agents. *Blood* 2018; (Epub ahead of print)

Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 2008; 26(18): 3063-3072

Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011; 364: 514-523

Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, Tomasek J, Raderer M, Lahner H, Voi M, Pacaud LB, Rouyrre N, Sachs C, Valle JW, Delle Fave G, Van Cutsem E, Tesselaar M, Shimada Y, Oh DY, Strosberg J, Kulke MH, Pavel ME. RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial (RADIANT-4) Study Group. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2016; 387(10022): 968-977

Zitzmann K, De Toni EN, Brand S, Göke B, Meinecke J, Spöttl G, Meyer HH, Auernhammer CJ. The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces

antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology* 2007; 85: 54-60

Zitzmann K, Vlotides G, Brand S, Lahm H, Spöttl G, Göke B, Auernhammer CJ. Perifosine-mediated Akt inhibition in neuroendocrine tumor cells: role of specific Akt isoforms. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19: 423-434

Zitzmann K, Rüden Jv, Brand S, Göke B, Lichtl J, Spöttl G, Auernhammer CJ. Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dualtargeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer Lett* 2010; 295: 100-109

ClinicalTrials.gov – zitierte Studien:

<https://clinicaltrials.gov/NCT02757365>: Efficiency Study of Aspirin to Prevent the Occurrence of Prostate Cancer

<https://clinicaltrials.gov/NCT02607072>: Aspirin for Prevention of Postsurgical Recurrence and Metastasis in Asian Colorectal Cancer Patients: a Multi-center Randomized Trial (APREMEC)

<https://clinicaltrials.gov/NCT02467582>: Adjuvant Aspirin for Colon Cancer

<https://clinicaltrials.gov/NCT02301286>: A Trial of Aspirin on Recurrence and Survival in Colon Cancer Patients (ASPIRIN)

<https://clinicaltrials.gov/NCT02804815>: Add-Aspirin: A Trial Assessing the Effects of Aspirin on Disease Recurrence and Survival After Primary Therapy in Common Non Metastatic Solid Tumours

7. Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
BAX	B-Zell-Lymphom-assoziiertes X
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BON1	Humane neuroendokrine pankreatische Tumorzellen
BSA	Bovine serum albumin
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4
CDK6	Cyclin-abhängige Kinase 6
CDKN1A	Cyclin-abhängige Kinase 1A
CgA	Chromogranin A
CREB	cAMP response element-binding protein
CT	Computertomographie
COX-2	Cyclooxygenase 2
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12
4EBP1	4E-bindendes Protein 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
ERK	extracellular-signal regulated Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
GEP	Gastroenteropankreatisch
GOT1	Humane Mitteldarmkarzinoidzellen
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
5-HIES	5-Hydroxyindolessigsäure
HPF	High Power Field
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEN 1	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MET	Mesenchymal-epithelialer Transitionsfaktor
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex
NCI-H727	Humane bronchopulmonale neuroendokrine Tumorzellen
NEC	Neuroendokriner Karzinom
NET	Neuroendokriner Tumor
NFKB	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
p21	Protein p21, Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PDK1	protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
P70S6K	P70 ribosomale Protein S6 Kinase
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	Propidiumiodidfärbung
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

RAF	rapid accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RFA	Radiofrequenzablation
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSA	Somatostatinanaloga
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TNM-Klassifikation	Tumor, Lymphknoten, Metastasen-abhängige Klassifikation
TP53	Tumor Protein 53
TSC 2	Tuberöses Skleroseprotein vom Typ 2
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
WHO	World Health Organisation

8. Publikationen und Präsentationen im Rahmen der hier vorgelegten Dissertationsarbeit

Spampatti M, Vlotides G, Spöttl G, Maurer J, Göke B, Auernhammer CJ. Aspirin inhibits cell viability and mTOR downstream signaling in gastroenteropancreatic and bronchopulmonary neuroendocrine tumor cells. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 7;20(29):10038-49.

Spampatti MP, Vlotides G, Spöttl G, Maurer J, Göke B, Auernhammer CJ. mTOR Inhibition durch Aspirin – antiproliferative Effekte auf neuroendokrine Tumorzellen in vitro. 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Nürnberg, 2013 - *Z Gastroenterol* 2013; 51 - K80 DOI: 10.1055/s-0033-1352720

Spampatti MP, Vlotides G, Spöttl G, Maurer J, Göke B, Auernhammer CJ. Auernhammer1. Aspirin inhibits Cell Viability and mTOR Signaling in Neuroendocrine Tumor Cells. 10th Annual Conference for the Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumor Disease – European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS), Barcelona, 2013

Sowie Beteiligung an weiteren Publikationen und Präsentationen im Rahmen der Labortätigkeit während der Dissertation

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

Reuther C, Heinzle V, Spampatti M, Vlotides G, de Toni E, Spöttl G, Maurer J, Nölting S, Göke B, Auernhammer CJ. Cabozantinib and Tivantinib, but not INC280, Induce Anti-Proliferative and Anti-Migratory Effects in Human Neuroendocrine Tumour Cells in vitro: Evidence for 'Off-Target' Effects not Mediated by c-Met Inhibition. *Neuroendocrinology.* 2016;103(3-4):383-401.

Vlotides G, A Tanyeri A, Spampatti MP, Zitzmann K, Spöttl G, Maurer J, Nölting S, Göke B, Auernhammer CJ. mTOR Inhibition durch Metformin – antiproliferative Effekte auf neuroendokrine Tumorzellen in vitro. 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) , Nürnberg, 2013 - *Z Gastroenterol* 2013; 51 - K68 DOI: 10.1055/s-0033-1352708

Vlotides G, Zitzmann K, Spampatti MP, Spöttl G, Maurer J, Göke B, Auernhammer CJ. In Vitro Anticancer Effect of Metformin on Neuroendocrine Tumor Cells. 10th Annual Conference for the Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumor Disease – European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS), Barcelona, 2013

Reuther C, Heinzle V, Spampatti M, Vlotides G, de Toni E, Spöttl G, Maurer J, Göke B, Auernhammer CJ. Spezifische c-Met Inhibition hat keine direkten antiproliferativen Effekte auf humane neuroendokrine Tumorzelllinien in vitro. 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) , Leipzig, 2014 - *Z Gastroenterol* 2014; 52 - KG193 DOI: 10.1055/s-0034-1386215

9. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

Prof. Dr.med. Christoph Auernhammer, Endokrinologische Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik II des Klinikums Großhaderns/München für das Überlassen des Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

PD Dr.med. George Vlotides für die wissenschaftliche Mitarbeit.

Herrn Gerald Spöttl und Julian Maurer für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.