Aus der Klinik für
Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Inhibition des gp130/JAK/STAT3-Signalweges mittels SC144 als innovatives Target beim duktalen Pankreasadenokarzinom / The inhibition of the gp130/JAK/STAT3 pathway using SC144 as an innovative target in pancreatic ductal adenocarcinoma

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Emily Marta Claribel Günzler

aus Berlin

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis 5

Abbildungsverzeichnis 6

Abkürzungsverzeichnis 7

Abstract (deutsch) 9

Abstract (englisch) 10

1. Einleitung 11

1.1 Das duktale Pankreasadenokarzinom und die aktuelle Therapie 11

1.2 Gp130 als Bestandteil von Zytokinrezeptoren und dessen Rolle bei der Tumorgenese 16

1.3 Die Rolle von IL-6 und OSM bei der Tumorentstehung und deren Relevanz beim PDAC 19

1.4 Neue therapeutische Optionen beim PDAC 22

2. Zielsetzung 26

3. Material und Methoden 27

3.1 Material und Geräte 27

3.1.1 Zelllinien 27

3.1.2 Verbrauchsmaterial, Geräte, Substanzen und Puffer 27

3.1.3 Athymische Nacktmäuse 27

3.2 Methoden 28

3.2.1 Zellkultur 28

3.2.2 BrdU-Assay 28

3.2.3 MTT-Assay 29

3.2.4 Western Blot 30

3.2.5 Orthotopes PDAC-Xenograft-Mausmodell 34

3.2.6 Statistische Auswertung 35

4. Ergebnisse 37

4.1 SC144, Paclitaxel und ihre Kombination inhibierten die Proliferation von PDAC-Zellen 37

4.2 SC144, Paclitaxel und ihre Kombination inhibierten die Viabilität von PDAC-Zellen 40

4.3 SC144 inhibierte die von IL-6 und OSM stimulierte Phosphorylierung von STAT3 in PDAC-Zellen zeit- und dosisabhängig 42

4.3.1 Stimulation der Zellen mit IL-6 und Behandlung mit SC144 42

4.3.2 Stimulation der Zellen mit OSM und Behandlung mit SC144 43

4.4 SC144 inhibierte das L3.6pl-induzierte Tumorwachstum *in vivo* 46

5. Diskussion 49

5.1 SC144 inhibierte die Proliferationsaktivität und Zellviabilität in L3.6pl-Zellen und verstärkte die Wirkung von Paclitaxel 49

5.2 SC144 inhibierte die von OSM und IL-6 stimulierte Phosphorylierung von STAT3 in L3.6pl-Zellen 51

5.3 SC144 inhibierte das Tumorwachstum im orthotopen PDAC-Mausmodell 55

6. Limitationen 57

7. Schlussfolgerung und Ausblick 58

Literaturverzeichnis 59

Materiallisten 67

Eidesstattliche Versicherung 74

Danksagung 77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lokales und metastatisches Tumorwachstum 28 Tage nach Injektion von Tumorzellen 48
Tabelle 2: Für alle Versuche verwendetes Verbrauchsmaterial 68
Tabelle 3: Liste der Geräte, die für alle Versuche verwendet wurden 69
Tabelle 4: Liste der Substanzen und Chemikalien 70
Tabelle 5: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen 72
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten gebrauchsfertigen Kits, wie sie zusammengesetzt sind und woher sie bezogen wurden 72
Tabelle 7: Auflistung der Zytokine und Medikamente 73
Tabelle 8: Die verwendeten Antikörper für die Immunoblotanalyse 73
Tabelle 9: Liste der für die gesamte Arbeit verwendeten Betriebsprogramme 73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Absolute Zahlen der Neuerkrankungen und Sterbefälle mit Prognosen bis 2020 in Deutschland 11
Abbildung 2: Absolute und relative Überlebensraten nach Erstdiagnose 12
Abbildung 3: Progression von der pankreatischen Azinuszelle über PanIN-Läsionen zum Pankreasadenokarzinom 13
Abbildung 4: Zytokin-Zytokin-Rezeptor-gp130-Komplexe 18
Abbildung 5: Signaltransduktionsmechanismus von IL-6 19
Abbildung 6: Interaktionen von gp130 und den Zytokinen der IL-6-Familie 21
Abbildung 7: Aktivierung und Funktion von OSM 22
Abbildung 8: Schema der 6-Well-Platten für die Immunoblotanalyse mit L3.6pl-Zellen 31
Abbildung 9: SC144 und Paclitaxel hemmen im BrdU-Assay die Proliferation von L3.6pl-Zellen allein und in Kombination 39
Abbildung 10: SC144 und Paclitaxel hemmen die Zellviabilität im MTT-Assay von L3.6pl-Zellen allein und in Kombination 41
Abbildung 11: IL-6 stimuliert und SC144 hemmt die Phosphorylierung von STAT3 in L3.6pl-Zellen 43
Abbildung 12: OSM stimuliert und SC144 hemmt die Phosphorylierung von STAT3 in L3.6pl-Zellen 44
Abbildung 13: Repräsentative Western Blots der L3.6pl-Zellen 45
Abbildung 14: Mittleres Tumorgewicht und Tumorvolumen 47
Abbildung 15: Tumorinfiltration, Metastasierung und Aszites 28 Tage nach orthotoper Tumorzellinjektion 47
Abbildung 16: Paclitaxel und SC144 beeinflussen die Tumorprogression über IL-6 51
Abbildung 17: Der Signaltransduktionsweg von IL-6 und OSM und der Einfluss von SC144 und Paclitaxel 53

Abkürzungsverzeichnis

ADM	Azinär-duktale Metaplasie
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Bcl-2	B-Zell-Lymphom-Protein 2
BRCA2	Breast Cancer 2
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CNTF	Ziliärer neurotropher Faktor
CNTFR	Ziliärer neurotropher Faktor-Rezeptor
CT-1	Cardiotrophin-1
ddH_2O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPHO	Elektrophoresepuffer
FBS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
gp130	Glykoprotein 130
H_2SO_4	Schwefelsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-11	Interleukin-11
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
LIF	Leukämiehemmender Faktor
LIFR	Leukämiehemmender Faktor-Rezeptor
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MMP-9	Matrix-Metalloprotease-9

nab-Paclitaxel	Albumin-gebundenes Paclitaxel
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M-Rezeptor
PAA	Polyacrylamid
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassaypuffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sIL-6R	Löslicher Interleukin-6-Rezeptor
STAT/STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Faktor / phosphorylierter Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Faktor
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

Abstract (deutsch)

Hintergrund: Die Aktivierung der gp130/JAK/STAT3-Signalkaskade durch die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Oncostatin M (OSM) und die resultierende Genexpression fördert die Tumorprogression beim Pankreasadenokarzinom (PDAC). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der niedermolekularen Verbindung SC144 auf die von IL-6 und OSM stimulierte STAT3-Phosphorylierung, der Effekt von SC144 mit dem Standardchemotherapeutikum Paclitaxel auf die Viabilität und Phosphorylierungsaktivität von L3.6pl-Zellen und der *in vivo*-Effekt von SC144 untersucht.

Methoden: Die metabolische und Proliferationsaktivität von L3.6pl-Zellen unter Einfluss von SC144, Paclitaxel oder deren Kombination wurde in MTT- und BrdU-Assays untersucht. Im Western Blot wurde untersucht, ob IL-6 und OSM die STAT3-Phosphorylierung stimulieren und ob SC144 diesen Effekt unterdrücken kann. Der Einfluss von SC144 auf das Tumorwachstum *in vivo* wurde an athymischen Nacktmäusen in einem orthotopen PDAC-Xenograft-Modell untersucht.

Ergebnisse: SC144 inhibierte sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Paclitaxel die Proliferationsaktivität als auch die Zellviabilität in L3.6pl-Zellen. Die Kombination aus Paclitaxel und SC144 war signifikant wirksamer als die Monotherapie mit Paclitaxel. IL-6 und OSM stimulierten die STAT3-Phosphorylierung in L3.6pl-Zellen. SC144 inhibierte die IL-6- und OSM-vermittelte STAT3-Phosphorylierung dosis- und zeitabhängig. *In vivo* konnte in der mit SC144 behandelten Gruppe ein signifikant geringeres Tumorgewicht festgestellt werden.

Schlussfolgerung: SC144 inhibierte relevante zellbiologische Prozesse und Signalwege der Tumorprogression im PDAC, die durch OSM und IL-6 stimuliert wurden. *In vivo* hatte SC144 eine akzeptable Toxizität und reduziert das orthotope und metastatische Tumorwachstum signifikant. Dadurch könnte SC144 ein attraktiver Kandidat für die klinische Therapie des PDAC sein.

Abstract (englisch)

Background: Interleukin-6 (IL-6) and oncostatin M (OSM) induced stimulation of the gp130/JAK/STAT3 signaling pathway and subsequent gene expression stimulate tumor progression in pancreatic adenocarcinoma (PDAC). Here, the effects of the small molecule compound SC144 parameters of *in vitro* and *in vivo* PDAC progression are investigated.

Methods: Metabolic and proliferation activity of L3.6pl cells under the influence of SC144, paclitaxel, or the combination were examined by MTT and BrdU assays. Western blots were used to investigate whether IL-6 and OSM stimulate STAT3 phosphorylation and whether SC144 can suppress this effect. The effect of SC144 on *in vivo* tumor growth was assessed in athymic nude mice using an orthotopic PDAC xenograft model.

Results: SC144 inhibited proliferation activity as well as cell viability in L3.6pl cells both as monotherapy and in combination with paclitaxel. The combination of paclitaxel and SC144 was significantly more effective than monotherapy with paclitaxel. IL-6 and OSM stimulated STAT3 phosphorylation in L3.6pl cells. SC144 inhibited IL-6- and OSM-mediated STAT3 phosphorylation in a dose- and time-dependent manner. *In vivo*, significantly lower tumor weight was observed in the SC144-treated group.

Conclusion: SC144 inhibits OSM and IL-6 stimulated biological components of PDAC tumor progression. *In vivo*, SC144 showed an acceptable toxicity and potently inhibits orthotopic and metastatic tumor growth. Taken together, the preclinical data presented make SC144 an attractive potential candidate for further clinical testing in PDAC patients.

1. Einleitung

1.1 Das duktale Pankreasadenokarzinom und die aktuelle Therapie

Das duktale Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist eine maligne Entartung der Zellen des exokrinen Pankreas und ist charakterisiert durch eine frühe hämatogene und lymphogene Metastasierung (1). Mit nahezu gleichen Neuerkrankungs- und Sterberaten ist das PDAC eine Tumorerkrankung mit einer der schlechtesten Prognosen (2). Laut Robert Koch-Institut gab es im Jahr 2016 in Deutschland 9180 neu erkrankte Männer und 9190 Frauen (3). Mit 9008 Männern und 9044 Frauen sind fast genauso viele Menschen daran verstorben, wie daran erkrankten (3). Abbildung 1 zeigt zum einen, dass die Neuerkrankungsraten sowohl bei Frauen als auch bei Männern in Deutschland seit 1999 stetig zunehmen und zum anderen, dass die Sterberaten weitestgehend gleichbleibend mit den Neuerkrankungsraten sind (3). Mit der daraus resultierenden relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 9% hat das PDAC die niedrigsten Überlebensraten unter allen Krebsarten und fällt auf Platz vier der Todesursachen durch Krebserkrankungen in Deutschland (Abbildung 2) (3).

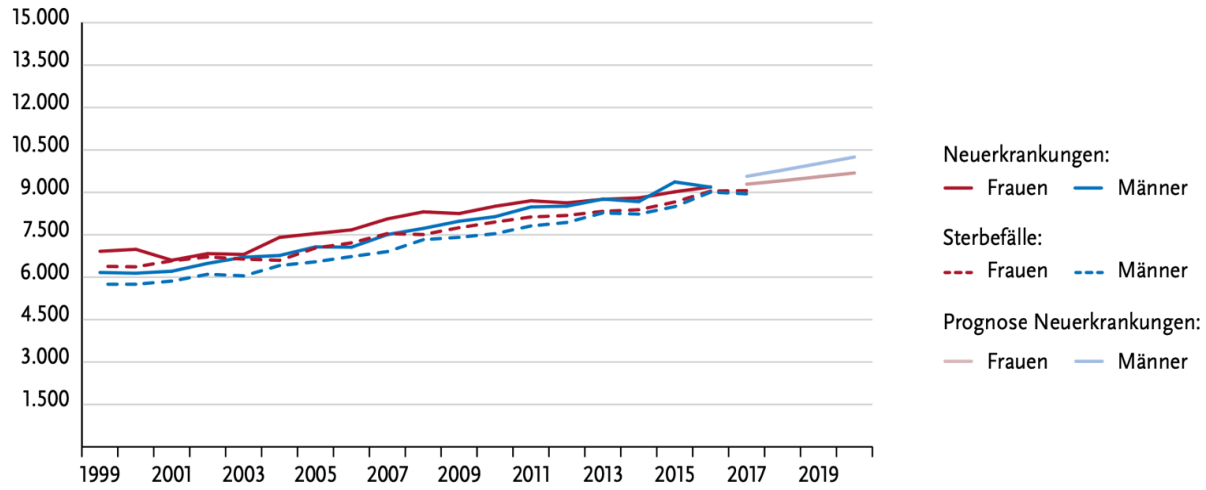

Abbildung 1: Absolute Zahlen der Neuerkrankungen und Sterbefälle mit Prognosen bis 2020 in Deutschland

Die Anzahl der Neuerkrankungen und der Sterbefälle bewegen sich sowohl bei Männern (blau) als auch bei Frauen (rot) auf einem ähnlich hohen Niveau. In dem angegebenen Zeitraum von 1999 bis 2016/2017 wurde eine stetige Zunahme von Neuerkrankungen und Sterbefällen registriert, die bis 2020 weiter zunehmen sollen (3).

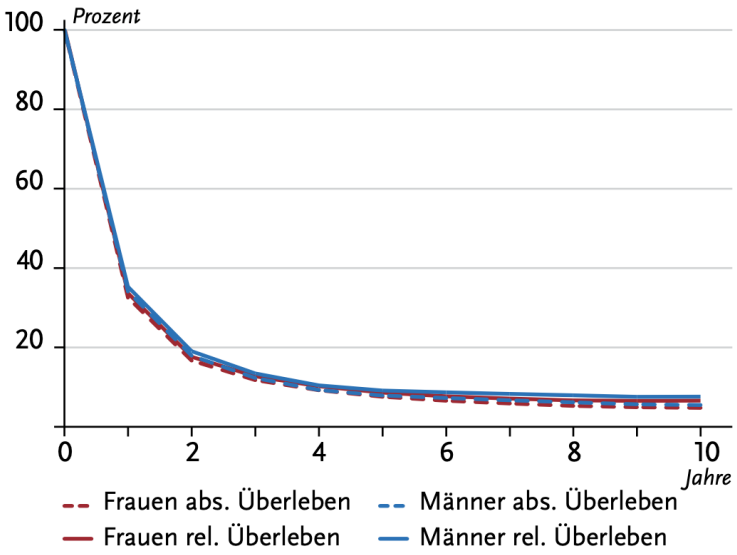

Abbildung 2: Absolute und relative Überlebensraten nach Erstdiagnose

Das PDAC hat sowohl bei Männern als auch bei Frauen die niedrigste Überlebensrate und fällt nach 5 Jahren auf 9 % bei beiden Geschlechtern (3).

Exokrine Pankreasadenokarzinome bilden etwa 95% aller bösartigen Neubildungen des Pankreas und entstehen durch sequentielle Veränderungen des Epithels im Pankreasgang (4). Wichtig zu nennen sind hier pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), nicht-invasive mikroskopische epitheliale Neoplasien, die durch Mutationen von Genen, wie zum Beispiel des Kirsten rat sarcoma viral Onkogens (K-ras), entstehen (5, 6). Akute und chronische Pankreatitiden können eine Metaplasie herbeiführen, die sich nicht mehr selbst reparieren kann und eine Mutation des K-ras-Onkogens vorweist (7). Das Gewebe verbleibt im metaplastischen Zustand und kann sich in der Folge zu PanIN-Läsionen entwickeln, wozu das von tumorassoziierten Makrophagen ausgeschüttete Zytokin Interleukin-6 (IL-6) beiträgt (7, 8). Der Einfluss von IL-6 führt dazu, dass die Metaplasien bestehen bleiben, während sich das metaplastische Gewebe in Abwesenheit von IL-6 regenerieren würde (7, 9). In Abbildung 3 wird die Entstehung von Metaplasien bis hin zum Karzinom schematisch dargestellt.

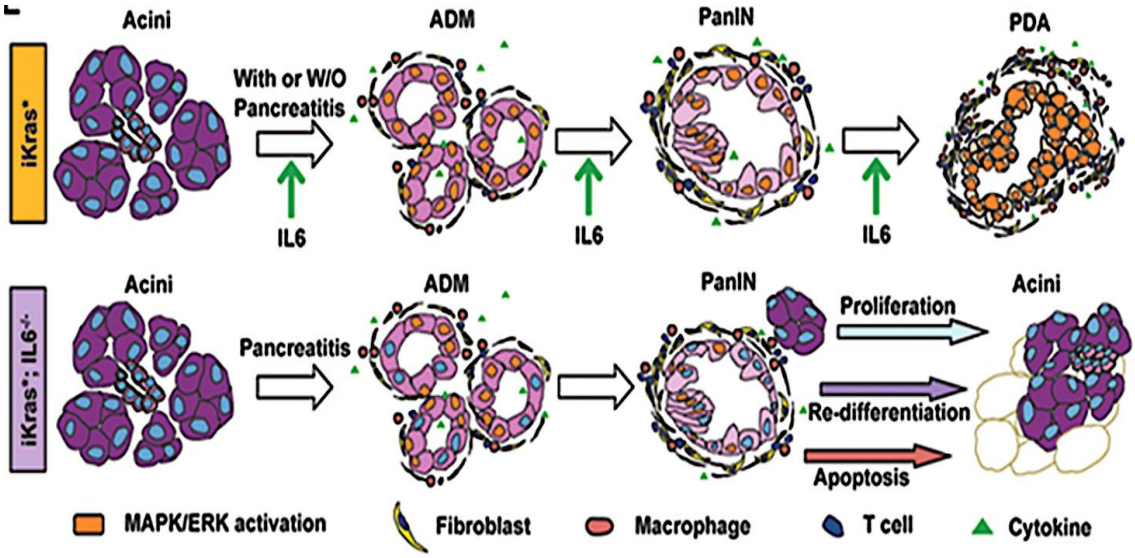

Abbildung 3: Progression von der pankreatischen Azinuszelle über PanIN-Läsionen zum Pankreasadenokarzinom

K-ras-mutierte pankreatische Azinuszellen entwickeln sich im Rahmen einer Pankreatitis zur azinär-duktalen Metaplasie (ADM) und PanIN-Läsionen, bis hin zum Karzinom (7). Bei Vorhandensein von IL-6 bleiben die Metaplasien bestehen und können zum Pankreasadenokarzinom (PDA) voranschreiten (7). In Abwesenheit von IL-6 würde sich das Gewebe durch Proliferation, Redifferenzierung und Apoptose zurück zur Azinuszelle regenerieren (7).

Patient:innen, die an PDAC erkranken, weisen häufig unspezifische Symptome auf, wie Oberbauchschmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken, Übelkeit, hellverfärbter Stuhl, Ikterus und Gewichtsverlust (10). Es wurden einige Risikofaktoren, wie starkes Übergewicht, Rauchen, chronische Pankreatitis und lang bestehender Diabetes mellitus identifiziert (6, 10, 11). Dazu kommen hereditäre Syndrome, die ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für PDAC assoziiert sind, wie eine Mutation im BRCA2-Gen, das Lynch-Syndrom und das Peutz-Jeghers-Syndrom (6, 10). Mögliche Screening-Methoden, wie bildgebende Verfahren, Mutationsnachweise oder Tumormarkerbestimmungen erwiesen sich nicht als prognostisch sinnvoll und werden deshalb in der aktuellen S3-Leitlinie nicht empfohlen (4). Diese Tatsachen erschweren eine frühzeitige Diagnose. Das führt dazu, dass die Diagnose häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt werden kann (5, 12). Dementsprechend ist nur ein geringer Anteil von 10-20% der Patient:innen zum Diagnosezeitpunkt operabel (13). Die chirurgische Resektion ist die einzige Möglichkeit der kurativen Therapie des PDAC, kann aber nur erfolgen, solange die Patient:innen keine Fernmetastasen haben (4). Gemäß der Leitlinie soll in diesem Fall keine Resektion erfolgen (4). Diese Patient:innen erhalten eine systemische medikamentöse Behandlung (14). Im Falle einer Infiltration von Gefäßen und Nachbarorganen kann

unter bestimmten Umständen eine kurative Operation durchgeführt werden (4, 15). Palliative Eingriffe zur symptomatischen Behandlung von Beschwerden, wie zum Beispiel Schmerzen oder einer Cholestase, sind möglich und können individuell sinnvoll sein (1, 4, 15). Das Ziel einer operativen Behandlung sollte immer die Resektion im Gesunden, die so genannte R0-Resektion, sein (4, 14). Die Ränder des entnommenen Präparates dürfen dabei keine pathologischen Zellen vorweisen (4). Das bedeutet, dass ein Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe vorhanden sein sollte, jedoch gibt es dazu keine einheitlichen Angaben (4). Als chirurgische Maßnahmen stehen die partielle Duodenopankreatektomie (Whipple-Operation, bzw. Traverso-Longmire Operation) mit oder ohne Pyloruserhalt, die Pankreaslinksresektion bei Pankreasschwanzkarzinom und die subtotale Pankreaslinksresektion und gegebenenfalls die totale Duodenopankreatektomie bei Pankreaskorpuskarzinom zur Verfügung (4). Bei Fehlen einer Fernmetastasierung werden Patient:innen in lokal begrenzt und resektabel und in lokal fortgeschritten eingeteilt (14). Patient:innen, die sich in einem lokal fortgeschrittenen Stadium befinden, werden noch einmal in grenzwertig („borderline“) resektabel und nicht resektabel eingeteilt (14). Konnte eine R0-Resektion bei Patient:innen im lokal begrenzten und resektablen Stadium stattfinden, sollte im Anschluss eine adjuvante Chemotherapie erfolgen (4, 14). Patient:innen, die sich im „borderline“ resektablen Zustand befinden, können von einer neoadjuvanten Chemotherapie vor einer chirurgischen Behandlung profitieren (14). Patient:innen im lokal fortgeschrittenen und nicht resektablen Zustand erhalten zunächst eine Chemotherapie, jedoch sollte im Verlauf die Resektabilität reevaluiert werden (14).

Eine wichtige Rolle im Therapiemanagement hat die Chemotherapie. Ob die Chemotherapie bei Patient:innen mit resektablen Tumoren neoadjuvant, adjuvant oder kombiniert neoadjuvant/adjuvant stattfinden sollte, wird aktuell diskutiert und kann derzeit noch nicht eindeutig beantwortet werden. Ein möglicher Vorteil der neoadjuvanten Chemotherapie könnte sein, dass bereits therapeutisch behandelte Tumore möglicherweise erfolgreicher R0-reseziert werden können (15). Raufi et al. formulierten eine Reihe von Vorteilen, die eine neoadjuvante Therapie mit sich bringe, darunter unter anderem die Anbehandlung der Tumormikroumgebung und der möglichen Reduktion der Tumormasse (16). Durch das Anwenden einer neoadjuvanten Chemotherapie wurde die Ansprechrate, das progressionsfreie

Überleben und das Gesamtüberleben gesteigert (11). Gillen et al. haben gezeigt, dass Patient:innen, die zum Diagnosezeitpunkt erst inoperabel waren, dann aber nach einer neoadjuvanten Therapie reseziert werden konnten, ein gleiches medianes Überleben hatten, wie Patient:innen, die zum Diagnosezeitpunkt operabel waren (13). D'Angelo et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen mit einer verbesserten Resektionsrate von zuvor inoperablen Patient:innen und zu einem ähnlichen medianen Überleben wie Patient:innen, die initial operabel waren (17). Möglicherweise könnte eine neoadjuvante Therapie die R0-Resektionsrate erhöhen, doch um die Frage zu beantworten, fehlen randomisiert-kontrollierte Studien (18). Aber auch mit erfolgreicher R0-Resektion ist die Rate eines lokalen oder systemischen Rezidivs mit bis zu 80% hoch (19). Da sich Patient:innen zum Zeitpunkt der Diagnose meist in einem Stadium der systemischen Erkrankung mit invasivem Tumorwachstum befinden, bleibt das Gesamtüberleben auf niedrigem Niveau (20-23).

Es stehen verschiedene Chemotherapieschemata zur Verfügung. Lange Zeit war die Monotherapie mit Gemcitabine die Therapie der Wahl, die mittlerweile durch die Kombination aus 5-Fluorouracil/Leucovorin mit Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) oder von Gemcitabine mit an Albumin-Nanopartikel gebundenes Paclitaxel (nab-Paclitaxel) abgelöst wurde, sofern die Patient:innen diese Therapie tolerieren (5, 11, 15). Gemcitabine als Monotherapie kann bei Patient:innen eingesetzt werden, die sich in einem schlechten Allgemeinzustand befinden (15). Bei Patient:innen, die sich in einem guten Allgemeinzustand befinden, ist die Therapie mit FOLFIRINOX hinsichtlich des Gesamtüberlebens der Therapie mit Gemcitabine überlegen (24). Die adjuvante Therapie mit modifiziertem FOLFIRINOX erzielte nach drei Jahren ein krankheitsfreies Überleben von 39,7% und ein Gesamtüberleben von 63,4% (25). Auch die Kombination aus nab-Paclitaxel und Gemcitabine erzielte bessere Ergebnisse hinsichtlich des Gesamtüberlebens (26). Awasthi et al. schlagen nab-Paclitaxel als Erstlinientherapie in der Behandlung des PDAC vor, nachdem sie unter der Kombinationstherapie aus Gemcitabine und nab-Paclitaxel keine Vorteile gegenüber der Monotherapie aus nab-Paclitaxel feststellen konnten (27). Außerdem könnte nab-Paclitaxel in Kombination mit neueren Therapiemöglichkeiten wie Immuntherapien oder molekularen Therapien bei Patient:innen im lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium eingesetzt werden (28). Paclitaxel

gehört zu den Taxanen, die die Polymerisation der Mikrotubuli während der Mitose steigern, was zum Zellzyklusarrest und letztendlich zum Zelltod führt (11, 29). Allerdings bringt eine Therapie mit Paclitaxel einige Nachteile mit sich. Dazu gehören das verstärkte Auftreten der Chemotherapie-induzierten peripheren Neuropathie (CIN) und die Induktion einer Inflammation mit der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, darunter auch IL-6 (30, 31). Die von Paclitaxel verstärkte IL-6-Sekretion wird mit der unter Paclitaxeltherapie häufig auftretenden CIN in Verbindung gebracht (30, 32). Die Inflammation, unter anderem vermittelt durch IL-6, kann zur Tumorproliferation, Invasion und Entwicklung einer Resistenz gegen Chemotherapeutika beitragen (31). Der verstärkende Effekt von Paclitaxel auf die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und die darauffolgende Inflammation ist stärker als bei anderen Chemotherapeutika und könnte die Wirkung bei der Tumorbekämpfung einschränken (31). Trotz der in den vergangenen Jahren verbesserten Therapieschemata bringen aggressive Chemotherapien Nachteile mit sich, wie hämatologische Nebenwirkungen und hohe Kosten (33).

Da eine hohe Anzahl der diagnostizierten Tumore inoperabel ist und die Ergebnisse der palliativen Chemotherapie trotz aller Fortschritte enttäuschend sind, besteht ein großes Interesse daran, eine wirksamere Therapie im Hinblick auf die Tumorprogression zu finden, um das Überleben zu verlängern oder im besten Fall die Erkrankung zu kurieren.

1.2 Gp130 als Bestandteil von Zytokinrezeptoren und dessen Rolle bei der Tumorgenese

Das Glykoprotein 130 (gp130) wurde 1978 erstmals beschrieben und ist ein Transmembranprotein, das ubiquitär im menschlichen Organismus exprimiert wird (34-36). Es ist ein Bestandteil von Zytokinrezeptorkomplexen und ist an inflammatorischen, autoimmunen und karzinogenen Prozessen beteiligt (34, 37).

IL-6, Interleukin-11 (IL-11), der Leukämiehemmende Faktor (LIF), Oncostatin M (OSM), der ziliäre neurotrophe Faktor (CNTF) und Cardiotrophin-1 (CT-1) gehören zu den Zytokinen, an deren Rezeptoren gp130 beteiligt ist (38). Bindet einer dieser Liganden an seinen Rezeptor, wird gp130 als Homodimer rekrutiert und bildet einen

Komplex mit Zytokin und Zytokinrezeptor (39). Die Konfiguration dieses Komplexes ist abhängig von der Art des Zytokins, was in Abbildung 4 dargestellt wird (39). Auf die Ligandenbindung folgt die Phosphorylierung von zwei assoziierten Tyrosinkinasen, den Januskinasen (JAK), woraufhin gp130 am zytoplasmatischen Ende tyrosinphosphoryliert wird (38, 39). Über ihre SH_2-Domäne bindet nun Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) an gp130 und wird von JAK phosphoryliert (39). In der phosphorylierten Form kann STAT3 dimerisieren und in den Zellkern gelangen, wo es die Expression von onkogenen Proteinen induziert (39). Diese haben einen Einfluss auf Proliferation, Überleben, Angiogenese und Migration von Tumorzellen (39-41). Der Siganaltransduktionsmechanismus von IL-6 wird in Abbildung 5 gezeigt. Zu den onkogenen Proteinen gehören Survivin, Bcl-2, Cyclin D1, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und Matrix-Metalloproteasen (42). Die STAT3-regulierten Gene sorgen für die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die wiederum die STAT3-Signalkaskade aktivieren (40). STAT3 besitzt also die Eigenschaft der Autoaktivierung („autocrine loop“), indem die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 zu einer weiteren Expression von IL-6 führt (43). Die Hochregulation von phosphoryliertem STAT3 (pSTAT3) und IL-6 wird mit der Chemoresistenz von Tumorzellen in Verbindung gebracht und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (43-46). Weitere Eigenschaften von STAT3 sind die Vermittlung der Ausbreitung von regulatorischen T-Zellen in Tumoren, die Verstärkung von Entzündung und Immunsuppression zugunsten der Tumorgenese (40). STAT-Proteine sind in einer Vielzahl von Tumorentitäten überexprimiert (47). In Ovarialkarzinomzellen aktiviert gp130 unermüdlich STAT3 und führt so zu Zellwachstum und -proliferation (42). Dementsprechend kann eine Inhibition von gp130 und STAT3 das Zellwachstum von Ovarialkarzinomzellen reduzieren (42).

Die Aktivität von STAT3 spielt ebenso eine Rolle in der Tumormikroumgebung des PDAC, indem es inflammatorische Prozesse vermittelt, die die Karzinogenese und Tumorprogression fördern (48-50). Sogenannte Sternzellen des Pankreas und myeoloide Suppressorzellen der pankreatischen Tumormikroumgebung schaffen ein proinflammatorisches Mileu, in dem IL-6 sezerniert wird und konsekutiv STAT3 phosphoryliert wird (44, 51). Außerdem kommt es zu einer Vermehrung der myeloiden Suppressorzellen und einer dadurch verursachten lokalen

Immunsuppression (44). STAT3 spielt damit eine bedeutende Rolle in der Interaktion zwischen Tumorzellen und Stromazellen (44, 50). Tatsächlich führte die Blockade der STAT3-Signalkaskade mittels eines JAK-Inhibitors in Kombination mit Gemcitabine zu einer Beeinflussung der Tumormikroumgebung im PDAC (44). Die STAT3-Inhibition hatte eine erhöhte Gefäßdichte in der Tumormikroumgebung zur Folge, was laut der Autor:innen dazu führte, dass die systemische Chemotherapie den Tumor besser erreichte (44, 50, 51).

Die beschriebenen Effekte von Zytokinen, gp130 und STAT3 auf Tumorzellen können sich als therapeutisches Target für Therapieoptionen nutzen lassen. Da die Assoziation zwischen Karzinogenese und der gp130/JAK/STAT3-Signalkaskade auch im PDAC beobachtet wurde, erscheint es nur sinnvoll, diese Zellen genauer zu untersuchen und Möglichkeiten zu finden, die Kaskade zu unterbrechen (52).

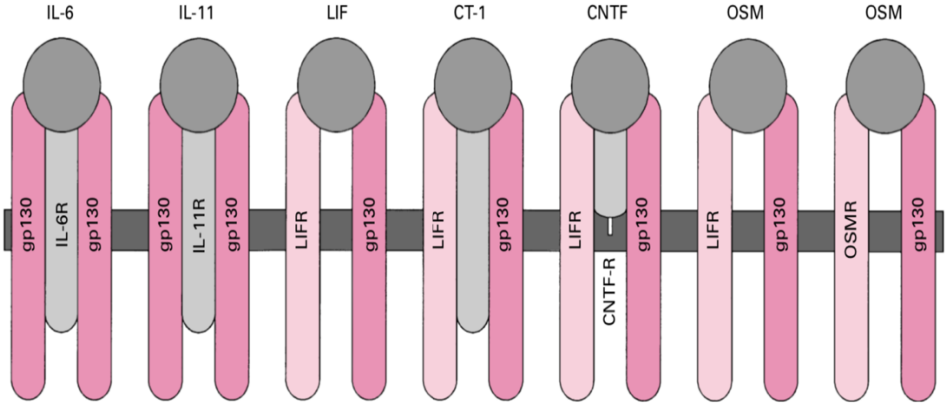

Abbildung 4: Zytokin-Zytokin-Rezeptor-gp130-Komplexe

IL-6 und IL-11 binden an deren jeweiligen membranständigen Rezeptoren, die mit einem gp130-Homodimer assoziiert sind (39). LIF, CTNF, CT-1 und OSM binden Heterodimere aus gp130 mit entweder LIFR oder OSMR (39).

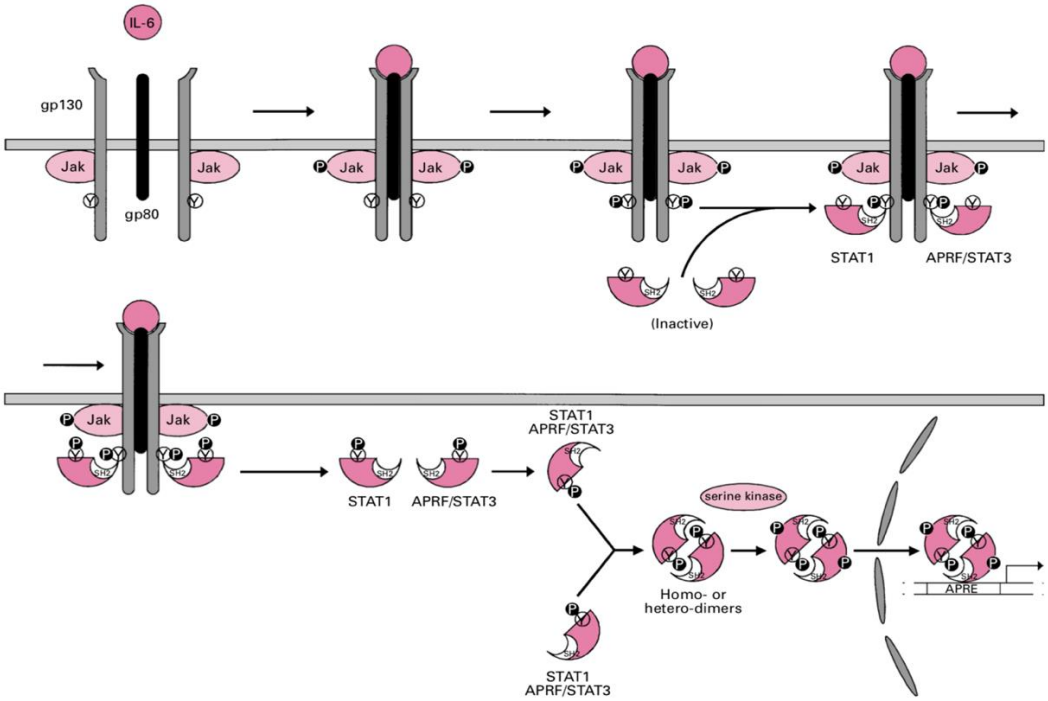

Abbildung 5: Signaltransduktionsmechanismus von IL-6

Die Bindung von IL-6 an der Zelle führt zur Dimerisierung von zwei gp130-Molekülen, daraufhin werden zwei assoziierte JAK-Moleküle phosphoryliert, die wiederum das gp130-Dimer phosphorylieren (39). Das kreiert Bindungsstellen für zwei STAT3-Moleküle, die konsekutiv auch phosphoryliert werden und Homo- oder Heterodimere bilden, in den Zellnukleus gelangen und dort als Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren (39).

1.3 Die Rolle von IL-6 und OSM bei der Tumorentstehung und deren Relevanz beim PDAC

Von den Zytokinen, deren Rezeptoren mit gp130 interagieren, sind IL-6 und OSM beim PDAC von besonderem Interesse. Neben dem Mammakarzinom, Kolonkarzinom und Multiplem Myelom ist die Konzentration von IL-6 auch im Serum von Patient:innen mit PDAC verglichen mit gesunden Patient:innen stark erhöht und mit größeren Tumoren und schlechter Prognose assoziiert (41, 50, 53, 54). IL-6 wurde außerdem als Risikofaktor für eine ausgedehnte hepatische Metastasierung identifiziert (55). Auch gesteigerte Werte von OSM konnten in Patient:innen mit PDAC beobachtet werden (12). Da inflammatorische Prozesse eine große Rolle bei der Tumorentstehung spielen, sind IL-6 und OSM als Entzündungsmediatoren dabei von Bedeutung (33, 56). Während der Karzinogenese werden Entzündungszellen in die Tumormikroumgebung rekrutiert, die dort Zytokine und Chemokine ausschütten (12). Auch die Tumorzellen selbst können

diese Entzündungsmediatoren ausschütten, was Metastasierung, Invasion, Angiogenese und weitere die Karzinogenese fördernde Prozesse fördert (12).

IL-6 wirkt entweder über das kanonische Signaling oder das trans-Signaling (57, 58). Beim kanonischen Signaling bindet IL-6 an den IL-6-Rezeptor (IL-6R) an der Zelloberfläche und leitet über die Interaktion mit gp130 vor allem regenerative Mechanismen ein (58). Über das trans-Signaling werden überwiegend proinflammatorische Mechanismen in Gang gebracht, indem IL-6 und der lösliche IL-6R (sIL-6R) an das Transmembranprotein gp130 binden (59). Das trans-Signaling kann also in allen Zellen stattfinden, auch in Zellen, die keinen IL-6R exprimieren (59, 60). IL-6 ist dabei über STAT3 ein wesentliches Bindeglied beim Crosstalk zwischen Tumorzellen und Tumormikroumgebung (61). Tumorzellen und Stromazellen schütten IL-6 aus und aktivieren somit die gp130/JAK/STAT3-Signalkaskade, was zu einem konstitutiv aktivierten pSTAT3 führt (40, 62). Der Signalweg von IL-6 über gp130 und STAT3 wird mit der Entstehung und Progression vom PDAC in Verbindung gebracht, indem in mehreren pankreatischen Tumorzelllinien eine vermehrte Viabilität und STAT3-Phosphorylierung beobachtet wurden (33).

Torres et al. konnten bei Patient:innen mit PDAC eine erhöhte Serumkonzentration von weiteren Zytokinen nachweisen, darunter auch das mit gp130 assoziierte Zytokin OSM (12). OSM gehört zur Familie der IL-6-Zytokine und ist in zahlreiche biologische Prozesse involviert, unter anderem in die Hämatopoese, die mesenchymale Stammzelldifferenzierung, die Leberregeneration, das Remodeling im Herzmuskel und auch in der Nozizeption und Inflammation (63). Es ist das einzige Zytokin der IL-6-Familie, das direkt an gp130 bindet (35). Durch die Bindung entsteht entweder ein Heterodimer aus gp130 und dem OSM-Rezeptor (OSMR) oder ein Heterodimer aus gp130 und dem LIF-Rezeptor (LIFR) (35). Bindet OSM an einen dieser Rezeptoren wird die JAK/STAT3-Kaskade in Gang gesetzt, wie auch durch IL-6 (56). In Abbildung 6 wird dargestellt, wie die verschiedenen Zytokine an die jeweiligen Rezeptoren binden und mit gp130 interagieren. Welche Rolle OSM in der Tumorentstehung hat, ist von der Tumorentität abhängig, was in Abbildung 7 veranschaulicht wird (63). OSM steht im Verdacht, Proliferation, Zellmigration, Zellinvasion und epithelial-mesenchymale Transition (EMT) über STAT3-

Aktivierung im Osteosarkom, Ovarialkarzinom, Plattenepithelzellkarzinom der Zervix und Mammakarzinom zu verstärken (64-70). Im Zervixkarzinom konnte eine Überexpression des OSMR und ein gesteigertes Ansprechen auf OSM nachgewiesen werden, was mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert wurde (71). Beim Mammakarzinom korrelierte die hohe Expression von OSMR sowohl mit einer signifikant verkürzten Rezidivfreiheit als auch mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben (72). OSM spielt auch in der STAT3-assoziierten und K-ras-induzierten Tumorgenese des PDAC eine Rolle (52). Der Signalweg über den OSMR-gp130-Heterodimer kann nicht durch andere Zytokine der IL-6-Familie induziert werden (73). Außerdem hat OSM das vermutlich breiteste Wirkungsprofil von allen Zytokinen der IL-6-Familie (63). Dies macht OSM als potentielles therapeutisches Target attraktiv.

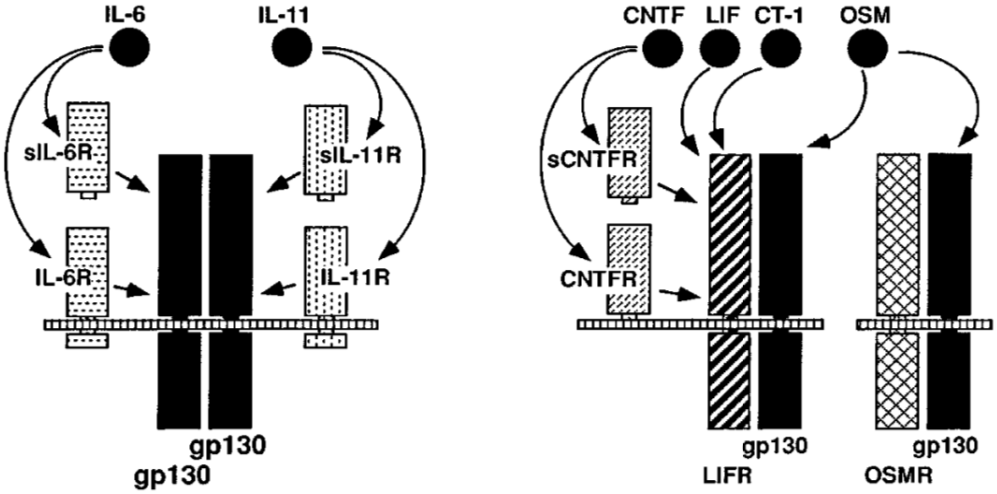

Abbildung 6: Interaktionen von gp130 und den Zytokinen der IL-6-Familie

IL-6 und IL-11 binden die lösliche Form ihrer Rezeptoren (sIL-6R oder sIL-11R) und interagieren mit einem membranständigen gp130-Homodimer (35). CNTF bindet an CNTFR und interagiert mit einem LIFR-gp130-Heterodimer (35). LIF und CT-1 interagieren auch mit einem LIFR-gp130-Heterodimer (35). OSM bindet als einziges Zytokin der IL-6-Familie direkt an gp130 und bildet entweder einen LIFR-gp130-Heterodimer oder einen OSMR-gp130-Heterodimer (35).

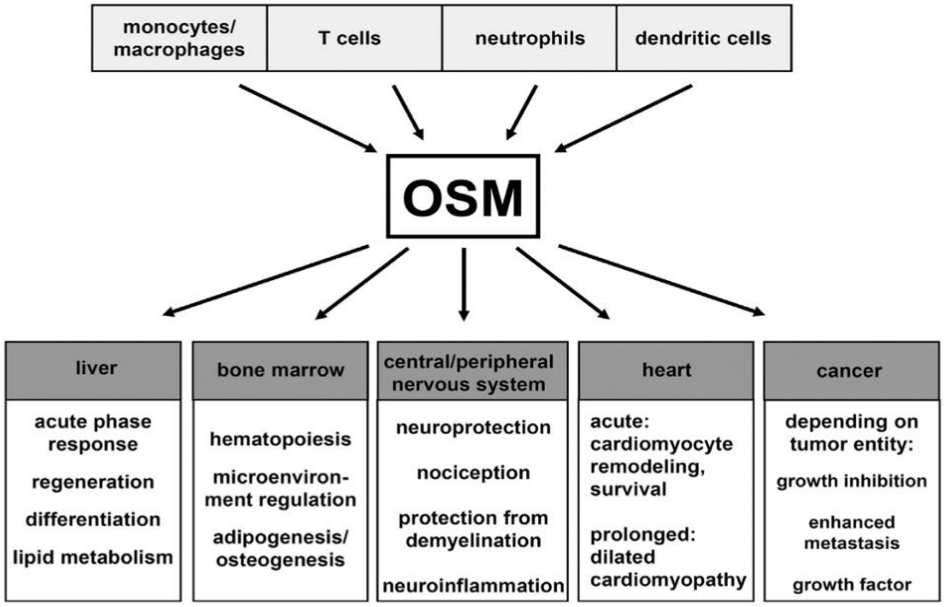

Abbildung 7: Aktivierung und Funktion von OSM

OSM spielt nach seiner Aktivierung durch Monozyten, T-Zellen, Neutrophilen und dendritischen Zellen eine Rolle im Lebermetabolismus, der Hämatopoese und dem Remodelling im Herzmuskel (63). In verschiedenen Tumorentitäten entfaltet es unterschiedliche Wirkungen (63).

Sowohl IL-6 als auch OSM scheinen also beim PDAC von klinischer Relevanz zu sein. Wie sich diese Signalwege therapeutisch nutzen lassen, ist bislang nicht ausreichend charakterisiert. Das macht IL-6 und OSM zu attraktiven Targets für neue Krebstherapien.

1.4 Neue therapeutische Optionen beim PDAC

Wie wirksam eine Inhibition der Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor und die darauffolgende Signalkaskade auf das Tumorwachstum und die Expression onkogener Gene in Zelllinien verschiedener Tumorentitäten ist, ist gut beschrieben (33, 42, 53, 74). Die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren Raloxifen und Bazedoxifen sind wirkungsvolle Inhibitoren des gp130-Zytokinrezeptor-Komplexes (33, 75). So konnten in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen unter anderem bei Leberkarzinomzellen, Mammakarzinomzellen, Kolonkarzinomzellen, aber auch bei PDAC-Zellen gute Ergebnisse in Bezug auf Tumorentstehung und Tumorprogression erzielt werden (41, 53, 76). Relevant sind auch Inhibitoren von JAK, die klinisch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis untersucht

werden (77, 78). JAK-Inhibitoren sind allerdings mit unerwünschten Wirkungen wie opportunistischen Infektionen assoziiert, da es im Rahmen der Behandlung zu einer Immunsuppression kommt (79, 80). Ebenso Gegenstand der Forschung sind STAT3-Inhibitoren (79). Des Weiteren besteht die Option der monoklonalen Antikörper zur direkten Inhibition von Bestandteilen der Signaltransduktionswege wie zum Beispiel IL-6 (81). Ein Beispiel stellt der anti-IL-6R-Antikörper Tocilizumab dar, der bereits für die Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird (82). Eine solche direkte Blockade der Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor könnte auch in zahlreichen Karzinomen eine attraktive Therapieoption sein. Tocilizumab wurde in PDAC-Zellen *in vitro* und im präklinischen Mausmodell getestet und konnte die Tumorprogression durch Antagonisierung der IL-6-vermittelten Stimulation inhibieren (74). Jedoch werden auch bei monoklonalen Antikörpern eine Reihe von unerwünschten Wirkungen beschrieben (81, 83, 84). Die direkte Inhibition von IL-6 oder seinem Rezeptor IL-6R unterbricht zwar die Signalkaskade, führt jedoch im Umkehrschluss zu massiv erhöhten IL-6-Werten im Patient:innenserum und erhöhtem Infektionsrisiko (33, 41, 85). Direkte IL-6- oder IL-6R-Antikörper inhibieren außerdem auch das kanonische Signaling, wodurch regenerative Mechanismen unterbunden werden könnten (60, 86). Jedoch spielt nicht nur IL-6 eine Rolle in der Entstehung vieler Tumore, sondern diverse andere Zytokine, die das Fehlen von IL-6 kompensieren könnten (42, 87). Eine Strategie, diese Probleme zu eliminieren, könnte darin bestehen, an weiter nachgeordneten Schritten der Signalkaskade einzugreifen. Deswegen konnten einige weitere niedermolekulare Verbindungen identifiziert werden, die auf Signaltransduktionsebene eingreifen (88-92). XZH-5 zum Beispiel blockiert die Dimerisierung von STAT3, ebenso wie LLL12 in mehreren Tumorentitäten und FLLL31 und FLLL32 in Brust- und Pankreaskrebszellen (88, 89, 93). Niedermolekulare Verbindungen haben gegenüber zum Beispiel JAK-Inhibitoren den Vorteil, dass sie je nachdem, welche Verbindung sie blockieren, spezifischer sind (79). JAK-Inhibitoren blockieren hingegen eine ganze Reihe an Zytokinen und Mediatoren (79).

Als möglicher Inhibitor der gp130/JAK/STAT3-Signalkaskade kommt die niedermolekulare Substanz SC144 in Frage. SC144 wurde entdeckt, als nach antiviralen Substanzen gesucht wurde, die womöglich als Mittel für die Krebsbekämpfung wiederverwendet werden können (94). Dazu wurde eine

Datenbank analysiert, die Verbindungen beinhaltet, die in der HIV-Therapie eingesetzt werden können (94). Es wurden Salizylhydrazide entdeckt, die in einer Reihe von Tumorzellen zytotoxisch wirken und ausgehend davon wurden Quinoxalinhydrazide synthetisiert, darunter die Verbindung SC144 (94, 95). Aufgrund der niedermolekularen Verbindung bedarf SC144 im Körper keine weitere Modifikation und kann so stabil bleiben und in Zellen eindringen (95). SC144 besitzt „drug-like“ Eigenschaften, diese beinhalten zum Beispiel die Absorption und Bioverfügbarkeit, und es kann mit vergleichsweise geringem Aufwand synthetisiert werden (94, 95). Die Eigenschaften von SC144 machen es zu einem attraktiven Kandidaten für den klinischen Einsatz, da es *in vitro* Apoptose induziert, die Zellzyklusprogression hemmt, in gesunden Epithelzellen kaum Wirkung zeigt und sich *in vivo* hemmend auf die Tumorprogression auswirkt (42, 94-96). SC144 könnte in Verbindung mit anderen Medikamenten eingesetzt werden, die auch Zellzyklusarrest induzieren, wie zu Beispiel Taxanen (95). Außerdem wirkt SC144 auch in Zellen zytotoxisch, die gegen gängige Chemotherapeutika resistent sind (94, 96). Die Entdeckung von Salizylhydraziden und die daraus resultierende Synthese von SC144 sind Beispiele dafür, dass Substanzen, die eigentlich für eine andere Indikation gedacht waren, im Sinne eines „drug repurposing“ für Tumorindikationen umfunktioniert werden können (94, 97).

Seine zytotoxische Wirkung entfaltet SC144 als Inhibitor der gp130/JAK/STAT3-Signalkaskade, indem es an gp130 bindet und dessen Internalisierung bewirkt (42, 94). Die Wirkung von SC144 beinhaltet die Inhibition der Phosphorylierung von STAT3 und der Inhibition der darauffolgenden Genexpression (42). Es kommt zum Zellzyklusarrest, der Inhibition der Angiogenese und zur Induktion von Apoptose (42). SC144 wurde bereits im Kontext mit PDAC untersucht und zeigte auch hier eine Inhibition der gp130/JAK/STAT3-Kaskade, indem es die Zellviabilität, metabolische Aktivität und Proliferationsaktivität effektiv hemmte (33, 42). In Ovarialkarzinomzellen inhibierte SC144 das Zellwachstum und die Koloniebildung, induzierte den Zelltod der Tumorzellen und verursachte *in vivo* keinen Zelltod in gesunden Zellen (42). SC144 inhibierte in Ovarialkarzinomzellen neben der durch IL-6 stimulierten Signalkaskade über gp130 auch das LIF-Signaling, was nahelegt, dass es auch verwandte Signalwege aus der IL-6-Familie, wie OSM, beeinflussen könnte (42). In Kolon- und Mammakarzinomzellen reduzierte SC144 nicht nur

signifikant die Tumormasse, es wirkte auch synergistisch mit 5-Fluorouracil und Oxaliplatin in Kolonkarzinomzellen und mit Paclitaxel in Mammakarzinomzellen und hat das Potential in gegen Chemotherapie resistenten Krebszelllinien wirksam zu sein (95, 96).

Die Ergebnisse von früheren Untersuchungen von SC144 zeigen daher, dass SC144 ein wirkungsvoller Inhibitor der Signalkaskaden und Stoffwechsel von Tumorzellen verschiedener Entitäten ist und auch in Zellen wirkt, die gegen gängige Chemotherapeutika resistent sind (42, 94-96). Darüber hinaus könnte es zusätzlich synergistische Effekte mit zytotoxischen Chemotherapeutika geben (94, 96).

2. Zielsetzung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Rolle von OSM und IL-6 im gp130/JAK/STAT3-Signalweg in der PDAC-Zelllinie L3.6pl, die sich durch ein aggressives lokales und metastatisches Wachstum auszeichnet (98). Zugleich wird der Einfluss der niedermolekularen Substanz SC144 untersucht.

Es ergeben sich konkret folgende Fragestellungen:

- Führt SC144 zu einer Veränderung der Zellviabilität und des Proliferationsverhaltens?
- Kann SC144 die Wirkung von Paclitaxel *in vitro* beeinflussen und womöglich verstärken?
- Können IL-6 und OSM die STAT3-Phosphorylierung induzieren und kann SC144 dies unterbinden?
- Lassen sich die Effekte von SC144 *in vivo* darstellen?

Um den Einfluss von IL-6 und OSM in L3.6pl-Zellen auf Proteinebene zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Immunoblotanalysen in Form von Western Blots durchgeführt, die das Ausmaß der Phosphorylierung von STAT3 zeigen sollen. Die metabolische Aktivität und das Proliferationsverhalten unter Einfluss von SC144 und Paclitaxel sollte mittels MTT- und BrdU-Assays evaluiert werden. Zuletzt wurde in einem orthotopen PDAC-Mausmodell der Effekt von SC144 *in vivo* beobachtet.

3. Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1 Zelllinien

Für alle Experimente wurde die Zelllinie L3.6pl verwendet. L3.6pl ist ein Derivat der PDAC-Zelllinie FG (98). Durch repetitive *in vivo*-Passagierung hat die Zelllinie einen lokal und metastatisch aggressiven, angiogenen Phänotyp akquiriert, indem sie signifikant mehr vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Interleukin-8 (IL-8) und Marix-Metalloprotease-9 (MMP-9) und weniger E-cadherin als die weniger metastatischen FG-Zellen exprimiert (98). Vermindertes E-cadherin wird mit verstärkter Invasivität und Metastasen assoziiert, FGF und VEGF induzieren Migration und Proliferation, IL-8 wirkt proinflammatorisch und MMP-9 ist mit einer verstärkten Revaskularisation assoziiert (98, 99). Des Weiteren ist die Zelllinie L3.6pl K-ras2-mutiert (100).

3.1.2 Verbrauchsmaterial, Geräte, Substanzen und Puffer

Alle für die *in vitro*- und *in vivo*-Versuche verwendete Materialien werden im Anhang in den Tabellen 2-9 auf den Seiten 69-74 aufgelistet.

3.1.3 Athymische Nacktmäuse

Für die *in vivo*-Versuche wurden männliche athymische Balb/c$^{nu/nu}$ Nacktmäuse von *Janvier* (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) gekauft. Die immunsupprimierten Mäuse wurden in Käfigen in einem Klimaschrank mit einem 12h/12h Tag-Nacht-Zyklus bei einer konstanten Temperatur von 23°C gehalten. Es wurden zwei bis drei Mäuse pro Käfig gehalten. Die Käfige waren mit autoklaviertem Streu, Holzstäbchen, Zellstoff und Papphäuschen ausgestattet. Wasser und Futter waren *ad libitum* zur Verfügung.

Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (Landesamt für Gesundheit und Soziales, LAGeSo, Berlin, G212/17, 18.12.2017) und gemäß der Leitlinien der Europäischen Union (EU-Direktive 2010/63/EU) durchgeführt. Die

Tierversuchstätigkeiten der Autorin wurden im Rahmen einer Ausnahmegenehmigung (LAGeSo) für das genannte Projekt entsprechend §16 Absatz 1 Tierschutz-Versuchstierverordnung nach Anweisung durchgeführt. Die Autorin hatte zuvor an einem entsprechenden Tierversuchskurs teilgenommen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Für die *in vitro*-Experimente und im orthotopen PDAC-Mausmodell wurden L3.6pl-PDAC-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin im CO_2-Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 in 75cm^2-Kulturflaschen kultiviert, einmal wöchentlich gesplittet und neu ausgesät. Dafür wurden die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Danach erfolgt die Ablösung mittels 3ml 0,05% Trypsin gelöst in EDTA. Nachdem sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst hatten, wurde 7ml Medium zugefügt. Die Suspension wurde in ein Reagiergefäß überführt und fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen und das am Boden des Ragiergefäßes entstandene Pellet mit 10ml DMEM resuspendiert. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop gezählt und entsprechend in frische Kulturflaschen ausgesät.

3.2.2 BrdU-Assay

Ein kolorimetrischer 5-Brom-2‘-desoxyuridin (BrdU)-Assay wurde verwendet, um die Proliferationsfähigkeit von Zellen und die Inhibierung davon durch Zugabe der getesteten Substanzen zu messen. Hierbei wird BrdU als Thymidinanalogon in die DNA der Zellen während der Proliferation integriert (101). Es erfolgt die Bindung eines Antikörpers gegen BrdU, an den anschließend ein farbmarkierter Sekundärantikörper gebunden wird (101). Mittels photometrischer Messung kann der Farbstoff detektiert werden, dessen Absorption ein indirektes Maß für die Proliferationsrate darstellt (101).

Für den Assay wurden 5000 L3.6pl-Zellen in 300µl serumfreien DMEM in 96-Well-Platten ausgesät. Für jede Probe wurde eine Sechsfachbestimmung durchgeführt.

Jeweils ein Well wurde mit 300µl serumfreiem DMEM ohne Zellen befüllt. Die Platte wurde über Nacht im CO_2-Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Substanzen SC144 und Paclitaxel in den jeweiligen Konzentrationen (verdünnt mit DMSO) mit serumfreiem DMEM hinzugegeben und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Als nächstes wurde das DMEM vorsichtig abgesaugt und pro Well wurden 100µl BrdU-Lösung (1:1000 verdünnt in serumfreiem DMEM) pipettiert und die Platte für drei Stunden bei 37°C inkubiert, damit das BrdU während der Replikation in die DNA inkorporiert werden konnte. Das Medium wurde dekantiert. Es wurden pro Well 200µl Fixierlösung hinzugegeben und 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100µl pro Well BrdU-Antikörper (1:100 in antibody dilution solution verdünnt) hinzugegeben und erneut bei Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert. Dann wurden die Wells dreimal mit je 300µl PBS gewaschen und 100µl substrate solution pro Well hinzugegeben. Die Platte wurde für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels 25µl Schwefelsäure pro Well wurde die Reaktion beendet. Die Platte wurde im Spektrometer für eine Minute bei Intensität 1 geschüttelt und bei 450nm innerhalb von fünf Minuten gemessen. Die gemessenen Daten wurden mittels Excel ausgewertet.

3.2.3 MTT-Assay

Der MTT-Assay beruht auf der Umwandlung des wasserlöslichen gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein unlösliches violettes Formazan (102). Verantwortlich dafür ist die mitochondriale Reduktase der Zellen (102). Nach Auflösung des Formazans kann dessen Konzentration photometrisch gemessen werden (102). In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren zu Nutze gemacht, um die metabolische Aktivität als Surrogat für die Viabilität von L3.6pl-Zellen zu bestimmen.

Wie beim BrdU-Assay wurden 5000 L3.6pl-Zellen in serumfreiem DMEM in 96-Well-Platten ausgesät. Für jede Probe wurde eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Ein Well wurde mit 300µl DMEM ohne Zellen befüllt. Die 96-Well-Platte wurde für 24 Stunden im CO_2-Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das DMEM abgesaugt und es wurden die Testsubstanzen in den

jeweiligen Konzentrationen mit serumfreiem DMEM hinzugegeben. Das Endvolumen für jedes Well betrug 200µl. Eine unbehandelte Probe fungierte als Kontrolle. Die Platte wurde für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Als nächstes wurde das DMEM abgesaugt und 100µl serumfreies DMEM mit 10µl MTT-Lösung (50mg MTT mit 10ml PBS) pro Well pipettiert. Die Platte wurde vier Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nach den vier Stunden wurden 100µl 10% SDS hinzugegeben und die Platte wurde noch einmal für drei Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. In der Zeit erfolgte die Zelllyse. Danach wurde die optische Dichte mittels Spektrometer bei 550nm Wellenlänge gemessen. Die gemessenen Daten wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

3.2.4 Western Blot

Um herauszufinden, ob und wie viel STAT3-Protein in L3.6pl-Zellen nach IL-6- oder OSM-Stimulation und SC144-Behandlung exprimiert wird und welche Konzentrationen von SC144 eine Reduktion der Phosphorylierung von STAT3 bewirken, wurden Immunoblotanalysen in Form von Western Blots durchgeführt.

Für die Western Blots wurden am ersten Tag L3.6pl-Zellen in Kulturflaschen analog zu dem Protokoll in 3.2.1 ausgesät. Für die Ermittlung der benötigten Menge von DMEM und Zellen pro Well für eine 6-Well-Platte wurde die Anzahl der Zellen in der Zählkammer mit 10^4 multipliziert. Pro Well wurden 1,5 Millionen Zellen ausgesät. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 2ml pro Well ausgesät und über Nacht im CO_2-Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Am Folgetag wurde das Medium entfernt und pro Well 2ml frisches serumfreies DMEM dazugegeben. In das erste und zweite Well wurden 2µl DMSO gegeben, diese Wells fungierten als Kontrolle. In Wells 3-6 wurden 2µl SC144 (in DMSO gelöst) in aufsteigender Konzentration gegeben. Die Platte wurde für 120 Minuten inkubiert. Danach wurden in Wells 2-6 jeweils 100ng/ml IL-6 (in Essigsäure gelöst) pipettiert. In das erste Well wurde die entsprechende Menge Essigsäure pipettiert. Je nach Versuchslänge wurde die Platte für drei, 6 oder 24 Stunden inkubiert. Für die Stimulation der Zellen mit 50ng/ml OSM (gelöst in ddH_2O und BSA) und die

Behandlung mit SC144 wurde der identische Versuchsaufbau verwendet. Die Kontrolle wurde mit in ddH_2O verdünntem BSA behandelt (Abbildung 8).

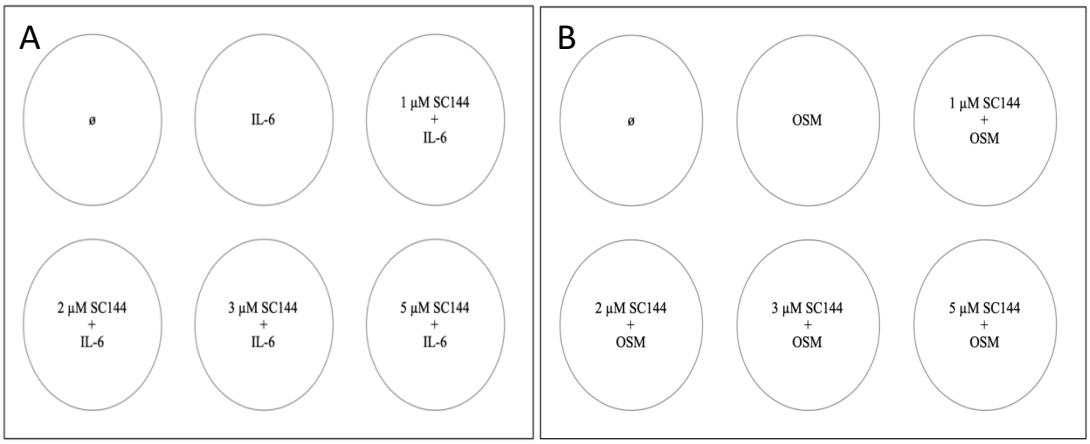

Abbildung 8: Schema der 6-Well-Platten für die Immunoblotanalyse mit L3.6pl-Zellen

Behandlung von L3.6pl-Zellen mit SC144 für 120 Minuten und der Stimulation mit 100ng/ml IL-6 (A) oder 50ng/ml OSM (B) für weitere 3, 6 oder 24 Stunden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bei 5% CO_2. Das erste Well diente als Negativkontrolle und wurde 120 Minuten mit DMSO und anschließend mit dem jeweiligen Lösungsmittel des untersuchten Zytokins behandelt, im Versuch mit IL-6 Essigsäure (A) oder BSA-ddH_2O im Falle von OSM (B). Das zweite Well diente als Positivkontrolle und wurde 120 Minuten mit DMSO und anschließend entweder mit 100ng/ml IL-6 (A) oder mit 50ng/ml OSM (B) behandelt. Wells 3 bis 6 wurden für 120 Minuten mit den Konzentrationen 1µM, 2µM, 3µM und 5µM SC144 gelöst in DMSO und anschließend mit entweder IL-6 (A) oder OSM (B) behandelt.

Für die Zelllyse wurde das DMEM aller Wells abgenommen und jedes Well mit 1ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 200µl Lysepuffer (Protease-Inhibitor-Cocktail mit RIPA 1:100 verdünnt) pro Well lysiert. Die 6-Well-Platten wurden auf Eis platziert und mittels Zellschabern wurden die Zellen der Wells vom Untergrund abgelöst. Der Inhalt der Wells wurde jeweils in ein Reagiergefäß überführt und im Vortex vermischt. Die Reagiergefäße wurden 15 Minuten auf Eis gelagert und zwischendurch mit dem Vortex vermischt. Anschließend wurden die Reagiergefäße für 10 Minuten bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände in den Reagiergefäße wurden in frische Reagiergefäße überführt, welche bei -20°C gelagert wurden.

Darauf erfolgte die Bestimmung der Proteinmengen in den Lysaten. Als Kontrolle wurde eine BSA-Verdünnungsreihe, bestehend aus BSA, dem Lysepuffer und ddH_2O, in den Konzentrationen 50µg/µl, 25µg/µl, 15µg/µl und 6,25µg/µl erstellt.

Die Lysate wurden 1:200 in ddH_2O verdünnt. Als nächstes wurde eine BCA-Lösung mittels des QuantiPro BCA Protein Assay Kit aus drei Komponenten erstellt. Für die Messung wurden sowohl von der BSA-Verdünnungsreihe (Konzentration absteigend), als auch der Lysate (SC144-Konzentration aufsteigend) jeweils zweimal 100µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden 100µl der BCA-Lösung in jedes Well pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 60°C für 60 Minuten. Nach der Inkubation wurde die Platte im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen. Mittels Microsoft Excel wurden die Daten eingelesen, eine BSA-Kurve erstellt und die für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zu pipettierenden Proteinmengen ermittelt, mit dem Ziel, identische Mengen an Protein in jeder Probe zu erhalten.

Um die Proteine der Lysate aufzutrennen und zu detektieren, erfolgte eine SDS-PAGE. Dafür wurden Trenngele mit Polyacrylamid (PAA) gegossen (Tabelle 5). Zuerst wurde die Lösung für das Trenngel zwischen zwei aufgespannte Glasplatten gegossen und mit Ethanol abgedeckt, bis die Lösung vollständig polymerisiert war und feste Gele entstanden. Danach wurden die Gläser mit der Lösung für das Sammelgel aufgefüllt und für jedes Gel eine Kammerschablone eingefügt. PAA, 1,5M Tris, 0,5M Tris und TEMED standen als fertige Lösungen zur Verfügung. SDS und APS wurden vorher zubereitet und gelagert. Weiterhin mussten für die SDS-PAGE folgende Puffer angefertigt werden: 10x West-Puffer, Elektrophoresepuffer und 1x West/Transferpuffer (Tabelle 5).

Die bei der Proteinbestimmung ermittelten Mengen der Lysate wurden jeweils mit der gleichen Menge Laemmli-Ladepuffer und der ermittelten Menge Lysepuffer in Reagiergefäßen gemischt, für fünf Minuten bei 95°C im Thermomixer erhitzt, anschließend eine Minute auf Eis gelegt und für wenige Sekunden bei 5000 rpm zentrifugiert. Pro SDS-PAGE-Gerät wurden zwei Gele eingesetzt und mit 1x EPHO aufgefüllt. Die erste Kammer jedes Gels wurde mittels einer Hamilton-Spritze mit 20µl Markerprotein gefüllt. Der Marker enthielt Proteine mit definierten Kilodalton (kDa), an der sich bei der späteren Detektion orientiert werden konnte. In die weiteren Kammern wurden je 25µl der Proben gespritzt. Anschließend lief die SDS-PAGE bei 100 Volt für ungefähr 90 Minuten. Darauf folgte der Transfer der Proteine von den Gelen auf PVDF-Membranen. Dafür wurden die Gele für 15 Minuten in

Transferpuffer auf dem Schüttler bei Raumtemperatur equilibriert. Die Gele wurden zwischen Filterpapier, PVDF-Membran, die vorher eine Minute in 100% Ethanol eingelegt wird, und Schwämmen in eine Gel Holder Kassette platziert, die in das entsprechende Gerät eingelegt wurde. Das Gerät wurden mit 1x Transferpuffer aufgefüllt und auf einem Magnetrührgerät platziert. Der Transfer lief unter Rühren und Kühlung bei 100 Volt für 60 Minuten.

In separaten Schalen wurden die Membranen 10 Minuten auf dem Schüttler in TBS-T gewaschen und anschließend 120 Minuten in einer Mischung aus 5% BSA, 0,02% Natrium-Azid und TBS-T bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geblockt. Danach wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 Minuten in TBS-T gewaschen und entweder in STAT3- oder pSTAT3-Primärantikörper eingelegt und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler platziert. Am Folgetag wurden die Membranen erneut dreimal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Membranen in anti-rabbit Sekundärantikörper, 1:1000 in 1,5%iger Milchpulverlösung verdünnt, eingelegt und auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 60 Minuten wurden die Membranen erneut dreimal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Für die Detektion der Proteinbanden wurden die Membranen für jeweils fünf Minuten in SuperSignal West pico Substrat in eine lichtdichte Box eingelegt und auf dem Schüttler platziert. Für die Detektion wurden die Membranen einzeln mittels Kamera belichtet. Mittels der FusionCapt Advance Analyse Software wurden die Fotografien erfasst. Es entstanden Fotografien der Proteinbanden von STAT3 und pSTAT3 im Bereich von 86 Kilodalton (kDa) und der Markerbande, sodass erkannt werden konnte, wie viel Protein bei welcher Konzentration von SC144 in den Zelllysaten vorhanden war. Im Falle von STAT3 handelte es sich um eine einfache Bande und im Falle von pSTAT3 um eine Doppelbande. Die Dichtebestimmung der einzelnen Banden wurde mittels des Programms ImageJ durchgeführt. Die Daten wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet. Die erste Bande aller Blots diente als Negativkontrolle, während die zweite Bande der STAT3-Blots als Referenz diente. Die Referenzbande wurde auf 100% festgelegt. Die Dichtewerte der STAT3- und pSTAT3-Proben wurden mit der STAT3-Kontrollbande ins Verhältnis gesetzt und die Ergebnisse in Prozent angegeben. Die Proben, die weder stimuliert noch behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle.

3.2.5 Orthotopes PDAC-Xenograft-Mausmodell

Es wurden 23 männliche 8 Wochen alte und ca. 26g schwere athymische Nacktmäuse des Stammes Balb/$c^{nu/nu}$ verwendet (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Nach einer Akklimatisierungsphase von 14 Tagen wurden die Mäuse je nach Käfignummer in die Gruppen „Kontrolle“ und „SC144“ eingeteilt. Für die Operation wurden sterile Operationsinstrumente und eine Suspension bestehend aus 10^6 Millionen L3.6pl-Zellen pro 10µl Medium (DMEM mit 10% FSB und 1% Streptomycin/Penicillin) vorbereitet. Die Mäuse wurden gewogen, narkotisiert und analgesiert. Die Narkose bestand aus 0,4ml Xylazin, 1,2ml Ketamin und 8,4ml 0,9% NaCl, wovon 0,3ml intraperitoneal appliziert wurden. Die Analgesie bestand aus 0,1 ml Carprofen und 4,9ml 0,9% NaCl, wovon 0,1ml subkutan in die Nackenfalte appliziert wurden. Danach erfolgte eine Ohrmarkierung und der Augenschutz mittels Bepanthen-Augensalbe.

Für den Versuch wurde das bereits etablierte orthotope PDAC-Mausmodell gewählt (75). Es wurde ein Operationszugang über einen linksseitigen Flankenschnitt geschaffen. Die Milz wurde identifiziert und mittels eines befeuchteten Wattestäbchen vor die Bauchdecke luxiert, so dass das Pankreas exponiert wurde. Die L3.6pl-Suspension wurde direkt in den Pankreasschwanz injiziert. Nach einer Kompression von einer Minute und Feststellung der Bluttrockenheit wurden die Organe zurück in die Bauchhöhle verlagert. Anschließend wurden separat das Peritoneum und die Bauchdecke jeweils fortlaufend mit sterilem Nahtmaterial (5-0 Vicryl, geflochten und resorbierbar) vernäht. Bis zum vollständigen Abklingen der Narkose wurden die Mäuse in neuen Käfigen im Klimaschrank gehalten. Am ersten und zweiten postoperativen Tag wurden die Mäuse auf ihren Allgemeinzustand kontrolliert und bei stabilem Zustand konnte am zweiten postoperativen Tag mit den intraperitonealen Injektionen mit der den Gruppen entsprechenden Substanzen begonnen werden.

Für 28 Tage wurde den Mäusen täglich entweder SC144 oder die Vehikellösung intraperitoneal unter der Abzugshaube injiziert. Für die Kontrollgruppe wurden 12 Mäuse eingeteilt und für die SC144-Gruppe 11 Mäuse. Sie wurden täglich auf Tumorwachstum und Allgemeinbefinden untersucht. Einmal pro Woche wurden die

Mäuse gewogen und in neue Käfige umgesetzt. Nach 28 Tagen Injektionen wurden die Mäuse erneut narkotisiert, analgesiert und median thorakolaparotomiert. Mit einer Spritze wurde das gesamte Blutvolumen aus dem Herzen entnommen und in ein für die jeweilige Maus markiertes Reagiergefäß überführt. Anschließen wurden die Mäuse durch eine zervikale Dislokation entsprechend der Richtlinien getötet. Die Mäuse wurden vollständig autopsiert und nach Primärtumor, Metastasen und sonstigen Auffälligkeiten durchsucht. Die Tumorvolumina wurden nach Tomayko und Reynolds mittels der Formel

$$(Breite \times Tiefe \times Höhe) \div 2 = Volumen$$

berechnet (103). Für die Volumina und Gewichte der jeweiligen Gruppen wurde das arithmetische Mittel bestimmt. Für das Ausmaß der Infiltration von Nachbarorganen und der Metastasierung wurden Punkte vergeben und zu einem Score addiert. Es handelt sich hierbei um einen für dieses Experiment erstellten Score. Für das Ausmaß der lokalen Tumorinfiltration wurden Milz, Magen, Retroperitoneum, Mesenterium, Bauchwand und Pankreas untersucht. Alle weiteren Funde wurden zur Gruppe „Andere“ zugeordnet. Wenn das Organ leicht, also weniger als die Hälfte des Organs, befallen war, wurde ein Punkt vergeben. Wenn das Organ massiv, also mehr als die Hälfte des Organs, befallen war, wurden zwei Punkte vergeben. Für das Scoring der Metastasen wurden Leber, Milz, Lunge, Mesenterium und Lymphknoten, Retroperitoneum und Nahtreihe untersucht. Alle weiteren Funde wurden wieder zur Gruppe „Andere“ zugeordnet. Bei einer Metastase mit einem Durchmesser von unter 1mm wurde ein Punkt vergeben, zwei Punkte bei einem Durchmesser von 1-5mm und drei Punkte bei einer Metastase mit einem Durchmesser von über 5mm. Für jede Gruppe wurde die Summe von Punkten wie folgt ausgerechnet:

$$Summe = (1 \times Anzahl\ der\ Metastasen\ < 1mm) + (2 \times Anzahl\ der\ Metastasen\ 1 - 5mm) + (3 \times Anzahl\ der\ Metastasen\ > 5mm)$$

3.2.6 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mittels Microsoft Excel dokumentiert und verarbeitet und werden, wenn nicht anders spezifiziert, als Mittelwert ± Standardfehler (SEM)

angegeben. Für die Ermittlung der Signifikanz wurde der t-Test verwendet, um p-Werte zu berechnen, wobei das Signifikanzniveau bei $p<0,05$ festgelegt wurde.

Die Tierzahlen pro Gruppe wurden gemäß der biometrischen/statistischen Planung berechnet. Hierfür wurde anhand des Tumorgewichts (mg) mittels t-Test für unabhängige Stichproben eine Fallzahl von 10 Tieren in der Therapiegruppe bzw. 11 Tieren in der Kontrollgruppe gerechnet ($\alpha = 0,025$ zweiseitig; $\beta = 0,20$; Mittelwertdifferenz = 550mg; SD = 400mg ($\delta = 1.375$)). Mit dieser Fallzahl konnten für das Experiment die geplanten Hypothesentestungen unter oben genannten statistischen Vorgaben durchgeführt werden. Die Fallzahlschätzung wurde mit der Software nQuery3.0 + nTerim (Statistical Solutions Ltd.) durchgeführt. Um die statistisch gerechneten Tierzahlen pro Gruppe sicherzustellen, wurde eine Maus pro Gruppe (ca. 10%) als Reservetier zusätzlich gerechnet. Somit beeinflussten mögliche Drop-outs, beispielweise durch zufällige Erkrankung einer Maus oder eine ausnahmeweise postoperative Komplikation, die statistische Relevanz der Ergebnisse nicht.

4. Ergebnisse

4.1 SC144, Paclitaxel und ihre Kombination inhibierten die Proliferation von PDAC-Zellen

Die mögliche Hemmung der Proliferation von L3.6pl-Zellen unter Einfluss von SC144, Paclitaxel oder der Kombination aus beidem wurde mittels Zellproliferationsassays unter der Verwendung von BrdU untersucht. Den Proben wurden die Kontrolllösung, SC144 in unterschiedlichen Konzentrationen, Paclitaxel in unterschiedlichen Konzentrationen und die Kombination aus SC144 und Paclitaxel in den einzeln getesteten Konzentrationen zugefügt und für 48 Stunden inkubiert. Für jede Probe wurde eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Der Versuch wurde zweimal wiederholt (N=2). Die daraus resultierenden Werte der Proliferationsaktivität werden in Abbildung 9 dargestellt.

Im Vergleich zur Kontrolle sank die Proliferationsaktivität signifikant unter der Zugabe von 1µM SC144 um 27,42% (±3,21%; $p<0,001$) und um 95,74% (±0,55%; $p<0,001$) unter der Zugabe von 2µM SC144. Die Zugabe von 0,5µM SC144 führte zu einer Proliferationsaktivität von 96,1% (±6,76%; $p=0,576$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Zugabe von 5nM Paclitaxel reduzierte die Proliferation signifikant um 22,24% (±6,23%; $p<0,01$). Paclitaxel in der Dosierung von 10nM führte zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation, indem sich die Proliferation um 63,21% (±6,91%; $p<0,001$) im Vergleich zur Kontrolle reduzierte. Die Therapie mit 1µM SC144 inhibierte die Proliferation signifikant stärker als die Therapie mit 1nM Paclitaxel ($p<0,001$). Die Zugabe von 2µM SC144 inhibierte die Proliferation signifikant stärker als 1nM, 5nM und 10nM Paclitaxel ($p<0,001$).

Die Kombinationen aus 5nM Paclitaxel und 1µM SC144 führten zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation um 44,82% (±1,58%; $p<0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Zugabe von 2µM SC144 mit 1nM Paclitaxel inhibierte die Proliferation signifikant und erreichte einen Wert von 7,98% (±0,64%; $p<0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombination aus 2µM SC144 mit 5nM Paclitaxel reduzierte die Proliferation signifikant auf einen Wert von 8,93% (±1,47%; $p<0,001$) und die Kombination aus 2µM SC144 mit 10nM Paclitaxel reduzierte die

Proliferation auf einen Wert von 9,04% (±1,48%; $p<0,001$) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Kombinationen aus 1µM SC144 mit 5nM Paclitaxel inhibierte die Proliferation signifikant stärker als die Kombination aus 0,1µM oder 0,5µM SC144 mit 5nM Paclitaxel ($p<0,001$). Die Kombinationen aus 2µM SC144 mit 1nM, 5nM und 10nM führten zu einer signifikant stärkeren Inhibition als 1µM SC144 mit 5nM Paclitaxel ($p<0,001$). Die Zugabe von 2µM SC144 zu Paclitaxel in den Konzentration 1nM ($p<0,001$), 5nM ($p<0,001$) und 10nM ($p<0,001$) führte in allen Fällen zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation. 10nM Paclitaxel inhibierte die Proliferation signifikant stärker als die Kombinationen aus 5nM Paclitaxel mit 0,1µM ($p<0,001$), 0,5µM ($p<0,001$) und 1µM SC144 ($p<0,05$). Die Kombinationen aus 2µM SC144 mit 1nM, 5nM und 10nM hingegen inhibierten die Proliferation signifikant stärker als 10nM Paclitaxel allein ($p<0,001$). Unter 2µM SC144 konnte der stärkste inhibitorische Effekt auf die Proliferation im Vergleich zu den Monotherapien mit Paclitaxel und den Kombinationstherapien beobachtet werden.

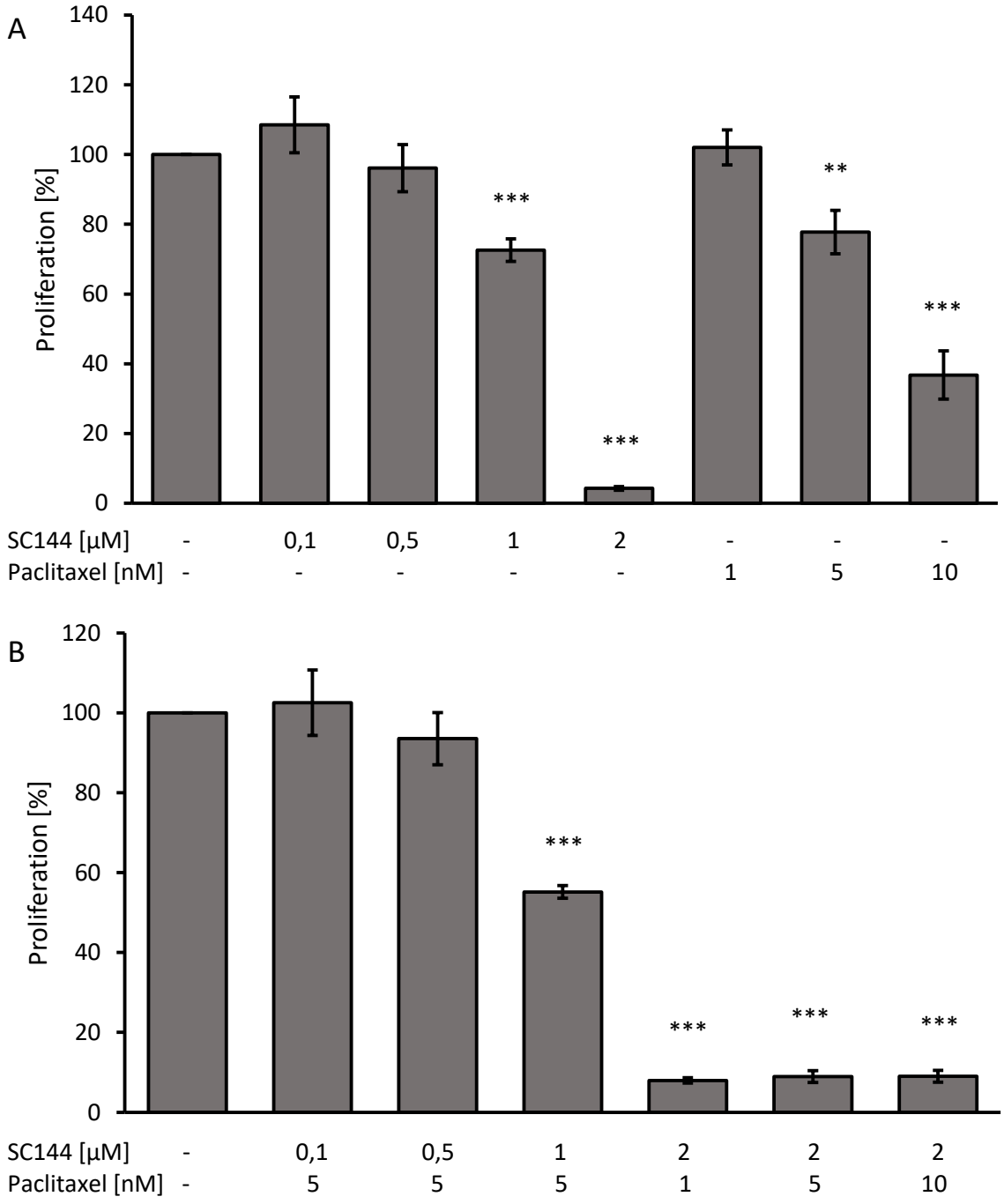

Abbildung 9: SC144 und Paclitaxel hemmen im BrdU-Assay die Proliferation von L3.6pl-Zellen allein und in Kombination

A) Angegeben werden die Mittelwerte in Prozent nach Zugabe der Kontrolllösung, Paclitaxel und SC144 in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Messung erfolgte nach 48 Stunden. Signifikante Effekte waren unter SC144 in den Konzentrationen 1µM (***p<0,001) und 2µM (***p<0,001) und unter Paclitaxel in den Konzentrationen 5nM (**p<0,01) und 10nM (***p<0,001) zu beobachten.
B) Angegeben werden die Mittelwerte in Prozent nach Zugabe der Kontrolllösung und die Kombinationen aus SC144 und Paclitaxel in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Messung erfolgte nach 48 Stunden. Bei 5nM Paclitaxel mit 1µM SC144 (***p<0,001) und bei den Kombinationen von 2µM SC144 mit 1nM, 5nM und 10nM Paclitaxel (***p<0,001) konnten signifikante Ergebnisse beobachtet werden.

4.2 SC144, Paclitaxel und ihre Kombination inhibierten die Viabilität von PDAC-Zellen

Um herauszufinden, wie SC144, Paclitaxel und die Kombination aus beidem die metabolische Aktivität von L3.6pl-Zellen beeinflussen, wurden MTT-Assays durchgeführt. Dafür wurden die Proben entweder mit der Kontrolllösung, SC144 oder Paclitaxel in unterschiedlichen Konzentrationen oder der Kombination beider in verschiedenen Konzentrationen zugefügt. Die Messung erfolgte nach 48 Stunden. Für jede Probe wurde eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Der Versuch wurde zweimal wiederholt (N=2). In Abbildung 10 werden die Ergebnisse abgebildet.

Die Einzeltherapien mit 1µM und 2µM SC144 führten zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsaktivität. Unter 1µM SC144 reduzierte sich die Proliferation auf 64,54% (±4,71%; $p<0,001$) und unter 2µm SC144 auf 26,80% (±3,54%; $p<0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Signifikante Inhibitionen der Proliferation waren ebenso bei 10nM Paclitaxel zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle hatte die Proliferation einen Anteil von 40,60% (±4,82%; $p<0,001$). Die Zugabe von 2µM SC144 inhibierte die Proliferation signifikant stärker als 1nM ($p<0,001$), 5nM ($p<0,001$) und 10nM Paclitaxel ($p<0,05$).

Im Vergleich zur Kontrolle inhibierten die Kombination aus 5nM Paclitaxel und 1µM SC144 und die Kombinationen aus 2µM SC144 mit 1nM, 5nM und 10nM Paclitaxel die Proliferation signifikant. Unter der Zugabe von 5nM Paclitaxel mit 1µM SC144 konnte die Proliferation um 25,71% (±4,33%; $p<0,001$) reduziert werden. Die Kombination aus 2µM SC144 mit 1nM Paclitaxel reduzierte die Proliferationsaktivität um 74,93% (±3,70%; $p<0,001$), 2µM SC144 mit 5nM Paclitaxel um 72,86% (±3,91%; $p<0,001$) und 2µM SC144 mit 10nM Paclitaxel um 78,88% (±3,00%; $p<0,001$). Die Einzeltherapien mit 0,1µM, 0,5µM und 1µM SC144 hatten keine signifikant stärkeren inhibitorischen Effekte als die Kombination derer mit 5nM Paclitaxel ($p>0,05$). Die Kombinationen aus 2µM SC144 mit 1nM, 5nM und 10nM Paclitaxel waren signifikant wirksamer als die Einzeltherapien mit 1nM ($p<0,001$), 5nM ($p<0,001$) und 10nM Paclitaxel ($p<0,01$).

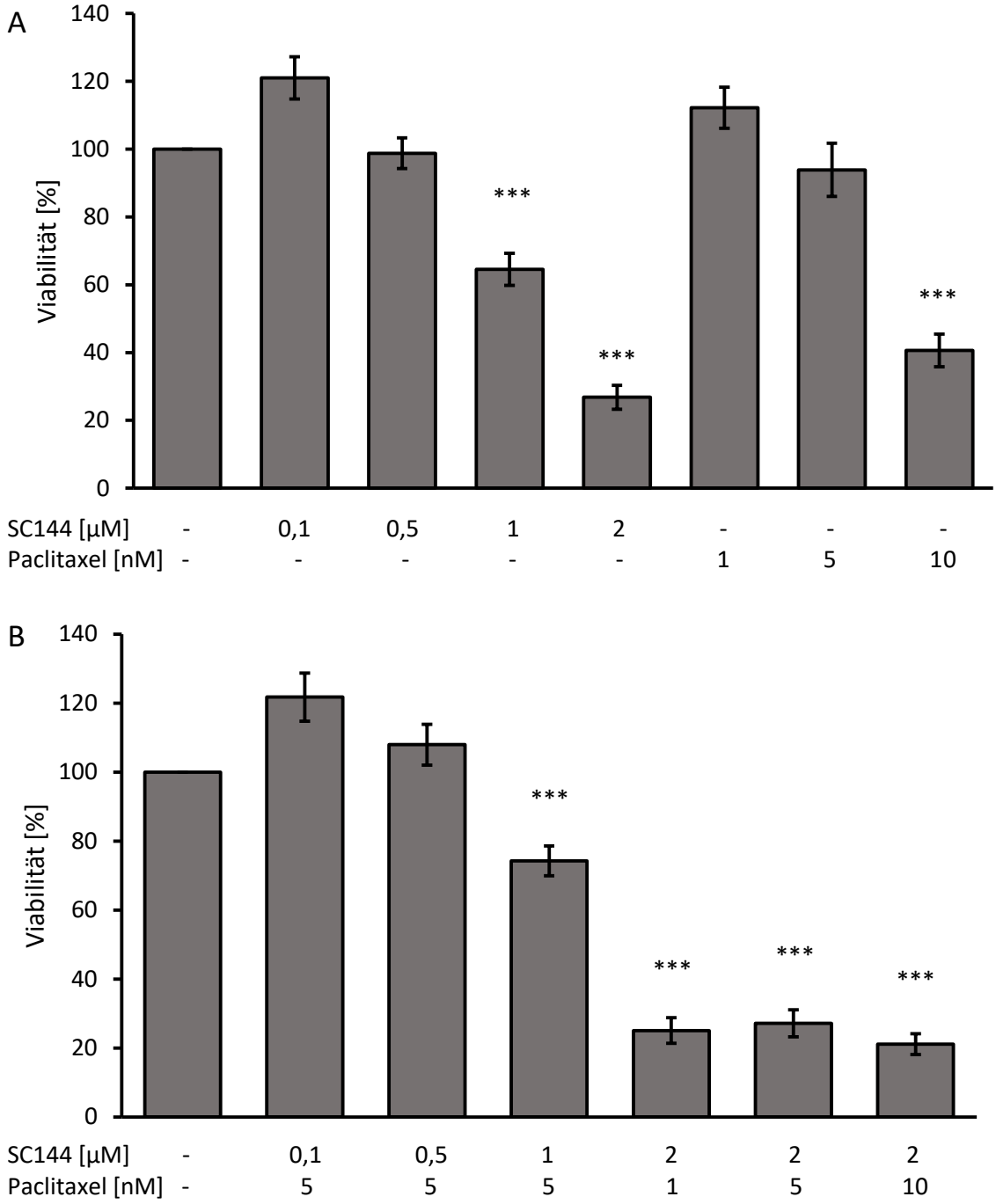

Abbildung 10: SC144 und Paclitaxel hemmen die Zellviabilität im MTT-Assay von L3.6pl-Zellen allein und in Kombination

A) Angegeben werden die Mittelwerte in Prozent nach Zugabe der Kontrolllösung und unterschiedlichen Konzentrationen von Paclitaxel und SC144. Die Messung erfolgte nach 48 Stunden. Signifikante Ergebnisse konnten bei 1µM (***p<0,001) und 2µM (***p<0,001) SC144 und 10nM Paclitaxel (***p<0,001) beobachtet werden.
B) Angegeben werden die Mittelwerte in Prozent nach Zugabe der Kontrolllösung und den Kombinationen aus unterschiedlichen Konzentrationen von SC144 und Paclitaxel. Die Messung erfolgte nach 48 Stunden. Signifikante Inhibitionen der Signale konnten bei 5nM Paclitaxel mit 1µM SC144 (***p<0,001) und 2µM SC144 mit 1nM (***p<0,001), 5nM (***p<0,001) und 10nM Paclitaxel (***p<0,001) beobachtet werden.

4.3 SC144 inhibierte die von IL-6 und OSM stimulierte Phosphorylierung von STAT3 in PDAC-Zellen zeit- und dosisabhängig

Um den Einfluss von IL-6 und OSM auf Proteinebene zu untersuchen wurden Immunoblotanalysen in Form von Western Blots durchgeführt. Mittels anschließender Densitometrie der detektierten Signale sollte das Ausmaß der Phosphorylierung von STAT3 unter Stimulation mittels IL-6 oder OSM und unter Behandlung mit SC144 dargestellt werden. Dafür wurden L3.6pl-Zellen für 120 Minuten entweder nicht oder mit 1, 2, 3 oder 5µM SC144 behandelt und anschließend mit 100ng/ml IL-6 oder mit 50ng/ml OSM stimuliert. Die Inkubationszeiten betrugen drei, 6 und 24 Stunden. Repräsentative Fotografien der Western Blots werden in Abbildung 13 dargestellt.

4.3.1 Stimulation der Zellen mit IL-6 und Behandlung mit SC144

In allen Proben konnte ein konstantes STAT3-Signal detektiert werden. Bei Abwesenheit von IL-6 konnten keine wesentlichen pSTAT3-Signale detektiert werden. Die pSTAT3-Signale in den mit IL-6 stimulierten Proben waren zu allen Inkubationszeiten signifikant stärker als die der unstimulierten Kontrolle ($p<0,05$). Die Ergebnisse bei der Stimulation mit IL-6 und einer Inkubationszeit von drei Stunden zeigten verstärkte pSTAT3-Signale. Bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden traten unter der Behandlung mit 3µl SC144 leichte Signalreduktionen auf 65,39% (±18,05%; p=0,098) und signifikante Signalreduktionen bei einer Behandlung mit 5µM SC144 auf 61,19% (±4,93%; p=0,008) im Vergleich zum Signal der mit IL-6 stimulierten und unbehandelten Probe auf. Nach 24 Stunden Inkubation erreichte die Dichte der Probe, die mit 3µM SC144 behandelt wurde, einen Wert, der 61,68% (±5,94%; p=0,011) des Kontrollsignals entsprach und damit signifikant geringer war als der der Kontrolle. Bei einer Behandlung mit 5µM SC144 reduzierte sich das pSTAT3-Signal signifikant auf 53,16% (±13,59%; p=0,037). Die Ergebnisse werden in Abbildung 11 veranschaulicht.

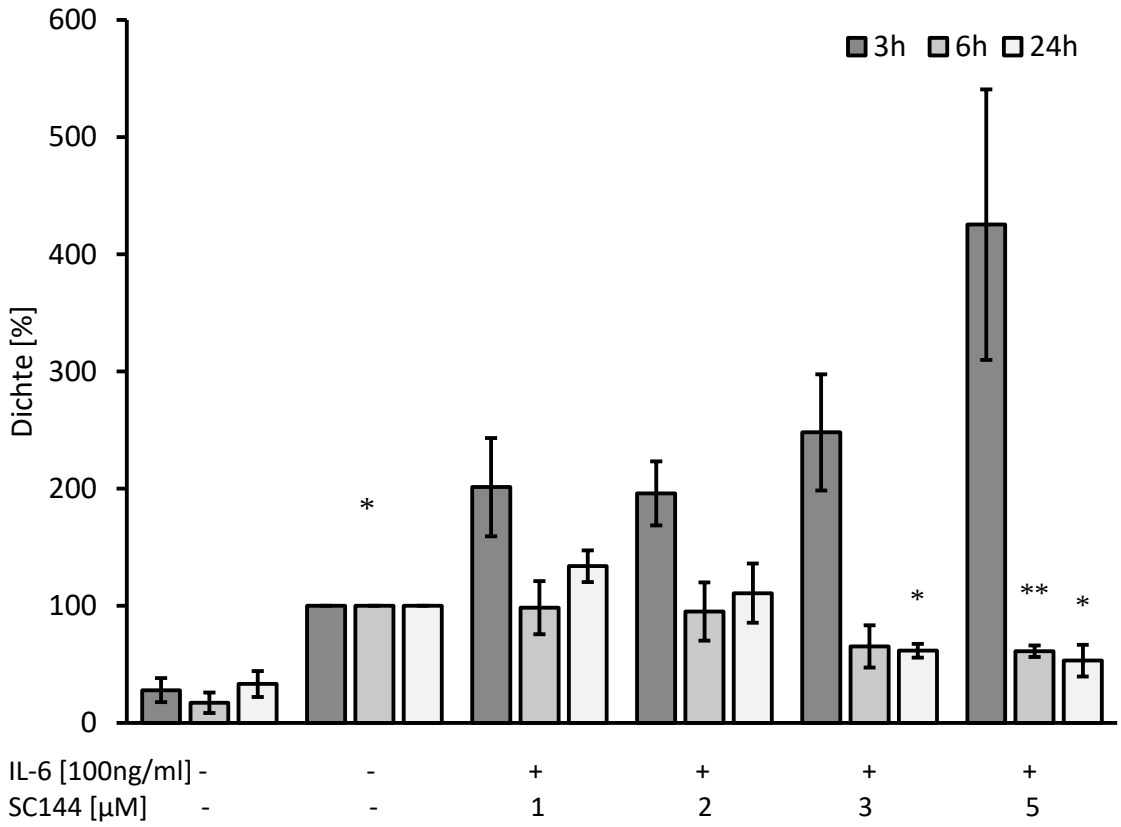

Abbildung 11: IL-6 stimuliert und SC144 hemmt die Phosphorylierung von STAT3 in L3.6pl-Zellen

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte in Prozent mit SEM angegeben. Ohne IL-6 konnte keine Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden. Bei der Stimulation mit IL-6 konnte nach allen Inkubationszeiten ein signifikanter Signalanstieg bei pSTAT3 detektiert werden (*p<0,05). Nach 6 Stunden konnte unter der Behandlung mit 5µM SC144 (**p<0,01; N=3) und nach 24 Stunden unter der Behandlung mit 3µM (*p<0,05; N=3) und 5µM SC144 (*p<0,05; N=3) eine signifikante Reduktion des pSTAT3-Signals detektiert werden.

4.3.2 Stimulation der Zellen mit OSM und Behandlung mit SC144

In allen Proben wurde ein gleichmäßiges STAT3-Signal detektiert. Auch hier kam es in Abwesenheit von OSM und SC144 zu keiner Detektion eines pSTAT3-Signals, nach Stimulation mittels OSM kam es zu einer signifikanten Phosphorylierung von STAT3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (p<0,001). Bei der Stimulation mit OSM war bei einer Inkubationszeit von drei Stunden bei einer Konzentration von 2µM SC144 eine signifikant verringerte Dichte der pSTAT3-Doppelbanden bei 86kDa im Vergleich zur mit OSM stimulierten und unbehandelten Probe zu erkennen. Das pSTAT3-Signal erreichte einen Anteil von 77,43% (±5,92%; p=0,031) im Vergleich zur Kontrolle. Das pSTAT3-Signal erreichte nach 6 Stunden

Inkubationszeit bei 3µM SC144 einen Anteil von 51,6% (±3,91%; p=0,001) im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Konzentration von 5µM SC144 sank das Signal auf einen Anteil von 42,54% (±5,73%; p=0,001). Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden fand sich keine signifikante Verringerung der pSTAT3-Signale. Bei einer Konzentration von 3µM SC144 reduzierte sich das Signal um 25,93% (±15,75%; p=0,08), es handelte sich dabei um kein signifikantes Ergebnis. Die Ergebnisse werden in Abbildung 12 dargestellt.

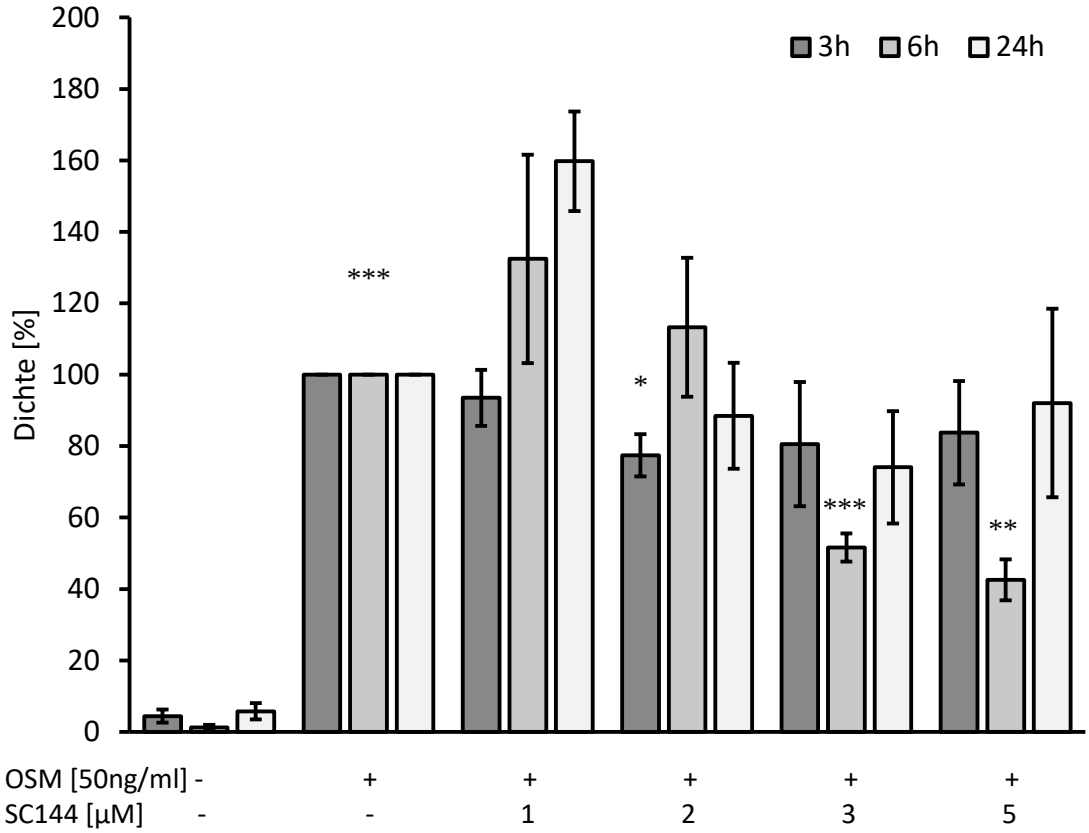

Abbildung 12: OSM stimuliert und SC144 hemmt die Phosphorylierung von STAT3 in L3.6pl-Zellen

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte in Prozent mit SEM angegeben. Ohne OSM konnte keine Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden. Bei der Stimulation mit OSM konnte nach allen Inkubationszeiten ein signifikanter Signalanstieg bei pSTAT3 detektiert werden (***p<0,001). Nach 3 Stunden führten 2µM SC144 zu einer signifikanten Reduktion des pSTAT3-Signals (*p<0,05; N=3). Nach 6 Stunden konnte bei den Konzentrationen von 3µM (***p<0,001; N=4) und 5µM SC144 (**p<0,01; N=4) eine signifikante Reduktion des pSTAT3-Signals detektiert werden. Nach 24 Stunden reduzierte sich das pSTAT3-Signal unter 3µM SC144 tendenziell (p=0,08; N=6).

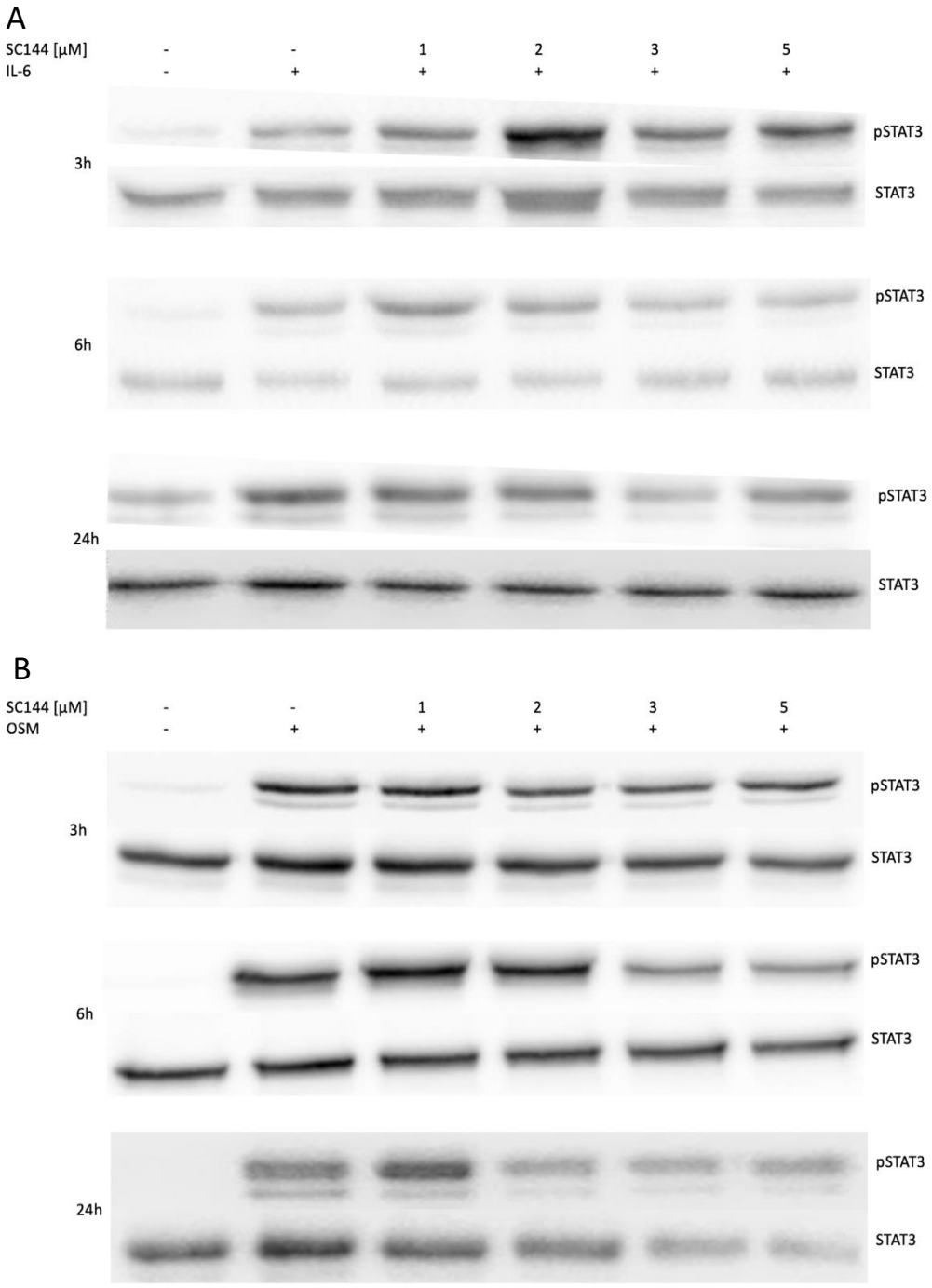

Abbildung 13: Repräsentative Western Blots der L3.6pl-Zellen

In Abwesenheit von IL-6 (A) und OSM (B) kam es bei keiner der Inkubationszeiten zu einer wesentlichen Phosphorylierung von STAT3, während das STAT3-Signal unverändert blieb. In Anwesenheit von IL-6 (A) und OSM (B) kam es zur Detektion von pSTAT3-Signalen. Die von IL-6 stimulierte Phosphorylierung wurde nach 6 und 24 Stunden Inkubationszeit durch SC144 dosisabhängig inhibiert (A). Die von OSM stimulierte Phosphorylierung wurde durch SC144 nach drei und 6 Stunden Inkubationszeit dosisabhängig inhibiert (B).

4.4 SC144 inhibierte das L3.6pl-induzierte Tumorwachstum *in vivo*

Das orthotope PDAC-Modell an der männlichen immunsupprimierten Nacktmaus wurde gewählt um den Effekt von SC144 auf das durch L3.6pl-induzierte Tumorwachstum zu untersuchen. Das mittlere initiale Gewicht der Mäuse (N=23) betrug 25,77g (±0,36g). Alle Mäuse überlebten die Operation und entwickelten im Verlauf Primärtumore des Pankreas. Zwei Mäuse aus der SC144-Gruppe mussten vorzeitig getötet werden und wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Tabelle 1 bietet eine Übersicht der Ergebnisse des PDAC-Mausmodelles.

Am Tag der Sektion betrug das mittlere Tumorgewicht bei der Kontrollgruppe 1037,5mg (±215,68mg; N=12) und bei der mit SC144 behandelten Gruppe 536,67mg (±75,96mg; N=9). Der Unterschied erreichte statistische Signifikanz (p=0,023) (Abbildung 14A). Das mittlere Volumen der Therapiegruppe waren mit 569,22µl (±87,92µl) geringer als das der Kontrollgruppe, deren mittleres Volumen 1232,75µl (±383,64µl) betrug. Jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (p=0,059). In Abbildung 14B werden die mittleren Tumorvolumina gegenübergestellt.

Die Berechnung des Metastasierungscores der Kontrollgruppe ergab eine Summe von 99 Punkten und die Summe des Infiltrationsscores ergab 24 Punkte. Für die Kontrollgruppe errechnete sich ein mittlerer Infiltrationsscore von zwei Punkten (±0,66 Punkte) und ein mittlerer Metastasierungsscore von 8 Punkten (±3,46 Punkte). Die Summe des Metastasierungsscores der SC144-Gruppe ergab 19 Punkte und die Summe des Infiltrationsscores 8 Punkte. Daraus ergab sich ein mittlerer Infiltrationsscore eines Punktes (±0,20 Punkte) und ein mittlerer Metastasierungsscore von zwei Punkten (±0,89 Punkte) für die Therapiegruppe. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren weder in der Kategorie „Infiltration“ (p=0,066) noch in der Kategorie „Metastasen“ signifikant (p=0,055), jedoch mit einer Tendenz zu einer geringer ausgeprägten Infiltration und Metastasierung in der SC144-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15A). Aus der Kontrollgruppe entwickelten 91,70% (±0,08%) der Mäuse Aszites, in der SC144-Gruppe waren es mit 55,60% (±0,18%) weniger Mäuse (Abbildung 15B).

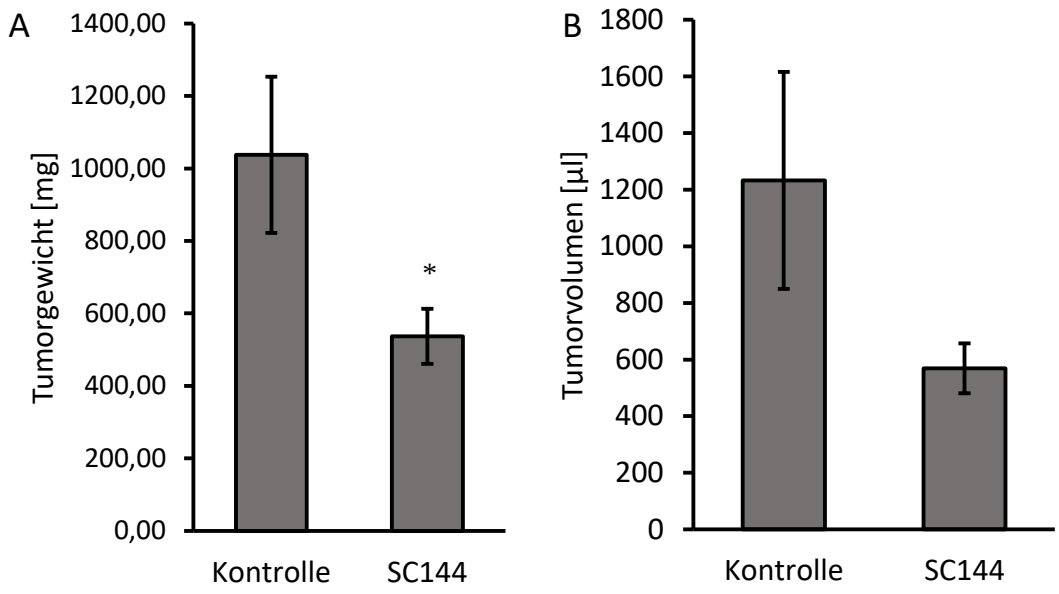

Abbildung 14: Mittleres Tumorgewicht und Tumorvolumen

A) Gewichte in Milligramm [mg] der Kontrollgruppe und der SC144-Gruppe nach 28 Tagen Therapie. Bei der mit SC144 behandelten Gruppe konnte ein signifikant geringeres Tumorgewicht gemessen werden (*p<0,05).
B) Volumina in Mikroliter [µl] der Kontrollgruppe und der SC144-Gruppe. Die Tumorvolumina der mit SC144 behandelten Gruppe waren zwar tendenziell geringer, das Ergebnis war nicht signifikant (p=0,059).

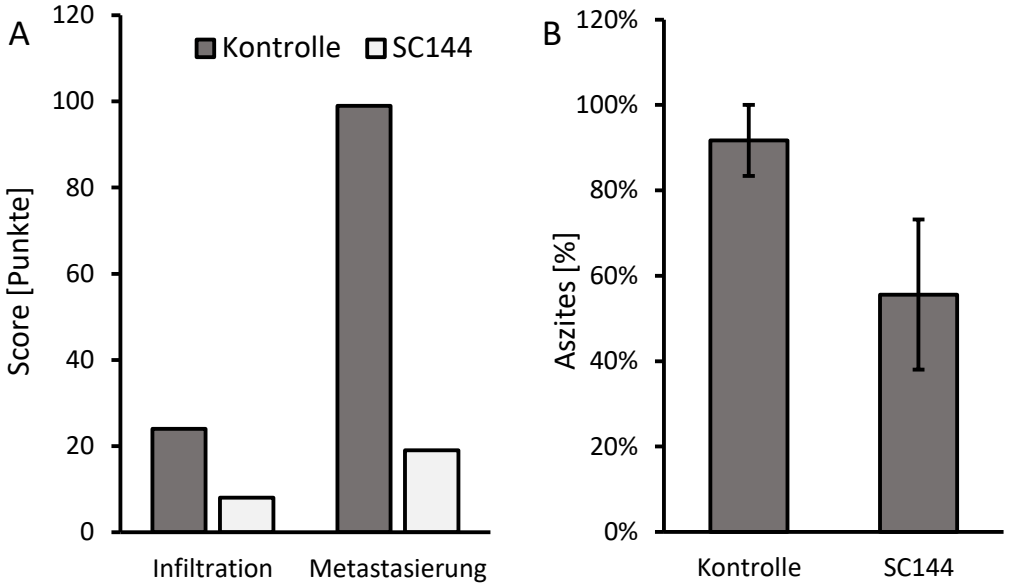

Abbildung 15: Tumorinfiltration, Metastasierung und Aszites 28 Tage nach orthotoper Tumorzellinjektion

A) Für die SC144-Gruppe errechnete sich ein Metastasierungsscore von 19 Punkten und ein Infiltrationsscore von 8 Punkten. Für die Kontrollgruppe errechnete sich ein Metastasierungsscore von 99 Punkten und ein Infiltrationsscore von 24 Punkten. Es waren tendenziell geringere Metastasierung (p=0,055) und Infiltration (p=0,066) unter SC144-Therapie zu beobachten, jedoch ohne Signifikanz.
B) Bis zum Zeitpunkt der Sektion hatten 91,7% (±0,08%) der Mäuse der Kontrollgruppe Aszites entwickelt. In der Gruppe der mit SC144 behandelten Mäuse entwickelten 55,6% (±0,18%) der Mäuse Aszites.

	Tumor-gewicht [mg]	Tumor-volumen [µl]	Metasta-sierungs-score [Punkte]	Infiltra-tionsscore [Punkte]	Aszites [%]
Kontrolle	1037,5 ±215,68	1232,75 ±383,64	8 ±3,46	2 ±0,66	91,7 ±0,08
SC144	536,67 ±75,96	569,22 ±87,92	2 ±0,89	1 ±0,2	55,6 ±0,18
p-Wert	***0,023**	0,059	0,055	0,066	

Tabelle 1: Lokales und metastatisches Tumorwachstum 28 Tage nach Injektion von Tumorzellen

Es kam zu einer signifikanten Reduktion des Tumorgewichtes in der SC144-Gruppe (N=9) im Vergleich zur Kontrollgruppe (N=12) (*p<0,05).

5. Diskussion

Um zu untersuchen, wie sich die Zellen unter der Behandlung von SC144 verhalten, wurden für diese Arbeit *in vitro*-Verfahren genutzt, die die Aktivität von Prozessen der Tumorentstehung in Zellen messen können. SC144 konnte die Proliferation und die metabolische Aktivität in der humanen PDAC-Zellen L3.6pl effektiv einschränken. Außerdem konnte herausgefunden werden, dass SC144 in Kombination mit dem gängigen Chemotherapeutikum Paclitaxel vorteilhaft gegenüber der Monotherapie mit Paclitaxel bei der Senkung der Aktivität der Tumorentstehungsprozesse sein könnte. Durch die niedrigen Erfolgschancen der Chemotherapie bei Patient:innen mit PDAC ist es wünschenswert Therapeutika zu finden, die die Chemotherapie unterstützen können, um das Gesamtüberleben zu verlängern. Zusätzlich wurden Western Blots durchgeführt mit den Resultaten, dass die Zytokine IL-6 und OSM den gp130/JAK/STAT3-Signalweg in L3.6pl-Zellen induzieren und zu einer Phosphorylierung von STAT3 führen, welche von SC144 zeit- und dosisabhängig inhibiert werden konnte. Als Targetprotein wurde pSTAT3 gewählt, da es ein wesentlicher Schalter des gp130-Signalweges im Rahmen der Tumorentstehung ist. Das orthotope PDAC-Mausmodell half dabei, die *in vitro* erzielten Ergebnisse *in vivo* zu rekonstruieren mit dem Ergebnis, dass die Therapie mit SC144 eine signifikante Reduktion des Tumorgewichts zur Folge hatte.

5.1 SC144 inhibierte die Proliferationsaktivität und Zellviabilität in L3.6pl-Zellen und verstärkte die Wirkung von Paclitaxel

Die vorliegenden Ergebnisse der MTT- und BrdU-Assays zeigen, dass SC144 sowohl die metabolische Aktivität als auch die Proliferationsaktivität von L3.6pl-Zellen dosisabhängig inhibiert. Ebenso konnte Paclitaxel in hohen Dosierungen die Viabilität und Proliferation inhibieren. In Kombination mit SC144 traten diese Effekte bereits bei geringeren Paclitaxelkonzentrationen auf. Die eigenen Daten decken sich mit den Ergebnissen von Chen et al., die zeigen konnten, dass IL-6 Proliferation und Überleben von PDAC-Zelllinien vermittelt und diese Effekte durch SC144 inhibiert werden (33).

Oshima et al. haben die Kombinationseffekte von SC144 und Paclitaxel mit der Chou-Talalay-Methode untersucht (96). Diese Methode erlaubt die Effekte von zwei oder mehreren Substanzen in additiv, synergistisch und antagonisierend zu unterteilen (104). Die Autor:innen zeigten in Mammakarzinomzellen einen synergistischen Effekt von SC144 und Paclitaxel und beschrieben die Verzögerung einer Resistenzbildung durch SC144 (96). In Erweiterung dieser Daten haben Plasencia et al. gezeigt, dass SC144 die Viabilität von Zelllinien verschiedener solider Tumorentitäten inhibierte, obwohl diese Zellen chemotherapieresistent waren (95). Ähnliche Daten zeigten Xu et al. für chemotherapieresistente Ovarialkarzinome (42). Die eigenen Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass SC144 in Kombination mit zytotoxischer Chemotherapie synergistisch wirkt, indem sich zeigte, dass Paclitaxel allein erst in hohen Dosierungen zu einer signifikanten Inhibition der Zellviabilität und Proliferation führte, jedoch in Kombination mit SC144 bereits in geringerer Dosierung die Zellviabilität als auch die -proliferation signifikant hemmte. Dies ist insofern für die Systemtherapie des PDAC besonders interessant, da die Therapie mit Paclitaxel zwar inhibierend auf die Tumorprogression wirkt, aber zu einer Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen führt, die ihrerseits zum einen eine Kachexie vermitteln, zum anderen aber auch die Tumorprogression selbst fördern (30, 31, 105). Die additive Gabe von SC144 könnte den Effekt haben, dass es unter der Paclitaxeltherapie nicht zu einer starken Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 kommt, so dass dieser unerwünschte Effekt von Paclitaxel eliminiert wird und gleichzeitig die stimulierenden Effekte von IL-6 auf das Tumorwachstum antagonisiert werden (Abbildung 16). Zu dem wirkt SC144 zusätzlich zytotoxisch, indem es Apoptose induziert und Angiogenese inhibiert (42). Darüber hinaus ist SC144 auch deshalb ein interessanter Kombinationspartner von Paclitaxel, da gezeigt werden konnte, dass SC144 auch in resistenten Tumorzellen wirkt und eine Resistenzbildung herauszögern könnte (95, 96). Da die Resistenzbildung im PDAC eine große Rolle spielt, ist es von Bedeutung, dem entgegenzusteuern. In Erweiterung der hier gezeigten Experimente wäre es deshalb attraktiv, um als „proof of principle“ der eigenen *in vitro*-Daten die Kombination aus Paclitaxel und SC144 *in vivo* zu untersuchen.

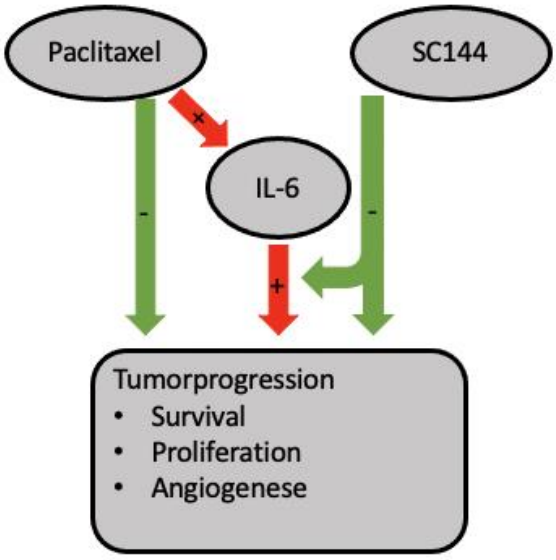

Abbildung 16: Paclitaxel und SC144 beeinflussen die Tumorprogression über IL-6

Paclitaxel inhibiert einerseits die Tumorprogression und eignet sich daher zur Systemtherapie des PDAC, andererseits führt es auch zu einer vermehrten Sekretion von IL-6, welches wiederum Karzinogenese und Tumorprogression stimuliert. SC144 inhibiert die Tumorprogression, indem es den Signalweg von IL-6 blockiert. Damit könnte es die IL-6 vermittelten Effekte von Paclitaxel antagonisieren.

5.2 SC144 inhibierte die von OSM und IL-6 stimulierte Phosphorylierung von STAT3 in L3.6pl-Zellen

Die Relevanz der beiden Zytokine OSM und IL-6 der IL-6-Familie wird aus der aktuellen Datenlage zur Karzinogenese vieler Tumore ersichtlich. Vielen Tumoren wird eine erhöhte Serumkonzentration dieser Zytokine zugesprochen, was konsekutiv zu einer gesteigerten Aktivität des gp130/JAK/STAT3-Signalwegs führt (12, 39, 54). OSM und IL-6 und die darauffolgende Kaskade sind mit Inflammation, Angiogenese, Zellplastizität und Invasivität assoziiert und die hochregulierte Aktivität von pSTAT3 wird mit einer erhöhten Resistenz gegen Chemotherapeutika und einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (12, 44, 46). Hypothesen dieser Arbeit sind, dass es ohne Stimulation mittels IL-6 nicht zu einer Phosphorylierung von STAT3 in L3.6pl-Zellen kommt und dass es unter IL-6 zu einer signifikant hochregulierten STAT3-Phosphorylierung kommt. Außerdem kann diese Phosphorylierung mittels SC144 inhibiert werden kann. Daran anknüpfend

reguliert auch OSM die Phosphorylierung von STAT3 hoch, was wiederum durch SC144 inhibiert werden kann.

Die Ergebnisse der Western Blots bestätigten, dass unphosphoryliertes STAT3 in L3.6pl-Zellen konstant exprimierten wurde und von der Stimulation mit IL-6 oder OSM unbeeinflusst blieb. Die Stimulation mittels IL-6 und OSM ergab hingegen eine deutlich hochregulierte Phosphorylierung von STAT3. Für die Aktivierung von STAT3 bedarf es demzufolge erst eine Stimulation durch diese Zytokine. Die signifikante Steigerung der STAT3-Phosphorylierung zeigt einerseits, dass der gp130/JAK/STAT3-Signalweg in L3.6pl-Zellen aktiv ist und andererseits, dass OSM und IL-6 diese Kaskade in L3.6pl-Zellen induzieren.

SC144 führt durch seine Bindung an gp130 zu dessen Funktionsverlust und damit zur Inhibition der nachgeschalteten Kaskade (42). IL-6 und OSM hingegen aktivieren diese Kaskade. Durch die verminderte Detektion von pSTAT3 in L3.6pl-Zellen nach Stimulation mit IL-6 und OSM und Zugabe von SC144 konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 17). Chen et al. zeigten, dass IL-6 die Phosphorylierung von STAT3 auch in den pankreatischen Tumorzelllinien Capan-1 und HPAC-Zellen signifikant aktiviert (33). Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine dosisabhängige Inhibition durch SC144. Eine signifikant reduzierte Phosphorylierung von STAT3 konnte bei Konzentrationen von 3µM und 5µM SC144 beobachtet werden. Xu et al. berichteten ebenfalls von einer dosisabhängigen Reduktion der STAT3-Phosphorylierung durch SC144 in Ovarialkarzinomzellen (42). Die Autor:innen berichten, dass bei einer Stimulation mit 50ng/ml IL-6 höhere Dosierungen von SC144 zu einer Reduktion der Phosphorylierung führten und bei der Stimulation mit 3ng/ml IL-6 geringere Dosierungen ausreichten (42). Außerdem führte erst eine höhere Dosierung von SC144 zur Internalisierung von gp130 und eine geringere Dosierung bewirkte nur die Deglykolysierung von gp130 (42). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass zum einen die Konzentration von IL-6 eine Rolle für die Wirksamkeit von SC144 spielt und, dass es eventuell höhere Dosierungen von SC144 bedarf, um sein Potential völlig auszuschöpfen. In dieser Arbeit wurden höhere Konzentrationen von IL-6 zur Stimulation der L3.6pl-Zellen verwendet als in anderen Arbeiten, was erklären könnte, warum Effekte von SC144 erst in höheren Dosierungen beobachtet werden

konnten. Dass die SC144-bedingte Inhibition von pSTAT3 nach IL-6-Stimulation zeitabhängig war, wurde auch in Ovarialkarzinomzelllinien beobachtet (42). In L3.6pl-Zellen konnten nach 6 und 24 Stunden signifikante Effekte durch SC144 beobachtet werden. Während bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden höhere SC144-Konzentrationen benötigt wurden, um ein signifikantes Ergebnis zu erzielen, zeigte SC144 nach 24 Stunden bereits signifikante Effekte bei einer geringeren Dosierung. Diese Ergebnisse suggerieren, dass SC144 ein Zeitoptimum hat und gegebenenfalls in seiner Wirkungsweise mehr Zeit braucht als die Phosphorylierung durch IL-6 und OSM. In dieser Arbeit wurden die Zellen vor der Stimulation mit IL-6 und OSM 120 Minuten mit SC144 vorbehandelt. Möglicherweise hat diese Zeit nicht ausgereicht, damit SC144 seine volle Wirkung entfalten konnte.

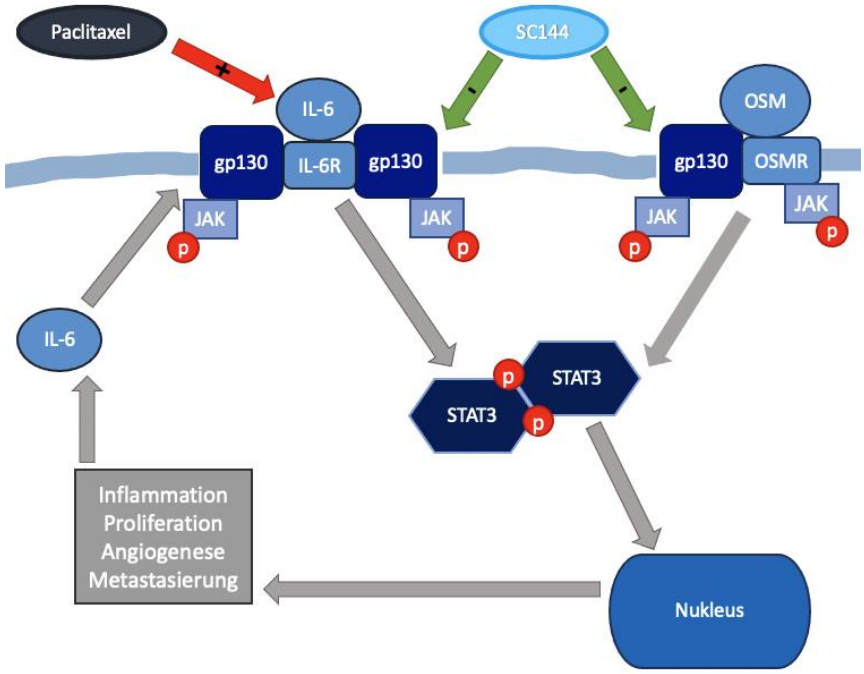

Abbildung 17: Der Signaltransduktionsweg von IL-6 und OSM und der Einfluss von SC144 und Paclitaxel

IL-6 und OSM binden an die jeweiligen Rezeptoren und bilden einen Komplex mit dem membranständigen gp130. Daraufhin werden JAK und anschließend STAT3 phosphoryliert. pSTAT3 steuert im Nukleus die Genexpression mit der Hochregulation von Inflammation, Proliferation, Angiogenese, Metastasierung und Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 als Resultat. Paclitaxel führt neben seinen zytotoxischen Eigenschaften auch zur vermehrten Sekretion von IL-6 und es entsteht ein Teufelskreis. SC144 kann den durch IL-6 und OSM ausgelösten Kaskaden entgegenwirken. Darüber hinaus inhibiert SC144 selbst Angiogenese und Proliferation.

Dass die Signalwege anderer Zytokine als IL-6 durch SC144 inhibiert werden können, konnte anhand von LIF in Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden (42).

OVCAR-8-Zellen wurden mit SC144 vorbehandelt und mit LIF und IL-6 stimuliert (42). In Zellen ohne SC144-Behandlung war ein deutliches pSTAT3-Signal zu detektieren und mit aufsteigender SC144-Konzentration war ein zunehmend abgeschwächtes pSTAT3-Signal zu detektieren (42). LIF in Verbindung mit PDAC wird bisher in der Literatur nicht beschrieben. OSM hingegen ist in Bezug auf PDAC relevant, da bei PDAC-Patient:innen erhöhte Serumkonzentrationen des Zytokins gemessen werden konnten und es im Rahmen der Tumorgenese beim PDAC eine bestärkende Rolle zugesprochen wird (12, 52). Über Effekte von SC144 auf die OSM-stimulierte Phosphorylierung von STAT3 in PDAC-Zellen gibt es bisher noch keine Daten. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass L3.6pl-Zellen nach der Stimulation mittels OSM eine signifikante Hochregulation von pSTAT3 vorwiesen, äquivalent zu den Ergebnissen der Stimulation mittels IL-6. Diese vermehrte Phosphorylierung von STAT3 war durch Zugabe von SC144 reversibel. Ähnlich wie bei den Versuchen mit IL-6 war auch die Wirkung von SC144 auf OSM-stimulierte L3.6pl-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig. Hier erreichte die Wirkung von SC144 nach einer Inkubationszeit von drei und 6 Stunden Signifikanz. Nach 24 Stunden konnte der Effekt nicht mehr beobachtet werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der Stimulation mit IL-6 und OSM könnten möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die beiden Zytokine kein identisches Wirkprofil haben. OSM variiert in seiner Wirkungsweise auf den gp130/JAK/STAT3-Signalweg von der Wirkungsweise von IL-6, indem es sowohl mit OSMR als auch mit LIFR interagieren kann (35, 39). Des Weiteren könnte es sein, dass IL-6 und OSM unterschiedliche Wirkungszeiträume haben und unterschiedlich schnell abgebaut werden, sodass OSM in diesem Falle eine längere Wirkungsdauer haben könnte. Inwiefern dies eine Rolle spielen könnte hinsichtlich der unterschiedlichen Ergebnisse von SC144 und welche Faktoren dies noch beeinflussen könnten, müsste weiter untersucht werden.

Die Analyse der Signalwege zeigte zusammenfassend, dass nicht nur IL-6, sondern auch OSM die Phosphorylierung von STAT3 in L3.6pl-Zellen induzierte. Außerdem konnte SC144 sowohl die durch IL-6 induzierte als auch die durch OSM induzierte STAT3-Phosphoryierung in den PDAC-Zellen L3.6pl unterdrücken. Das rechtfertigt die Annahme, dass SC144 nicht nur selektiv den IL-6-Signalweg inhibiert, sondern auch auf andere Zytokine der IL-6-Familie inhibitorisch wirkt. Möglicherweise

könnten diese Ergebnisse auch auf weitere Zytokine übertragen werden. Diese Überlegung ist attraktiv, wenn man bedenkt, dass eine Inhibition von IL-6, zum Beispiel durch monoklonaler Antikörper, durch andere ähnliche Zytokine kompensiert werden könnte, so dass SC144 in der Summe effektiver sein könnte (87). Nebenerkenntnisse sind, dass die Inhibition der Phosphorylierung durch SC144 zeit- und konzentrationsabhängig war, wobei sich die Zeit- und Konzentrationsoptima bei der Stimulation mit IL-6 und OSM unterschieden, was derzeit noch nicht ausreichend untersucht ist.

Im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz von SC144 müssten weitere Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten erfolgen, um die optimale Dosierung zu ermitteln. Außerdem wäre es interessant herauszufinden, wie sich SC144 auf die Expression anderer onkogener Faktoren auswirkt. Immunoblotanalysen mit anderen Targetproteinen wären indiziert, um mehr Erkenntnisse zu erlangen. Dennoch wird die Annahme, dass SC144 ein wirkungsvoller Inhibitor der gp130/JAK/STAT3-Kaskade ist und in Zukunft eine Rolle in der Therapie des PDAC eine Rolle spielen könnte, durch die Ergebnisse anderer Studien und dieser Arbeit zunehmend bestärkt.

5.3 SC144 inhibierte das Tumorwachstum im orthotopen PDAC-Mausmodell

Nach den ermutigenden *in vitro*-Ergebnissen war der nächste Schritt, SC144 *in vivo* am orthotopen PDAC-Mausmodell zu untersuchen unter der Hypothese, dass SC144 das *in vivo*-Tumorwachstum inhibiert. Das vorbeschriebene humane orthotope PDAC-Xenograft-Modell konnte für den hier beschriebenen Versuchsansatz erfolgreich umgesetzt werden. Alle Tiere entwickelten im Verlauf Pankreastumore und es zeigte sich bei den mit SC144 behandelten Tieren keine höhergradige Toxizität. Hinsichtlich der Effektivität konnte nach der Therapie mit SC144 ein signifikant reduziertes orthotopes Tumorwachstum beobachtet werden. Darüber hinaus ließ sich eine Reduktion der Tumorinfiltration und der Metastasierung nachweisen, die zwar im gewählten Modell keine statistische Signifikanz erreichte, jedoch ein klarer Trend beobachtet werden konnte.

Oshima et al. beschreiben für die Behandlung mit SC144 in Kombination mit Paclitaxel in einem Mammakarzinommodell bei Mäusen eine signifikant geringere Tumormasse und ein verspätetes Tumorwachstum in der therapierten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (96). Diese Effekte waren konzentrationsabhängig, indem bei höheren Dosierungen von SC144 geringere Tumorvolumina beobachtet wurden (96). Der *in vitro* beschriebene Synergismus von Paclitaxel und SC144 trat *in vivo* erst in höheren Dosierungen von SC144 auf (96). Weiterhin traten unter der Kombinationstherapie keine relevanten Organschäden auf, was sich mit den eigenen Ergebnissen deckt (96). Darüber hinaus konnten Xu et al. keine Effekte von SC144 auf normale Epithelzellen beobachten, was ein weiterer Hinweis auf eine akzeptable Verträglichkeit von SC144 ist (42). In dieser Studie wurden Ovarialkarzinomzellen *in vivo* unter intraperitonealer und oraler Applikation von SC144 untersucht (42). Bei beiden Applikationswegen zeigte sich ein signifikant geringeres Tumorwachstum (42). Von besonderer Relevanz ist weiterhin, dass histologisch keine Toxizität in Lunge, Leber, Milz, Gehirn, Nieren, Herz und Pankreas gefunden wurde (42). Zugleich zeigte sich, dass SC144 die Tumorangiogenese effektiv inhibierte, indem eine reduzierte Gefäßdichte nachgewiesen wurde (42). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen fand keine dezidierte Analyse des Effekts von SC144 auf die Angiogenese statt. Da es sich bei L3.6pl-Zellen um eine hochangiogene Zelllinie handelt, die VEGF exprimiert, IL-6 proangiogen wirkt und SC144 bereits antiangiogene Eigenschaften zugesprochen wurden, erscheint es plausibel, dass auch in dem hier gezeigten Modell antiangiogene Effekte von SC144 eine Rolle spielen könnten (94, 98, 106).

Dass pSTAT3, IL-6 und OSM eine Rolle in der Karzinogenese und in der Aufrechterhaltung einer Mikroumgebung haben, die das Tumorwachstum fördert, wurde bereits berichtet (33, 52). Aus vorangegangenen Studien und den *in vitro*-Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass SC144 in den Zellmetabolismus und die Proliferationsaktivität von L3.6pl-Zellen eingreift. Daraus lässt sich ableiten, dass SC144 zumindest im gewählten Modell im Organismus Einfluss auf die Tumorentstehung und die Tumormikroumgebung nimmt. Ebenso sind die Ergebnisse hinsichtlich der Metastasierung ermutigend. Die beschriebenen *in vivo*-Versuche mit SC144 als Monotherapie stellen in Zusammenschau mit den *in vitro*-Ergebnissen in der Kombinationstherapie mit Paclitaxel die Grundlage für künftige weitere *in vivo*-

Experimente mit einer Kombinationstherapie dar. Insbesondere ließen sich künftig hierbei auch die antiangiogenen Eigenschaften von SC144 näher charakterisieren. Darüber hinaus ist künftig auch die Einbeziehung weiterer PDAC-Zelllinien in die *in vitro*- und *in vivo*-Experimente erforderlich, um die Ergebnisse auf eine breitere biologische Basis zu stellen.

6. Limitationen

Die vorgelegte Studie hat eine Reihe von Limitationen und zeigt nur einen Ausschnitt aus den Effekten von SC144 auf das PDAC. Es wurden Effekte von SC144 auf die hochmetastatische, lokal aggressiv wachsende und hochangiogene Zelllinie L3.6pl untersucht. Letztlich lassen sich die ermutigenden Ergebnisse auf eine breitere Basis stellen, wenn weitere Zelllinien untersucht werden. Möglicherweise könnten bei weniger aggressiv wachsenden Zelllinien die Effekte von SC144 geringer ausfallen. Es ist darüber hinaus anzunehmen, dass die im hier gezeigten Modell abwesende Toxizität in Kombination mit anderen Substanzen (ein Szenario, dass der klinischen Realität näherkommt) stärker ausgeprägt sein könnte.

In den hier gezeigten *in vivo*-Daten wurde ein immunsupprimiertes Nacktmausmodell gewählt. Dieses hat den entscheidenden Vorteil, dass humane Zelllinien verwendet werden können, jedoch auch den Nachteil, dass die verwendeten Nacktmäuse ein defizientes Immunsystem haben, was gerade in Hinblick auf die untersuchten Zytokine die Realität eines humanen Tumors unzureichend abbilden könnte. Es liegt nahe, dass sich die Tumormikroumgebung in Nacktmäusen von derjenigen in syngenen Tumormodellen unterscheidet. Versuche im gleichen Setting in einem syngenen *in vivo*-Tumormodell könnten darüber Aufschluss geben. Schließlich konnte zwar im beschriebenen Modell das orthotope Tumorwachstum präzise analysiert werden, die Ergebnisse hinsichtlich der Lymphknoten- und Fernmetastasierung sind jedoch weniger robust, da es sich nicht um ein dezidiertes Metastasierungsmodell handelt und die Reduktion der Metastasierung zwar ein interessanter Nebeneffekt ist, aber nicht Hauptgegenstand der Studie war. Metastasierungsmodelle, beispielsweise durch die Zellinjektion in die Pfortader könnten weitere Hinweise auf die Effekte von SC144 auf die Metastasierung im PDAC geben (107).

7. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Prävalenz- und Mortalitätsraten von PDAC und die limitierten Behandlungsoptionen unterstreichen die Notwendigkeit von innovativen, besser wirksamen Therapeutika, die die aktuell eingesetzten Chemotherapeutika ersetzen oder unterstützen könnten. Die Fähigkeit von Tumorzellen zur Resistenzentwicklung trägt außerdem dazu bei, dass das Repertoire der Systemtherapie erweitert werden sollte, um insbesondere metastasierte Tumorerkrankungen effektiver zu therapieren. In Hinblick auf den gp130/JAK/STAT3 Signalweg werden derzeit die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren Bazedoxifen und Raloxifen untersucht (33, 41, 75). Ein Vorteil dieser Substanzen ist, dass sie bereits zugelassene Medikamente mit nachgewiesenem Sicherheitsprofil sind und klinisch getestet werden können (33, 41, 53, 76, 108). In den letzten Jahren konnten viele neue Substanzen entwickelt werden, die ebenfalls in die gp130/JAK/STAT3-Kaskade eingreifen (88, 93, 109). SC144 zeigt Potential, in der Zukunft bestehende Therapieschemata, wie zum Beispiel Paclitaxel, zu verbessern. Die klinische Testung von SC144 hat derweil noch nicht stattgefunden und wäre ein entscheidender nächster Schritt. In der Summe stellt SC144 einen attraktiven Kandidaten für die klinische Weiterentwicklung dar, insbesondere in Kombination mit weiteren Substanzen, der im PDAC und anderen soliden Tumorentitäten präklinisch effektiv ist.

Literaturverzeichnis

1. Bertz JD, S.; Haberland, J.; Kraywinkel, K.; Kurth, B. M.; Wolf, U. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Robert Koch Institut; 2010 2010.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020;70(1):7-30.
3. Koch-Institut R. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Berlin: Robert Koch-Institut 2019.
4. Onkologie L. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2013;Langversion 1.0.
5. Mohammed S, Van Buren G, 2nd, Fisher WE. Pancreatic cancer: advances in treatment. World J Gastroenterol. 2014;20(28):9354-60.
6. Goral V. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015;16(14):5619-24.
7. Zhang Y, Yan W, Collins MA, Bednar F, Rakshit S, Zetter BR, Stanger BZ, Chung I, Rhim AD, di Magliano MP. Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. Cancer Res. 2013;73(20):6359-74.
8. Morris JPt, Cano DA, Sekine S, Wang SC, Hebrok M. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. J Clin Invest. 2010;120(2):508-20.
9. Lesina M, Wormann SM, Neuhofer P, Song L, Algul H. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas. Semin Immunol. 2014;26(1):80-7.
10. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH. Recent progress in pancreatic cancer. CA Cancer J Clin. 2013;63(5):318-48.
11. Chiorean EG, Coveler A. Pancreatic cancer: optimizing treatment options, new, and emerging targeted therapies. Drug Design, Development and Therapy. 2015.
12. Torres C, Perales S, Alejandre MJ, Iglesias J, Palomino RJ, Martin M, Caba O, Prados JC, Aranega A, Delgado JR, Irigoyen A, Ortuno FM, Rojas I, Linares A. Serum cytokine profile in patients with pancreatic cancer. Pancreas. 2014;43(7):1042-9.
13. Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Buschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. PLoS Med. 2010;7(4):e1000267.
14. [Available from: https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@@guideline/html/index.html#head-references.
15. Kamisawa TW, L. D.; Itoi, T.; Takaori, K. Pancreatic Cancer. Lancet. 2016;388:73-85.
16. Raufi AG, Manji GA, Chabot JA, Bates SE. Neoadjuvant Treatment for Pancreatic Cancer. Seminars in Oncology. 2019;46(1):19-27.
17. D'Angelo F, Antolino L, Farcomeni A, Sirimarco D, Kazemi Nava A, De Siena M, Petrucciani N, Nigri G, Valabrega S, Aurello P, Ramacciato G.

Neoadjuvant treatment in pancreatic cancer: Evidence-based medicine? A systematic review and meta-analysis. Med Oncol. 2017;34(5):85.
18. Versteijne E, Vogel JA, Besselink MG, Busch ORC, Wilmink JW, Daams JG, van Eijck CHJ, Groot Koerkamp B, Rasch CRN, van Tienhoven G, Dutch Pancreatic Cancer G. Meta-analysis comparing upfront surgery with neoadjuvant treatment in patients with resectable or borderline resectable pancreatic cancer. Br J Surg. 2018;105(8):946-58.
19. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP. Pancreatic cancer. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16022.
20. Carpelan-Holmstrom M, Nordling S, Pukkala E, Sankila R, Luttges J, Kloppel G, Haglund C. Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. Gut. 2005;54(3):385-7.
21. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zulke C, Fahlke J, Arning MB, Sinn M, Hinke A, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. JAMA. 2013;310(14):1473-81.
22. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wente MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Olah A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Buchler MW, European Study Group for Pancreatic C. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. JAMA. 2010;304(10):1073-81.
23. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, Faluyi O, O'Reilly DA, Cunningham D, Wadsley J, Darby S, Meyer T, Gillmore R, Anthoney A, Lind P, Glimelius B, Falk S, Izbicki JR, Middleton GW, Cummins S, Ross PJ, Wasan H, McDonald A, Crosby T, Ma YT, Patel K, Sherriff D, Soomal R, Borg D, Sothi S, Hammel P, Hackert T, Jackson R, Büchler MW. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. The Lancet. 2017;389(10073):1011-24.
24. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardiere C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Pere-Verge D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M, Groupe Tumeurs Digestives of U, Intergroup P. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med. 2011;364(19):1817-25.
25. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, Chone L, Francois E, Artru P, Biagi JJ, Lecomte T, Assenat E, Faroux R, Ychou M, Volet J, Sauvanet A, Breysacher G, Di Fiore F, Cripps C, Kavan P, Texereau P, Bouhier-Leporrier K, Khemissa-Akouz F, Legoux JL, Juzyna B, Gourgou S, O'Callaghan CJ, Jouffroy-Zeller C, Rat P, Malka D, Castan F, Bachet JB, Canadian Cancer Trials G, the Unicancer GIPG. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. N Engl J Med. 2018;379(25):2395-406.
26. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X,

Iglesias J, Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. N Engl J Med. 2013;369(18):1691-703.
27. Awasthi N, Zhang C, Schwarz AM, Hinz S, Wang C, Williams NS, Schwarz MA, Schwarz RE. Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. Carcinogenesis. 2013;34(10):2361-9.
28. Giordano G, Pancione M, Olivieri N, Parcesepe P, Velocci M, Di Raimo T, Coppola L, Toffoli G, D'Andrea MR. Nano albumin bound-paclitaxel in pancreatic cancer: Current evidences and future directions. World J Gastroenterol. 2017;23(32):5875-86.
29. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Mol Biol Cell. 2014;25(18):2677-81.
30. Huehnchen P, Muenzfeld H, Boehmerle W, Endres M. Blockade of IL-6 signaling prevents paclitaxel-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. Cell Death Dis. 2020;11(1):45.
31. Son S, Shim DW, Hwang I, Park JH, Yu JW. Chemotherapeutic Agent Paclitaxel Mediates Priming of NLRP3 Inflammasome Activation. Front Immunol. 2019;10:1108.
32. Starkweather A. Increased interleukin-6 activity associated with painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy in women after breast cancer treatment. Nurs Res Pract. 2010;2010:281531.
33. Chen X, Tian J, Su GH, Lin J. Blocking IL-6/GP130 signaling inhibits cell viability/proliferation, glycolysis, and colony forming activity in human pancreatic cancer cells. Curr Cancer Drug Targets. 2018;18:1-11.
34. Silver JS, Hunter CA. gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. J Leukoc Biol. 2010;88(6):1145-56.
35. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. Annu Rev Immunol. 1997;15:797-819.
36. Andersson LC, Gahmberg CG, Kimura AK, Wigzell H. Activated human T lymphocytes display new surface glycoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(7):3455-8.
37. Xu S, Neamati N. gp130: a promising drug target for cancer therapy. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2013;17(11):1303-28.
38. Anhuf D, Weissenbach M, Schmitz J, Sobota R, Hermanns HM, Radtke S, Linnemann S, Behrmann I, Heinrich PC, Schaper F. Signal Transduction of IL-6, Leukemia-Inhibitory Factor, and Oncostatin M: Structural Receptor Requirements for Signal Attenuation. The Journal of Immunology. 2000;165(5):2535-43.
39. Heinrich PC, Behrmann I, MÜLler-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochemical Journal. 1998;334(2):297-314.
40. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. Nat Rev Cancer. 2009;9(11):798-809.
41. Wu X, Cao Y, Xiao H, Li C, Lin J. Bazedoxifene as a Novel GP130 Inhibitor for Pancreatic Cancer Therapy. Mol Cancer Ther. 2016;15(11):2609-19.
42. Xu S, Grande F, Garofalo A, Neamati N. Discovery of a novel orally active small-molecule gp130 inhibitor for the treatment of ovarian cancer. Mol Cancer Ther. 2013;12(6):937-49.
43. Suh YA, Jo SY, Lee HY, Lee C. Inhibition of IL-6/STAT3 axis and targeting Axl and Tyro3 receptor tyrosine kinases by apigenin circumvent taxol resistance in ovarian cancer cells. Int J Oncol. 2015;46(3):1405-11.

44. Nagathihalli NS, Castellanos JA, Shi C, Beesetty Y, Reyzer ML, Caprioli R, Chen X, Walsh AJ, Skala MC, Moses HL, Merchant NB. Signal Transducer and Activator of Transcription 3, Mediated Remodeling of the Tumor Microenvironment Results in Enhanced Tumor Drug Delivery in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. Gastroenterology. 2015;149(7):1932-43 e9.
45. Nagaraj NS, Smith JJ, Revetta F, Washington MK, Merchant NB. Targeted inhibition of SRC kinase signaling attenuates pancreatic tumorigenesis. Mol Cancer Ther. 2010;9(8):2322-32.
46. Nagaraj NS, Washington MK, Merchant NB. Combined blockade of Src kinase and epidermal growth factor receptor with gemcitabine overcomes STAT3-mediated resistance of inhibition of pancreatic tumor growth. Clin Cancer Res. 2011;17(3):483-93.
47. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(9):651-62.
48. Denley SM, Jamieson NB, McCall P, Oien KA, Morton JP, Carter CR, Edwards J, McKay CJ. Activation of the IL-6R/Jak/stat pathway is associated with a poor outcome in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. J Gastrointest Surg. 2013;17(5):887-98.
49. Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. Cancer Cell. 2009;15(2):79-80.
50. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Kloppel G, Yoshimura A, Reindl W, Sipos B, Akira S, Schmid RM, Algul H. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. Cancer Cell. 2011;19(4):456-69.
51. Mace TA, Bloomston M, Lesinski GB. Pancreatic cancer-associated stellate cells: A viable target for reducing immunosuppression in the tumor microenvironment. Oncoimmunology. 2013;2(7):e24891.
52. Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, Tzatsos A, Conrad C, Benes CH, Levy DE, Settleman J, Engelman JA, Bardeesy N. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. Cancer Res. 2011;71(14):5020-9.
53. Shi W, Yan D, Zhao C, Xiao M, Wang Y, Ma H, Liu T, Qin H, Zhang C, Li C, Lin J, Li S, Lv J, Lin L. Inhibition of IL-6/STAT3 signaling in human cancer cells using Evista. Biochem Biophys Res Commun. 2017;491(1):159-65.
54. Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R. Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. Cancer. 2004;101(12):2727-36.
55. Kim HW, Lee JC, Paik KH, Kang J, Kim J, Hwang JH. Serum interleukin-6 is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma progression pattern. Medicine (Baltimore). 2017;96(5):e5926.
56. Dey G, Radhakrishnan A, Syed N, Thomas JK, Nadig A, Srikumar K, Mathur PP, Pandey A, Lin SK, Raju R, Prasad TS. Signaling network of Oncostatin M pathway. J Cell Commun Signal. 2013;7(2):103-8.
57. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. Biochem J. 1994;300 (Pt 2):281-90.
58. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta. 2011;1813(5):878-88.
59. Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. Eur J Cell Biol. 2011;90(6-7):484-94.

60. Garbers C, Scheller J. Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. Biol Chem. 2013;394(9):1145-61.
61. Avalle L, Camporeale A, Camperi A, Poli V. STAT3 in cancer: A double edged sword. Cytokine. 2017;98:42-50.
62. Bournazou E, Bromberg J. Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling. JAKSTAT. 2013;2(2):e23828.
63. Hermanns HM. Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. Cytokine Growth Factor Rev. 2015;26(5):545-58.
64. Fossey SL, Bear MD, Kisseberth WC, Pennell M, London CA. Oncostatin M promotes STAT3 activation, VEGF production, and invasion in osteosarcoma cell lines. BMC Cancer. 2011;11:125.
65. Li QZ, J.; Sun, F.; Liu, L.; Liu, X.; Yue, Y. Oncostatin M promotes proliferation of ovarian cancer cells through signal transducer and activator of transcription 3. International Journal of Molecular Medicine. 2011.
66. Winder DM, Chattopadhyay A, Muralidhar B, Bauer J, English WR, Zhang X, Karagavriilidou K, Roberts I, Pett MR, Murphy G, Coleman N. Overexpression of the oncostatin M receptor in cervical squamous cell carcinoma cells is associated with a pro-angiogenic phenotype and increased cell motility and invasiveness. J Pathol. 2011;225(3):448-62.
67. Tiffen PG, Omidvar N, Marquez-Almuina N, Croston D, Watson CJ, Clarkson RWE. A Dual Role for Oncostatin M Signaling in the Differentiation and Death of Mammary Epithelial Cellsin Vivo. Molecular Endocrinology. 2008;22(12):2677-88.
68. West NR, Murray JI, Watson PH. Oncostatin-M promotes phenotypic changes associated with mesenchymal and stem cell-like differentiation in breast cancer. Oncogene. 2013;33(12):1485-94.
69. Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. Cancer Res. 2005;65(19):8896-904.
70. Caffarel MM, Chattopadhyay A, Araujo AM, Bauer J, Scarpini CG, Coleman N. Tissue transglutaminase mediates the pro-malignant effects of oncostatin M receptor over-expression in cervical squamous cell carcinoma. J Pathol. 2013;231(2):168-79.
71. Caffarel MM, Coleman N. Oncostatin M receptor is a novel therapeutic target in cervical squamous cell carcinoma. J Pathol. 2014;232(4):386-90.
72. West NR, Murphy LC, Watson PH. Oncostatin M suppresses oestrogen receptor-alpha expression and is associated with poor outcome in human breast cancer. Endocr Relat Cancer. 2012;19(2):181-95.
73. Junk DJ, Bryson BL, Smigiel JM, Parameswaran N, Bartel CA, Jackson MW. Oncostatin M promotes cancer cell plasticity through cooperative STAT3-SMAD3 signaling. Oncogene. 2017;36(28):4001-13.
74. Goumas FA, Holmer R, Egberts JH, Gontarewicz A, Heneweer C, Geisen U, Hauser C, Mende MM, Legler K, Rocken C, Becker T, Waetzig GH, Rose-John S, Kalthoff H. Inhibition of IL-6 signaling significantly reduces primary tumor growth and recurrencies in orthotopic xenograft models of pancreatic cancer. Int J Cancer. 2015;137(5):1035-46.
75. Pozios I, Seel NN, Hering NA, Hartmann L, Liu V, Camaj P, Muller MH, Lee LD, Bruns CJ, Kreis ME, Seeliger H. Raloxifene inhibits pancreatic adenocarcinoma growth by interfering with ERbeta and IL-6/gp130/STAT3 signaling. Cell Oncol (Dordr). 2020.

76. Wang YM, H.; Zhao, C.; Liu, T.: Yan, D.; Jou, D.; Li, H.; Zhang, C.; Lü, J.; Li. C.; Lin, J.; Li, S.; Lin, L. Growth-suppressive activity of raloxifene on liver cancer cells by targeting IL-6/GP130 signaling. Oncotarget. 2017;8(20):33683-93.
77. Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M, O'Shea JJ. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. Nat Rev Drug Discov. 2017;16(12):843-62.
78. Fragoulis GE, McInnes IB, Siebert S. JAK-inhibitors. New players in the field of immune-mediated diseases, beyond rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2019;58(Suppl 1):i43-i54.
79. Metcalfe RD, Putoczki TL, Griffin MDW. Structural Understanding of Interleukin 6 Family Cytokine Signaling and Targeted Therapies: Focus on Interleukin 11. Frontiers in Immunology. 2020;11.
80. Strand V, Ahadieh S, French J, Geier J, Krishnaswami S, Menon S, Checchio T, Tensfeldt TG, Hoffman E, Riese R, Boy M, Gomez-Reino JJ. Systematic review and meta-analysis of serious infections with tofacitinib and biologic disease-modifying antirheumatic drug treatment in rheumatoid arthritis clinical trials. Arthritis Res Ther. 2015;17:362.
81. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. Immunity. 2019;50(4):1007-23.
82. Burmester GR, Rigby WF, van Vollenhoven RF, Kay J, Rubbert-Roth A, Kelman A, Dimonaco S, Mitchell N. Tocilizumab in early progressive rheumatoid arthritis: FUNCTION, a randomised controlled trial. Ann Rheum Dis. 2016;75(6):1081-91.
83. Jones G, Sebba A, Gu J, Lowenstein MB, Calvo A, Gomez-Reino JJ, Siri DA, Tomsic M, Alecock E, Woodworth T, Genovese MC. Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. Ann Rheum Dis. 2010;69(1):88-96.
84. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. Nat Rev Immunol. 2018;18(12):773-89.
85. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. Blood. 2008;112(10):3959-64.
86. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. J Clin Invest. 2011;121(9):3375-83.
87. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J. 2003;374(Pt 1):1-20.
88. Lin L, Hutzen B, Li PK, Ball S, Zuo M, DeAngelis S, Foust E, Sobo M, Friedman L, Bhasin D, Cen L, Li C, Lin J. A novel small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and activities and exhibits potent growth-suppressive activity in human cancer cells. Neoplasia. 2010;12(1):39-50.
89. Liu A, Liu Y, Jin Z, Hu Q, Lin L, Jou D, Yang J, Xu Z, Wang H, Li C, Lin J. XZH-5 inhibits STAT3 phosphorylation and enhances the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human breast and pancreatic cancer cells. PLoS One. 2012;7(10):e46624.
90. Zhao CW, W.; Yu, W.; Jou, D.; Wang, Y.; Ma, H.; Xiao, H.; Zhang, C.; Lü, J.; Li, S.; Li, C.; Lin, J.; Lin, L. A novel small molecule STAT3 inhibitor, LY5,

inhibits cell viability, colony formation, and migration of colon and liver cancer cells. Oncotarget. 2015;7(11):12917-26.
91. Hong SS, Choi JH, Lee SY, Park YH, Park KY, Lee JY, Kim J, Gajulapati V, Goo JI, Singh S, Lee K, Kim YK, Im SH, Ahn SH, Rose-John S, Heo TH, Choi Y. A Novel Small-Molecule Inhibitor Targeting the IL-6 Receptor beta Subunit, Glycoprotein 130. J Immunol. 2015;195(1):237-45.
92. Deng J, Taheri L, Grande F, Aiello F, Garofalo A, Neamati N. Discovery of novel anticancer compounds based on a quinoxalinehydrazine pharmacophore. ChemMedChem. 2008;3(11):1677-86.
93. Lin LH, B.; Zuo, M.; Ball, S.; Deangelis, S.; Foust, E.; Pandit, B.; Inhat, M.; Shenoy, S. S.; Kulp, S.; Li, P.-K., Li, C.; Fuchs, J.; Lin, J. Novel STAT3 Phosphorylation Inhibitors Exhibit Potent Growth-Suppressive Activity in Pancreatic and Breast Cancer Cells. American Association for Cancer Research. 2010;70(6):2445-54.
94. Grande F, Aiello F, Garofalo A, Neamati N. Identification and Preclinical Evaluation of SC144, a Novel Pyrroloquinoxaline Derivative with Broad-Spectrum Anticancer Activity. Mini Rev Med Chem. 2016;16(8):644-50.
95. Plasencia C, Grande F, Oshima T, Cao X, Yamada R, Sanchez T, Aiello F, Garofalo A, Neamati N. Discovery of a novel quinoxalinhydrazide with a broad-spectrum anticancer activity. Cancer Biol Ther. 2009;8(5):458-65.
96. Oshima T, Cao X, Grande F, Yamada R, Garofalo A, Louie S, Neamati N. Combination effects of SC144 and cytotoxic anticancer agents. Anticancer Drugs. 2009;20(5):312-20.
97. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Guilliams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. Nat Rev Drug Discov. 2019;18(1):41-58.
98. Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. Neoplasia. 1999;1(1):50-62.
99. Azmi AS, Ahmad A, Banerjee S, Rangnekar VM, Mohammad RM, Sarkar FH. Chemoprevention of pancreatic cancer: characterization of Par-4 and its modulation by 3,3' diindolylmethane (DIM). Pharm Res. 2008;25(9):2117-24.
100. Gysin S, Rickert P, Kastury K, McMahon M. Analysis of genomic DNA alterations and mRNA expression patterns in a panel of human pancreatic cancer cell lines. Genes Chromosomes Cancer. 2005;44(1):37-51.
101. Crane AM, Bhattacharya SK. The use of bromodeoxyuridine incorporation assays to assess corneal stem cell proliferation. 2013/05/22 ed2013. 65-70 p.
102. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc. 2018;2018(6).
103. Tomayko MMR, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 1989;24:148-54.
104. Chou T-C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Advances in Enzyme Regulation. 1984;22:27-55.
105. Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA, Carter DC. Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. Ann Surg. 1994;219(4):325-31.
106. Feurino LW, Zhang Y, Bharadwaj U, Zhang R, Li F, Fisher WE, Brunicardi FC, Chen C, Yao Q, Min L. IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and

upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells. Cancer Biol Ther. 2007;6(7):1096-100.
107. Seeliger H, Guba M, Koehl GE, Doenecke A, Steinbauer M, Bruns CJ, Wagner C, Frank E, Jauch KW, Geissler EK. Blockage of 2-deoxy-D-ribose-induced angiogenesis with rapamycin counteracts a thymidine phosphorylase-based escape mechanism available for colon cancer under 5-fluorouracil therapy. Clin Cancer Res. 2004;10(5):1843-52.
108. Li H, Xiao H, Lin L, Jou D, Kumari V, Lin J, Li C. Drug design targeting protein-protein interactions (PPIs) using multiple ligand simultaneous docking (MLSD) and drug repositioning: discovery of raloxifene and bazedoxifene as novel inhibitors of IL-6/GP130 interface. J Med Chem. 2014;57(3):632-41.
109. Yu W, Xiao H, Lin J, Li C. Discovery of Novel STAT3 Small Molecule Inhibitors via in Silico Site-Directed Fragment-Based Drug Design. Journal of Medicinal Chemistry. 2013;56(11):4402-12.

Materiallisten

Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
Filter Millipore Express PES Membrane Filter Unit	Merck, Darmstadt (DEU)
Glaspipettenspitzen (Pasteurpipetten)	VWR, Darmstadt (DEU)
Hamilton-Spritze	VWR, Darmstadt (DEU)
Kanülen 100 Sterican	B. Braun, Melsungen (DEU)
Mini Protean Western Blot Material: Glasschablonen, Glasschablonenseparationsinstrument, 10-Well-/16-Well-Kamm, Transfer-Schwämme (Fiber Pads)	Bio-Rad, München (DEU)
Nahtmaterial 5-0 Vicryl (geflochten, resorbierbar)	Ethicon, Somerville (NJ, USA)
Original Perfusor Spritze 50ml	B. Braun, Melsungen (DEU)
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips 100 - 1000µl 2 - 100µl 10µl	Sarstedt, Nümbrecht (DEU)
Polypropylen-Röhrchen Falcon 15ml	Corning, Corning (NY, USA)
Polypropylen-Rörchen CELLSTAR 50ml	greiner bio-one, Kremsmünster (AUT)
Plastikbox durchsichtig PerfectWestern	GenHunter Corporation, Brookline (MA, USA)
Plastikbox schwarz	LI-COR Biosciences, Bad Homburg (DEU)
PVDF-Membran	Perkin Elmer, Rodgau (DEU)
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht (DEU)
Serologische Pipetten Falcon 5ml 10ml	Corning, Corning (NY, USA)
Serologische Pipetten CELLSTAR 25ml	greiner bio-one, Kremsmünster (AUT)
Mini Protean Western Blot Material: Glasschablonen, Glasschablonenseparationsinstrument, 10-Well-/16-Well-Kamm, Transfer-Schwämme (Fiber Pads)	Bio-Rad, München (DEU)
Whatman-Filterpapier	Merck, Darmstadt (DEU)
Zellkulturflaschen Falcon 75 cm^2 250ml	Corning, Corning (NY, USA)
Zellkulturplatte Falcon 6 Wells 96 Wells	Corning, Corning (NY, USA)

Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht (DEU)

Tabelle 2: Für alle Versuche verwendetes Verbrauchsmaterial

Geräte	**Hersteller**
Autoklav Function Line	Heraeus, Hanau (DEU)
BB 15 CO_2 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II, MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Elektrische Pipette Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal (DEU)
Elektrische Pipette pipetus	Hirschmann, Eberstadt (DEU)
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen (DEU)
Gefrierschrank -80°C Forma 700 Series	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Heizgerät (Inkubator)	Kendro, Hanau (DEU)
Klimaschrank Aria	Tecniplast, Hohenpeißenberg (DEU)
Kühlschrank 4°C	Kirsch, Willstätt-Sand (DEU)
Lichtmikroskop TS100 Eclipse	Nikon, Düsseldorf (DEU)
Lumineszenzbildgebung	Peqlab Biotechnologie, Erlangen (DEU)
Magnetrührgerät	Schott, Weilheim (DEU)
Magnetrührstäbchen	Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Mini Protean Elektrophoresesystem	Bio-Rad, München (DEU)
Mini Protean Tetra Cell Casting Module	Bio-Rad, München (DEU)
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad, München (DEU)
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim (DEU)
pH-Elektrode 9157BNMD	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
pH-Meter Orion Star A111	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Pipetten 1000µl 100µl 10µl	Eppendorf, Hamburg (DEU)
Präzisionswaage	VWR, Darmstadt (DEU)
Reagenzglasschüttler REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach (DEU)
Reagenzglasschüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries,

	Bohemia (NY, USA)
Sauger	Berchthold, Tuttlingen (DEU)
Schüttler Gyro-Rocker	Stuart, Staffordshire (GBR)
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach (DEU)
Spektrophotometer EL808 Ultra Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Winooski (VT, USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg (DEU)
Waage	Sartorius Lab Instruments, Göttingen (DEU)
Wärmeplatte Medax	Störk-Tronic, Sturrgart (DEU)
Western Blot Imaging System Fusion-FX7	Vilber Lourmat, Eberhardzell (DEU)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg (DEU)
Zentrifuge miniSpin Plus	Eppendorf, Hamburg (DEU)
Zentrifuge Biofuge primo R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Zentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)

Tabelle 3: Liste der Geräte, die für alle Versuche verwendet wurden

Substanzen und Chemikalien	**Abkürzung**	**Hersteller**
Ammoniumperoxidsulfat	APS	Merck, Darmstadt (DEU)
Bovines Serumalbumin	BSA	Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Bromphenolblau		Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Corn Oil		Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt (DEU)
Dimethylsulfoxid	DMSO	Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Dithiothreitol	DTT	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt (DEU)
Essigsäure		Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Ethanol		Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Fetales Kälberserum (fetal bovine	FBS	Biochrom, Berlin (DEU)

serum)		
Glycerol		Merck, Darmstadt (DEU)
Glycin	Gly	Th. Geyer, Renningen (DEU)
Marker Protein (PageRuler Plus)		Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Methanol		Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Milchpulver		Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Merck, Darmstadt (DEU)
Natrium-Azid	NaN_3	Merck, Darmstadt (DEU)
Natriumdodecylsulfat-Pellets	SDS	Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt (DEU)
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Polyacrylamid 40%	PAA	Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Salzsäure 37%	HCl	Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Schwefelsäure	H_2SO_4	Carl Roth, Karlsruhe (DEU)
Streptomycin/Penicillin		PAA Laboratories, Pasching (AUT)
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid	MTT	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt (DEU)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	Merck, Darmstadt (DEU)
Trypsin-EDTA		Biochrom, Berlin (DEU)
Tween 20		Promega, Madison (WI, USA)

Tabelle 4: Liste der Substanzen und Chemikalien

Puffer und Lösungen	**Zusammensetzung**
5x Laemmlipuffer	125mM 0,5M Tris-HCl (pH 6,8) 10% SDS 50% Glycerol 500mM Dithiothreitol (DTT) 20mg Bromphenolblau ad 20ml ddH_2O
10x West-Puffer	144g Glycin 30,4g Tris ad 1L ddH_2O gelagert bei 4°C
APS 10 %	APS ddH_2O
Bromdesoxyuridin-Lösung	BrdU DMSO
BSA-Blockinglösung	5% BSA 0,02% NaA ddH_2O
BSA-Standardreihe (50µg/µl)	30µl BSA-Stock (1mg/ml) 3µl Lyse-Puffer 600µl ddH_2O
Elektrophoresepuffer (EPHO)	70ml 10x West Puffer 7ml SDS ad 700ml ddH_2O bei Raumtemperatur gelagert
Lysepuffer	1ml RIPA 10µl Protease-Inhibitor-Cocktail
Milchlösung 1,5 %	Milchpulver TBS-T
MTT-Lösung	50mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid 10ml PBS
PAA-Sammelgel 10 %	9,6ml ddH_2O 4,8ml 1,5M Tris (pH 8,8) 5ml 40% PAA 200µl 10% SDS 20µl TEMED 400µl 10% APS
PAA-Trenngel	3,1ml ddH_2O 1,25ml 0,5M Tris (pH 6,8) 0,5ml 40% PAA 50µl 10% SDS 5µl TEMED

	50µl 10% APS
SDS 10 %	5g SDS 50ml ddH_2O
TBS-T pH 7,6	5ml Tween 20 30,5g Tris 44g NaCl HCl ad 5L ddH_2O
Transferpuffer (1x West)	100ml Methanol 100ml 10x West ad 1L ddH_2O frisch angesetzt, ca. 60 Minuten bei -20°C gelagert

Tabelle 5: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Gebrauchsfertige Kits	**Hersteller**
Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric: Fixierlösung Anti BrdU-POD working solution Antibody dilution solution Substrate solution	Roche, Mannheim (DEU)
Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit: Lumi-Light^{Plus} Luminol/Enhancer Solution Lumi-Light^{Plus} Stable Peroxide Solution	Roche, Mannheim (DEU)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt (DEU)
QuantiPro BCA Protein Assay Kit: BCA Reagenz A BCA Reagenz B Standardalbumin 2mg/ml	Merck, Darmstadt (DEU)
RIPA Lyse- und Extraktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Tris-HCl Puffer 0,5M pH 6,8 1,5M pH 8,8	Bio-Rad, München (DEU)

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten gebrauchsfertigen Kits, wie sie zusammengesetzt sind und woher sie bezogen wurden

Medikamente und Zytokine	Hersteller
Bepanthen-Augensalbe	Bepanthen, Leverkusen (DEU)
Carprofen (Rimadyl) 50mg/ml	Pfizer, Berlin (DEU)
Interleukin-6	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Ketamin (Ketanest) 10%	Pfizer, Berlin (DEU)
Natriumchlorid 0,9%	B. Braun, Melsungen (DEU)
Oncostatin M	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main (DEU)
Paclitaxel	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt (DEU)
SC144	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt (DEU)
Xylazin (Rompun) 20mg/ml	Bayer, Leverkusen (DEU)

Tabelle 7: Auflistung der Zytokine und Medikamente

Antikörper	Hersteller
pSTAT3-Primärantikörper (rabbit)	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main (DEU)
STAT3-Primärantikörper (rabbit)	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main (DEU)
Sekundärantikörper (anti-rabbit)	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt (DEU)

Tabelle 8: Die verwendeten Antikörper für die Immunoblotanalyse

Software
EndNote X9
FusionCapt Advance Analyse Software, Vilber Lourmat
ImageJ
KC4 Kinetcalc for Windows Version 2.7, Bio-Tek Instruments
Microsoft Excel
Microsoft Word

Tabelle 9: Liste der für die gesamte Arbeit verwendeten Betriebsprogramme

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Emily Günzler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Inhibition des gp130/JAK/STAT3-Signalweges mittels SC144 als innovatives Target beim Pankreasadenokarzinom / The inhibition of the gp130/JAK/STAT3 pathway using 3SC144 as an innovative target in pancreatic adenocarcinoma“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.og) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Hendrik Seeliger für das Vertrauen und Engagement während des gesamten Prozesses und das wertvolle Feedback bedanken. Die intensive Zusammenarbeit insbesondere in der finalen Phase hat die Doktorarbeit zu einer wertvollen Erfahrung für mich gemacht.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr bei Dr. med. Ioannis Pozios für die Aufnahme in die Forschungsgruppe, das Begeistern für die experimentelle Arbeit, die stetige Unterstützung von Beginn an und dafür, dass das Projekt zu einer wertvollen Erfahrung wurde. Natürlich möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Nina Hering für die Betreuung im Labor und die ständige Hilfe bei allen Fragen bedanken, für die Ratschläge, die mich immer weitergebracht haben und für die immense zeitliche, fachliche und menschliche Investition in meine Arbeit.

Ich möchte mich bei der gesamten AG Seeliger und dem Team des chirurgischen Forschungslabors der Charité Benjamin Franklin für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die tatkräftige und zeitintensive Unterstützung bei allen Versuchen und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor bedanken. Besonderer Dank gilt Marco Arndt, der immer ein Ansprechpartner für mich war und viel Zeit und Geduld in meine Arbeit investiert hat und sehr dazu beigetragen hat, dass das Labor ein Ort war, an dem ich gerne Zeit verbracht habe.

Meiner guten Freundin Anna-Maria Schmid danke ich für das Korrekturlesen und die Motivation. Zu guter Letzt danke ich natürlich meiner Familie. Zum einen danke ich meinem Bruder, dass er immer ein Zufluchtsort für mich war und mir bei allen Fragen und Problemen gute Ratschläge geben konnte. Zum anderen danke ich Uschi und Werner für die lebenslange Begleitung und das stetige Interesse in das, was ich tue. Insbesondere danke ich meiner Mutter, vor allem für die bedingungslose emotionale Unterstützung, dass sie immer mit Rat und Tat an meiner Seite steht, sich interessiert und mich motiviert und ohne die die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre und ohne die ich nicht zu dem geworden wäre, was ich bin.

CHARITÉ

CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (IBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
https://biometrie.charite.de/

Name, Vorname: Günzler, Emily

Emailadresse: emily.guenzler@charite.de

Matrikelnummer: [redacted]

Promotionsbetreuerin: PD Dr. med. Hendrik Seeliger

Promotionsinstitution / Klinik: Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Emily Günzler innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (IBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: *18.02.2021*

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- statistische Tests (Welch t-Test) bei sehr kleiner Fallzahl explorativ und geben eine Tendenz an, keine konfirmatorischen Aussagen möglich; eventuell auch Korrektur für Multiples Testen beachten
- Für Auswertung durchgeführter Zellversuche eher deskriptive Darstellung und keine statistischen Tests empfohlen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 10.03.2021

Name des Beraters/ der Beraterin: Miriam Sieg

[redacted]

Unterschrift Beraterin, Institutsstempel

CHARITÉ
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und
Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Sitz: Reinhardtstr. 58