

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II-Großhadern der
Ludwigs-Maximilians-Universität
zu München

Direktor Prof. Dr. med. Burkhard Göke

***In vitro* Untersuchungen zur Rolle des PI(3)K-AKT-
mTOR-, des RAS-RAF-MEK-ERK- und des TRAIL-
Signalweges als „targets“ in der molekular
zielgerichteten Therapie von neuroendokrinen
Tumoren**

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

vorgelegt von
Janina Maria von Rüden
aus Princeton/ USA
2012

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

Berichterstatter: PD Dr. med. Christoph Auernhammer

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Lars Lindner
Prof. Dr. med. Hermann Fießl
PD. Dr. med. Susanna Müller
Prof. Dr. med. Jochen Schopohl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Kathrin Zitzmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2012

Diese Arbeit ist selbstständig und ohne Zuhilfenahme anderer als der angegebenen Hilfsmittel entstanden. Alle der Literatur entnommenen Erkenntnisse sind als solche kenntlich gemacht und ihrer Herkunft entsprechend einzeln nachgewiesen.

Augsburg, den 10.05.2011

Janina Maria von Rüden

1. EINLEITUNG	6
1.1. Definition	6
1.2. Geschichte und Klassifikation	6
1.3. Klinik	10
1.4. Diagnostik	13
1.5. Therapie	17
1.6. Neue Therapieoptionen.....	21
1.6.1. PI(3)K-AKT-mTOR- und RAS-RAF-MEK-ERK als „Targets“ neuer Therapiestrategien	21
1.6.2. Wiederherstellung der TRAIL-Empfindlichkeit in GEP-NET-Zellen als neue Therapiestrategie...	27
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1. Material	32
2.2. Methoden	36
3. ERGEBNISSE	45
3.1. Teil I.....	45
3.1.1. Effekte von RAD001, NVP-BEZ235 und RAF265 auf die Viabilität von GEP- NET-Zellen	45
3.1.2. Interaktionen und intrazelluläre Kompensationsmechanismen bei Inhibierung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK – Argumente für eine duale Inhibierung	48
3.1.4. Effekte einer Inhibierung von PI(3)K-Akt-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK auf die VEGF-Sekretion in GEP-NET-Zellen	51
3.1.5. Zugrundeliegende Mechanismen der Effekte von RAD001, NVP-BEZ235 und RAF265 auf die Viabilität von GEP-NET-Zellen.....	53
3.1.6. Effekte von NVP-AEW541 auf AKT und ERK und auf die Zellproliferation	56
3.1.7. Auswirkungen einer parallelen Hemmung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK	56
3.2. Teil II.....	59
3.2.1. Expression von TRAIL-Rezeptoren in GEP-NET-Zellen	59
3.2.2. Identifizierung von TRAIL-empfindlichen und TRAIL-resistenten GEP-NET-Zelllinien.....	59
3.2.3. Die TRAIL-Empfindlichkeit von GEP-NET-Zellen korreliert mit der Überexpression von FLIPs und Bcl-2 und niedrigen Caspase-8-Spiegeln.....	60
3.2.4. Wiederherstellung der TRAIL-Empfindlichkeit in GEP-NET-Zellen	62
3.2.5. Zugrundeliegende Mechanismen des Synergismus von NVP-AEW541 bzw. RAF265 und TRAIL	65
4. DISKUSSION	69
4.1. Teil I.....	69
4.2. Teil II.....	74

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	77
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	78
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
8. PUBLIKATIONEN.....	95
8.1. Originalpublikationen.....	95
8.2. Kongressbeiträge	95
9. LEBENSLAUF.....	96
10. DANKSAGUNG	98

1. EINLEITUNG

1.1. Definition

Neuroendokrine Tumore (NET) des gastroenteropankreatischen Systems (GEP) sind eine seltene und heterogene Tumorentität. Die Inzidenz beträgt 2,5-5/100.000 pro Jahr [Modlin IM et al., Cancer 2003], wobei NET ca. 2% aller Malignome des GEP-Systems ausmachen [Warner RR et al., Gastroenterology 2005]. Das Wort „endokrin“ beschreibt die Fähigkeit der Zelle Hormone bzw. Hormon-ähnliche Stoffe zu produzieren. Da die Zellen außerdem Proteine sezernieren, die auch vom Nervengewebe freigesetzt werden (Synaptophysin, Chromogranin A und Neuronen-spezifische Enolase), spricht man von „neuro-endokrin“.

1.2. Geschichte und Klassifikation

NET-GEP wurden zum ersten Mal von Oberndorfer S. im Jahre 1907 beschrieben [Oberndorfer, S., 1907, „Karzinoide des Dünndarms“, Frankfurter Z. Pathol. 1-426-432]. Er untersuchte Neoplasien im Darm, die aus Enterochromaffinen (EC-)-Zellen hervorgingen und deren Zellen Serotonin produzierten. Er hielt sie aufgrund ihres langsamen Wachstums verglichen zu Adenokarzinomen für benigne und bezeichnete sie als „Karzinoide Tumore“ [Klöppel G. et al., Ann NY Acad Sci 2007]. In den 1960er Jahren erfolgte die erste Einteilung durch Williams ED. und Sandler M. [Williams ED & Sandler M. et al., Lancet 1963]. Diese wurde entsprechend der Lokalisation des Primärtumors und der embryonalen Entwicklung durchgeführt und man unterteilte in Karzinoide des Vorderdarms (Bronchien, Magen, Duodenum und Pankreas), des Mitteldarms (Jejunum, Ileum, Appendix, Colon ascendens und rechtes Colon transversum) und des Hinterdarms (linkes Colon transversum bis Rektum). Ebenso wie die erste Klassifikation der WHO von 1980 erlaubte diese Einteilung keine adäquate Aussage über den Verlauf der Erkrankung. Basierend auf einer Einteilung durch Capella C. et al. [Capella C. et al., Virchows Arch 1995] wurde im Jahr 2000 eine modifizierte WHO-Klassifikation veröffentlicht [Solcia E. et al.; International Histological Classification

of Tumours 2000]. Die NET werden nach der WHO Klassifikation aus dem Jahr 2000 nach Lokalisation des Primarius (Bronchien, Magen, Duodenum, Pankreas, Jejunum/Ileum, Appendix, Colon und Rektum) sowie nach funktioneller Aktivität (funktionell-aktiv versus funktionell-inaktiv) unterteilt. Außerdem werden die NET seit diesem Zeitpunkt nicht mehr einheitlich als Karzinoide bezeichnet, sondern anhand des Wachstumsverhaltens und Grad der Entartung in 1) hoch differenzierte neuroendokrine Tumore mit benignem oder unklarem Verhalten, 2) hoch differenzierte neuroendokrine Karzinome mit niedrig malignem Verhalten und 3) schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome mit hochmalignem Verlauf unterteilt (siehe Tab. 1). Die WHO-Klassifikation von 2010 führte nun nochmals zu einer Neuordnung der „Neuroendokrinen Neoplasien“ in Neuroendokrine Tumore G1, G2 und Neuroendokrine Karzinome G3 (siehe Tab. 1) [Bosman F. et al., IARC Press 2010]. Es wird weiterhin die hormonelle Aktivität beurteilt. NET sind in der Lage Hormone und Hormon-ähnliche Substanzen zu synthetisieren und zu sezernieren [Ferolla P. et al., J Endocrinol Invest. 2008]. Dabei kommt es bei einem Großteil der Tumore zu keinen klinischen Symptomen und man bezeichnet diese deshalb als funktionell-inaktiv. Funktionell-aktive Tumoren hingegen gehen mit typischen klinischen Syndromen einher. Beispielsweise kommt es bei einem Gastrinom durch dessen gesteigerte Gastrin-Freisetzung zu dem sogenannten Zollinger-Ellison-Syndrom, welches mit einer gesteigerten Salzsäureproduktion im Magen und der Entstehung von *Ulcera ventriculi* und *Ulcera duodeni* einhergeht [Tomassetti P. et al., Ann Oncol 2001].

Zusätzlich wurde von Rindi G. et al. im Jahr 2006 und 2007 ein Grading-System vorgestellt [Rindi G. et al., Virchows Arch 2006+2007], welches im Rahmen einer Konsensus Konferenz der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) entwickelt worden war. Es unterteilt NET mithilfe des Proliferationsindex Ki-67 in niedriggradige G1-Tumore ($Ki \leq 2\%$), mittelgradige G2-Tumore ($Ki-67$ 3-20%) und hochgradige G3-Tumore ($Ki-67 > 20\%$). Dieses Grading System wurde mittlerweile von der UICC Klassifikation 2009 und der WHO Klassifikation einstimmig übernommen. In einer retrospektiven Studie von Pape UF. et al. wurde bereits gezeigt, dass dieses Grading System eine hohe prognostische Relevanz aufweist [Pape UF. et al., Cancer 2008].

Weiterhin stellte Rindi G. et al. im Jahr 2006 und 2007 erstmalig ein TNM-System für NET vor [Rindi G. et al., Virchows Arch 2006+2007], welches ebenfalls im Rahmen der Konsensus Konferenz der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) entwickelt worden war. Dieses TNM-System ist mittlerweile durch die UICC 2009 in großen Teilen übernommen worden [UICC, „TNM-Classification of Malignant Tumours“, 7. Edition], wengleich in einzelnen Tumorentitäten (z.B. Pankreas, Appendix) Diskrepanzen zwischen den beiden Systemen bestehen.

WHO-Bezeichnung	Neuroendokriner Tumor 2000/ NET G1 2010	Neuroendokrines Karzinom 2000/ NET G2 2010	Neuroendokrines Karzinom 2000/ NEC G3 2010
Histologie	hochdifferenziert	Hochdifferenziert	Wenig differenziert large cell NEC vs. Small cell NEC
Verhalten	Benigne	Niedrig maligne	Hochgradig maligne
TumorgroÙe	≤ 2cm	> 2 cm	alle
Proliferation	< 2 Mitosen/ 10HPF, Ki-67 ≤ 2%	2-20 Mitosen/ 10 HPF, Ki-67 3-20%	> 20 Mitosen/ 10 HPF, Ki-67 > 20%
Angioinvasion	-	+	+
Invasion von Nachbarorganen	-	+	+
Metastasen	-	+	+

WHO-Bezeichnung	Neuroendokriner Tumor 2000/ NET G1 2010	Neuroendokrines Karzinom 2000/ NET G2 2010	Neuroendokrines Karzinom 2000/ NEC G3 2010
Histologie	hochdifferenziert	Hochdifferenziert	Wenig differenziert large cell NEC vs. Small cell NEC
Verhalten	Benigne	Niedrig maligne	Hochgradig maligne
TumorgroÙe	≤ 1cm	> 2 cm	Alle
Proliferation	< 2 Mitosen/ 10 HPF Ki-67 ≤ 2%	2-20 Mitosen/ 10 HPF Ki-67 3-20%	> 20 Mitosen/ 10 HPF Ki-67 > 20%
Angioinvasion	-	+	+
Invasion der M. propria	-	+	+
Metastasen	-	+	+

Tab.1: WHO-Klassifikation 2000 vs. 2010 für NET des Pankreas **(A)** und des Gastrointestinalen Systems **(B)**

1.3. Klinik

Bei NET des GEP handelt es sich meist um langsam wachsende Neoplasien mit unspezifischen klinischen Symptomen. Funktionell inaktive NET bleiben häufig jahrelang unerkannt und führen erst bei großen Tumormassen zu Beschwerden und daraufhin zur Diagnosestellung. Dadurch kommt es zu einer durchschnittlichen Verzögerung der Diagnosestellung von mehr als 5 Jahren [Toth-Fejel S. & Pommier RF., American J Surgery 2004], sodass zu jenem Zeitpunkt in ungefähr zwei Dritteln der Fälle fortgeschrittene Krankheitsstadien mit bereits vorhandenen Metastasen vorliegen [Modlin IM. et al., Cancer 2003]. Diese befinden sich zu 85% in der Leber, seltener in der Peritonealhöhle oder im Knochen [Pape UF. et al., Endocr Relat Cancer 2008]. Diese Tatsache hat einen erheblichen Einfluss auf die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten; sie beträgt laut einer Erhebung der SEER-Datenbank („Surveillance, Epidemiology, and End Results Program“ des National Cancer Institute/ USA) bei Patienten mit metastasierten NET des Pankreas ungefähr 30 % bzw. 45% bei Patienten mit metastasierten NET mit Ursprung im Dünndarm [Modlin IM. et al., Am J Gastroenterol 2007).

NET des Pankreas sind häufig funktionell-aktive Tumore, während nur 20-50% der NET des Pankreas funktionell-inaktiv sind [Plöckinger U. et al., Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol. 2007]. Diese Tumore gehen aus den verschiedenen Zelltypen der Langerhans-Inseln hervor. Ein Beispiel für einen funktionell-aktiven NET des Pankreas ist das Insulinom, welches mit einer Inzidenz von 0,2 – 0,4/100 000 pro Jahr der häufigste NET pankreatischen Ursprungs ist und sich aus den β -Zellen der endokrinen Zellinseln entwickelt [Öberg K. et al., Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005]. Es handelt sich in 90% der Fälle um einen benignen Tumor, der meist klein ist und sporadisch auftritt; in 4-7% kommt das Insulinom im Rahmen einer familiären Multiplen Endokrinen Neoplasie 1 (MEN1) vor [Massironi S. et al., World J Gastroenterol 2008]. Die Bezeichnung „Insulinom“ entspricht der Fähigkeit übermäßig Insulin zu bilden und freizusetzen. Klinisch äußert sich dies mit Zeichen der Hypoglykämie (Schwitzen, Zittern und Heißhunger) und Neuroglykopenie (Verwirrtheit, Desorientiertheit, Krampfanfälle). Die reflektorisch gesteigerte Katecholamin-Freisetzung führt zu vermehrtem Schwitzen, Tremor und Palpationen. Im Hungerversuch über 72 Stunden erkennt man die Dissoziation zwischen hypoglykämischen Blutzuckerwerten und nicht adäquat supprimierten Insulin-, Proinsulin- und C-Peptid-Spiegeln

[The Endocrine Society's Clinical Guidelines: „Evaluation and Management of Adult Hypoglycemic Disorders“, www.endo-society.org 2009]. Weitere funktionell-aktive NET des Pankreas und die dazugehörigen klinische Syndrome werden in der Tabelle 2 gezeigt.

NET extrapancreatischen Ursprungs, früher häufig als „Karzinoide“ bezeichnet, entwickeln sich aus entarteten Enterochromaffinen (EC)-Zellen. Die Primärtumoren befinden sich zu ca. 85% im Gastrointestinaltrakt und zu 10% im Bronchialsystem [Modlin IM. et al., Cancer 2003]. Seltener Lokalisationen sind unter anderem Leber, Gallenblase, Pankreas, Thymus, Ovar und Prostata. Diese Gruppe von NET synthetisieren zahlreiche Mediatoren wie Serotonin, Bradykinin, Histamin und Prostaglandin, sind aber in ungefähr 90% der Fälle funktionell-inaktiv. Sie bleiben daher meist lange klinisch inapparent und äußern sich erst im späteren Verlauf bei lokalverdrängendem Wachstum durch Bauchschmerzen, Cholestase oder Ikterus. Bei funktionell-aktiven Tumoren kommt es besonders bei Vorliegen von Lebermetastasen durch eine gesteigerte Freisetzung von Serotonin zum sogenannten Karzinoid-Syndrom [Massironi S. et al., World J Gastroenterol. 2008]. Dieses äußert sich durch Flushs und Diarrhoen, sowie seltener Bronchoobstruktion, Endokardfibrose mit besonders häufiger Beteiligung der Trikuspidal- und Pulmonalklappe oder Pellagra-ähnlichen Hautveränderungen. Nach Interventionen mit Manipulation am Tumor kann sich das Karzinoid-Syndrom durch eine massive Freisetzung von Mediatoren zu einer lebensbedrohlichen Situation, der sogenannten „Karzinoiden Krise“ entwickeln, welche mit ausgeprägter Flush-Symptomatik und massiven Diarrhoen mit Exsikkose, Hypotonus und Tachykardie, bis hin zur Arrhythmie und Dysfunktion des ZNS einhergeht [Caplin ME. et al., Lancet 1998].

NET	Inzidenz (Fälle/10 ⁶)	Peptide/Amine	Klinik	Metastasen (%)	MEN I (%)
Insulinom	1-2	(Pro-)Insulin	Whipple- Trias, Neuroglukopenie	10	5-10
Gastrinom	1-1,5	Gastrin	Zollinger-Ellison- Syndrom	60-90	25
VIPom	0,1	Vasointestinales Peptid (VIP)	Werner-Morrison- Syndrom (Diarrhoe, Hypokaliämie, Achlorhydrie)	50-80	10
Glucagonom	0,01-0,1	Glukagon	Diabetes mellitus, Kachexie	80-90	5-17
Somatostati- nom	< 0,1	Somatostatin	Gallensteine, Diabetes mellitus	60-70	5-10

Tab. 2: Funktionell-aktive NET des Pankreas [Kaltsas G. et al., Endocrine Reviews 2004]

1.4. Diagnostik

Bei dem klinischen Verdacht auf das Vorliegen eines GEP-NET stehen verschiedene diagnostische Mittel zur Verfügung. Um eine optimale Therapie von GEP-NET zu gewährleisten, wurden von der „European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS)“ und der „North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS)“ jeweils Empfehlungen für Diagnostik und Therapie vorgeschlagen, welche in Form von Guidelines festgehalten worden sind [ENETS-Guidelines: [www. neuroendocrine.net](http://www.neuroendocrine.net); NANETS-Guidelines: <http://nanets.net>].

Histologie:

Immunhistochemische Tumormarker: Eine wichtige Rolle spielen die Tumormarker, von denen einige routinemäßig bei allen NET unabhängig von dem Primärtumor in der Immunhistochemie bestimmt werden sollten. Diese Untersuchungen erfolgen im Rahmen der Histologie des Tumorgewebes. Das zur Histologie benötigte Material wird entweder durch eine Biopsie des Primärtumors oder dessen Metastase bzw. durch deren operative Entfernung gewonnen. Danach ist der Nachweis bestimmter Tumormarker erforderlich, um das Vorliegen eines neuroendokrinen Phänotyps zu bestätigen [Klöppel G. et al., Virchows Arch 2007]. Man unterscheidet hierbei zwischen allgemeinen und spezifischen Tumormarkern. Zu der ersten Gruppe zählen Synaptophysin und Chromogranin A. Ein positiver Nachweis von Synaptophysin in der Immunhistochemie ist ein typisches Merkmal von NET. Dieses wird unabhängig von der Hormonproduktion in vesikulären Granula des Zytoplasmas normaler und neoplastischer neuroendokriner Zellen gespeichert, somit ist es im Falle eines NETs immunhistochemisch stets nachweisbar. Chromogranin A (CgA) ist ein saures Glykoprotein, welches in der Matrix der Sekretionsgranula von NET-Zellen exprimiert wird und dann immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Die Expression von CgA kann sehr unterschiedlich stark ausfallen: Während diese in gut differenzierten NET meist stark erhöht ist, kann sie im Falle des kleinzelligen neuroendokrinen Lungen-Karzinoms bzw. bei rektalen NET auch ganz fehlen.

Weitere fakultativ zusätzlich anwendbare immunhistochemische Marker für NET sind die Neuronen-spezifische Enolase (NSE), CD56 und PGP9.5 [Bussolati G. et al., Endocr Pathol 2001]. Schließlich können weitere Marker mit Hilfe von Immunfärbungen bestimmt werden, um bei nachgewiesenen NET-Metastasen den Primärtumor zu lokalisieren. Außerdem wird NET-Gewebe häufig auf das Vorliegen von Somatostatin-

Rezeptoren (SSR) untersucht. Diese sind in der Zellmembran von ungefähr 80-95% der NET nachweisbar, wobei es sich meist um die Somatostatin-Rezeptor-Subtypen 2 + 5 handelt [Reubi JC. et al., J Steroid Biochem Mol Biol. 1992]. Der Nachweis erfolgt mittels Immunfärbung der SSR2.

Grading: Nach der Diagnose eines NET wird der Differenzierungsgrad festgelegt. Desweiteren wird die Proliferationsaktivität des NET mittels des Proliferationsindex Ki-67 (MIB1) beurteilt. Dabei erfolgt dann entsprechend der Klassifikation der WHO von 2010 eine Einteilung in NET G1 (Karzinoid), NET G2, NET G3 und Neuroendokrines Karzinom G3 (siehe Tabelle 1). Bei dem Proliferationsindex Ki-67 (MIB1) handelt es sich um das Antigen Ki-67 aus dem Zellkern, das in der G1-, S-, G2- und M-Phase, nicht aber in der G0-Phase, des Zellzyklus nachgewiesen werden kann. Da dieses Antigen Ki-67 nicht in den DNA-Reparatur-Mechanismus eingebunden ist, stellt es einen guten Marker für die Proliferation entarteter Zellen dar [Vilar E. et al., Endocr Relat Cancer 2007]. Ki67 wird mittels Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper MIB1 markiert, gefärbte Areale im Gewebe werden gescannt und Abschnitte mit besonders hoher Farbintensität beurteilt. Um den Ki-67- (MIB1-)Index zu bestimmen, müssen mindestens 100 Tumorzellen untersucht werden. Entsprechend der prozentual betroffenen Zellen wird in G1 $\leq 2\%$, G2 3-20% und G3 $>20\%$ betroffene Zellen unterteilt [Rindi G. et al., Virchows Arch 2006 +2007].

Tumormarker in Serum und Urin:

Zu den generell empfohlen Untersuchungen bei NET zählt die Bestimmung des klinischen Tumormarkers Chromogranin A (CgA) im Serum. Der Serumspiegel von CgA ist abhängig von der Anzahl neurosekretorischer Granula in der Zelle und dem Zelltyp. Insgesamt sind etwa in 70% der NET-Erkrankungen erhöhte CgA-Spiegel nachweisbar [Öberg K. et al., Annals of Oncol 2004, Modlin IM. et al., Neuroendocrinology 2010]. Die Höhe des CgA im Serum korreliert außerdem mit der Tumormasse, sodass ein rascher Anstieg nach einer stabilen Krankheitsphase für eine Progression der Erkrankung und eine verminderte Überlebensrate spricht [Arnold R. et al.; Clin Gastroenterol Hepatol 2008].

Ein spezifischer klinischer Tumormarker für funktionelle NET des Mitteldarms, die mit dem Karzinoid-Syndrom einhergehen, ist die 5-Hydroxy-Indolessigsäure (5-HIES). Es handelt sich um einen Metabolit des Serotonins, der im 24h-Urin nachgewiesen werden kann. Bei NET des Mitteldarms beträgt dessen Sensitivität 70% und die Spezifität 90%. [ENETS-Guidelines – Biochemical Markers, Neuroendocrinology 2009]. NET des

Vorder- und Hinterdarms hingegen produzieren weniger Serotonin, weshalb die 5-HIES-Werte weniger aussagekräftig sind. So konnte Baudin E. et al. in seiner Studie in 85% der Mitteldarm-NET eine gesteigerte Sekretion von 5-HIES feststellen, während bei Vorderdarm-NET nur in 27% der Fälle eine Sekretion von 5-HIES nachweisbar war [Baudin E. et al., J Clin Endocrinol Metabol 1999]. Zusätzlich können die 5-HIES-Spiegel im Urin bei fehlendem Karzinoid-Syndrom bzw. Vorliegen einer lokalisierten NET-Erkrankung geringer ausfallen.

Weitere spezifische klinische Tumormarker sind Gastrin, Insulin, Glukagon und Somatostatin, welche bei entsprechender Klinik und dem Verdacht auf einen funktionell-aktiven NET des Pankreas bestimmt werden.

Spezialisierte Bildgebung:

Besonders wichtig für die Therapieplanung und deren Monitoring ist neben der histologischen Beurteilung die genaue Lokalisierung des Primärtumors und der gegebenenfalls vorliegenden Metastasen. Zu der Standarddiagnostik zählt unter anderem die bereits erwähnte Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS). Man verwendet mit ¹¹¹Indium markiertes Octreotid (Octreoscan®), um die exprimierten Somatostatin-Rezeptoren und damit die Verteilung von NET-Zellen im Körper aufzudecken. Dies gelingt mit einer Sensitivität von 52% und einer Spezifität von 92% [Virgolini I. et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010]. Ein neueres Verfahren stellt eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit den ⁶⁸Gallium-DOTA-konjugierten Peptiden [⁶⁸Gallium-DOTA⁰-Tyr³]-Octreotid (⁶⁸Ga-DOTA-TOC), [⁶⁸Ga-DOTA⁰-1NaI³]-Octreotid (⁶⁸Ga-DOTA-NOC) oder [⁶⁸Gallium-DOTA⁰-Tyr³]-Octreotate (⁶⁸Ga-DOTA-TATE) dar. Buchmann I. et al. verglich den herkömmlichen Octreoscan® mit dem ⁶⁸Gallium-DOTATOC-PET und konnte zeigen, dass dieses neuere Verfahren zuverlässiger beim Nachweis von NET-Läsionen in Lunge und Skelett, sowie in Leber und Gehirn ist. Bei 27 untersuchten Patienten mit NET standen die mittels ⁶⁸Ga-DOTA-TOC-PET bzw. mittels Octreoscan nachgewiesenen NET-verdächtigen Läsionen in einem Verhältnis von 29 zu 2 [Buchmann I. et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007]. Ebenso zeigte Srirajaskanthan R. et al., dass durch ein ⁶⁸Ga-DOTA-TATE-PET bei 51 Patienten mit NET mit negativem oder fragwürdigem Octreoscan-Befund zusätzliche NET-Erkrankungen nachgewiesen werden konnten (PET in 87% positiv) bzw. zu einer Änderung der Therapiestrategie in 71% der Fälle führten [Srirajaskanthan R. et al., J Nucl Med. 2010]. Neben der Lokalisierung des NET und dessen Metastasen sind für die Therapieplanung ebenso die Tumorgöße und die Lagebeziehung zu den Nachbarstrukturen von enormer Bedeutung.

Da diese Informationen durch eine Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie oder PET nicht erlangt werden, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Die klassischen bildgebenden Verfahren wie CT oder MRT sind hierfür das Mittel der Wahl und sind technisch stetig weiterentwickelt worden. Aktuell stehen verbesserte Verfahren wie das Multi-Detektor-CT (MDCT) oder das Mehrschicht-CT (MSCT) zu Verfügung. Diese ermöglichen mit Hilfe sehr feiner Schichten < 1mm und den Aufnahmen von über 100 Bildern das Konstruieren Multiplanarer Reformationen (MPR) bzw. dreidimensionaler Darstellungen [Herrmann KA. et al., Verdauungskrankheiten 3/2009]. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei NET um stark vaskularisierte Tumore handelt, welche sich besonders in der früh-arteriellen Phase nach einer Kontrastmittel-Gabe darstellen. Des Weiteren wurde das klassische Röntgen mit Barium-(Doppel-)Kontrast-Enteroklysma durch ein CT- bzw. MRT-Enteroklysma ersetzt [Horton KM. et al., Am J Roentgenol 2004]. Aktuell werden nuklearmedizinische (PET) und radiologische Verfahren (CT/MRT) kombiniert, um die funktionelle und die anatomische Information der NET-Erkrankung in einem Untersuchungsschritt zu erhalten [Zaidi H. & Prasad R., J Med Phys. 2009]. So konnte das gleichzeitige Durchführen einer Single-Photon-Emission-Computed Tomographie (SPECT) und eines CT die Treffsicherheit im Vergleich zu den getrennt durchgeführten Untersuchungen steigern [Apostolova I. et al., Ann Nucl Med 2010]. Ebenso wurden in einer Studie von Ruf J. et al. durch die kombinierte Anwendung einer ⁶⁸Ga-DOTATOC PET und einer CT bei 50 NET-Patienten 181 NET-Manifestationen nachgewiesen; die Anwendung von PET und CT getrennt konnte im Gegensatz nur 59 NET-Manifestationen diagnostizieren. Somit hatte die kombinierte Anwendung von PET und CT auch Einfluss auf die Therapiestrategie bei 38% der Patienten [Ruf J. et al., Neuroendocrinology. 2010]. In der Studie von Ambrosini V. et al. betrug der Anteil der Strategieänderung nach einer kombinierten Untersuchung mit ⁶⁸Ga-DOTANOC-PET/CT sogar 55% der Fälle [Ambrosini V. et al., Eur J Radiol. 2010].

1.5. Therapie

Die Therapie der Wahl bei nachgewiesenem NET und bisher einzige Möglichkeit der Kuration ist die vollständige Resektion des Tumors [Auernhammer CJ. et al., Gut 2011]. Dieses Vorgehen ist allerdings nur bei lokal begrenzten Tumoren möglich und führt bei diesen zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von 80-100% [Öberg K. et al., Ann Oncol 2008]. Häufig müssen bei der Therapie von NET bereits vorhandene Lebermetastasen berücksichtigt werden. Eine Fernmetastasierung mit Lebermetastasen liegt in bis zu 75% der Fälle bei Diagnosestellung bereits vor und hat einen erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf mit einer 5-Jahres-Überlebensrate kleiner als 50% [Tomassetti P. et al. Ann Oncol 2005; Kaltsas GA. et al., Endocr. Rev 2004; Mignon M. et al., Digestion 2000]. Bei gut-differenzierten neuroendokrinen Karzinomen wird ein operativer Eingriff auch bei vorhandenen Lebermetastasen angestrebt, sofern prä-operativ eine komplette Resektion oder zumindest eine Reduktion der Tumormassen von mehr als 90% (R0/ R1-Resektion) möglich erscheint. Dadurch kann die 5-Jahres-Überlebensrate der betroffenen Patienten auf 60 % gesteigert werden [Auernhammer CJ. et al., Zentralbl Chir. 2009]. Falls eine operative Intervention nicht indiziert ist, stehen verschiedene lokalablativ Verfahren zur Verfügung. Die Radiofrequenz Ablation (RFA) kann bei NET mit weniger als fünf Lebermetastasen, welche kleiner als fünf Zentimeter sind, angewendet werden [Vogl TJ. et al., Eur J Radiol 2008]. Diese Technik kann sowohl perkutan als auch laparoskopisch eingesetzt werden und führt zu einer Zerstörung der Tumorzellen mittels Koagulation der zellulären Proteine. Dadurch können die klinischen Symptome der Hypersekretion als auch die lokale Ausdehnung der Metastasen kontrolliert werden. In einer klinischen Studie von Berber E. et al. [Berber E. et al., World J of Surgery 2002] wurde bei 80% der untersuchten Patienten die klinischen Symptome teilweise bzw. vollständig durch RFA der Lebermetastasen behoben. In 40% der Patienten wurde außerdem eine Verzögerung der Krankheits-Progression erreicht. Weitere lokal ablativ Verfahren sind die transarterielle Embolisation (TAE) und die transarterielle Chemoembolisation (TACE) [Nazario J. et al., Semin Oncol. 2010]. Diese Verfahren werden eingesetzt, wenn sich die NET-Erkrankungen auf die Leber beschränkt oder sich eine große Tumormasse innerhalb der Leber befindet. Sie erzeugen durch selektive Embolisation von Leberarterien eine vorübergehende, vollständige Ischämie im Gebiet der Metastasen. Bei TACE erfolgt gleichzeitig eine Applikation von Chemotherapeutika, welche sich gegen das neoplastische Gewebe richten. Dabei kommen meist Doxorubicin, Streptozotocin und auch andere Chemotherapeutika zum Einsatz. Madoff DC. et al. zeigte, dass mit Hilfe

dieser Verfahren in ungefähr der Hälfte der Fälle eine Tumorregression erreicht werden kann. Außerdem kam es in dieser Studie zu einer Verbesserung der klinischen Symptome und einer Abnahme der Biomarker [Madoff DC. et al., J Vasc Interv Radiol 2006; Nazario J. et al., Semin Oncol. 2010]. Sowohl RFA als auch (Chemo-) Embolisation sind nicht geeignet, um disseminierte, extrahepatische NET-Erkrankungen zu behandeln - hier sind systemische Therapieansätze notwendig. Bei inoperablen oder metastasierten GEP-NET wird die Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) eingesetzt [Kwekkeboom DJ. et al., Semin Nucl Med 2010]. Dabei verwendet man radioaktiv-markierte Somatostatin-Analoga mit einer hohen Affinität gegenüber SSR2. Ein positiver Befund der Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie ist eine zwingende Voraussetzung für die Anwendung dieses Verfahrens. Für die PRRT wird das Somatostatin-Analogon Ocreotid mittels eines Chelators (1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-Tetrasäure = DOTA) an ein Radionuklid gebunden. Häufig verwendete Radionuklide sind ⁹⁰Yttrium und ¹⁷⁷Lutetium. So entstehen die derzeit gebräuchlichen Radiopharmaka ⁹⁰Yttrium-DOTA-Tyr³-Ocreotid (⁹⁰Y-DOTA-TOC), ⁹⁰Yttrium-DOTA-Tyr³-Ocreotat (⁹⁰Y-DOTA-TATE) und ¹⁷⁷Lutetium-DOTA-Tyr³-Ocreotat (¹⁷⁷LU-DOTA-TATE). In der bisher größten publizierten Fallserie untersuchte Kwekkeboom DJ. et al. die Ergebnisse einer PRRT mit ¹⁷⁷Lutetium-DOTA-TATE bei 510 NET-Patienten. Er beobachtete in 28% eine partielle Remission, in 35% eine Stabilisierung der Krankheit, in 20% eine Progression der Krankheit und in 2% der Fälle sogar eine komplette Remission [Kwekkeboom DJ. et al., J clin. Oncol. 2008]. Die PRRT gilt als ein sicheres Therapieverfahren, bei dem selten schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten. Prinzipiell werden akute und chronische Nebenwirkungen unterschieden. Kurz nach der Injektion der Radiotherapeutika bis einige Tage danach kann es zu Übelkeit, Erbrechen und verstärkten Schmerzen im Bereich des Tumors kommen. Später können hauptsächlich Nieren, Knochenmark und Leber von unerwünschten Wirkungen betroffen sein.

Ein weiteres Verfahren der NET-Therapie ist die konventionelle Chemotherapie. Das Standardprotokoll mit Streptozozin + 5-Fluoruracil bzw. Streptozotocin + Doxorubicin besitzt bei hochdifferenzierten NET des Pankreas eine „Response rate“ von etwa 40%, während NET des Mitteldarms mit einer RR von weniger als 10% als resistent erachtet werden [Öberg K. et al., Annals of Oncol, 2004; Vilar E. et al., Endocr Relat Cancer 2007; Auernhammer CJ. et al., Verdauungskrankheiten Sep./ Okt. 2009]. Ein neues erfolgversprechendes Chemotherapieprotokoll für NET des Pankreas ist die orale Kombinationstherapie von Capecitabine plus Temozolomid [Strosberg JR. et al., Cancer

2010]. Bei der Behandlung von gering differenzierten kleinzelligen und großzelligen neuroendokrinen Karzinomen mit einer hohen proliferativen Aktivität hat sich die Kombination von Etoposid und Cisplatin als Standard etabliert [ENETS-Guidelines: www.neuroendocrine.net; NANETS-Guidelines: <http://nanets.net>]; die Prognose bei dieser Tumorentität ist jedoch insgesamt schlecht.

Bei gut differenzierten, funktionell-aktiven Tumoren mit stabiler TumorgroÙe oder langsamem Tumorwachstum erfolgt eine symptomatische Therapie. Die Patienten besitzen trotz fortgeschrittener Krankheitsstadien eine relativ gute Lebenserwartung, leiden aber häufig unter den Symptomen der hormonellen Hypersekretion durch die NET-Zellen. Zur Reduktion dieser Symptome wird die Biotherapie angewendet [Plöckinger U. et al., Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol 2007]. Dabei profitiert man wiederum von den Somatostatin-Rezeptoren, welche an der Zelloberfläche der NET exprimiert werden [Appetecchia M. et al, Clin Cancer Res 2010]. Somatostatin ist ein Neurotransmitter, welcher die Freisetzung verschiedener anderer Stoffe unterbindet und somit eine Kontrolle der hormon-abhängigen Syndrome ermöglicht. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des physiologischen Somatostatins von nur zwei Minuten kommen Somatostatinanaloga (SSA) wie Octreotid und Lanreotid zum Einsatz. Diese weisen eine deutlich längere Halbwertszeit von ungefähr zwei Stunden auf und binden hauptsächlich an die Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 [Bruns C. et al., Eur J Endocrinol 2002]. Zahlreiche Studien konnten belegen, dass eine Behandlung mit SSA geeignet ist für die Therapie von Patienten mit funktionell-aktiven Tumoren. Modlin IM. et al. fasste die Daten verschiedener Studien zu Octreotid bzw. Lanreotid aus dem Zeitraum von 1972-2009 zusammen, welche mehr als 400 Patienten umfassten. Neben einer Symptomkontrolle in 74,2%, konnte in 51% der Fälle eine biochemische Antwort, gemessen an einem Rückgang von CgA und 5-HIES, erzielt werden [Modlin IM. et al., Aliment Pharmacol Ther 2010]. Eine Tumorkontrolle unter Somatostatinanaloga wurde bei gut differenzierten progredienten NET in etwa 45 % beobachtet [Plöckinger U. et al., Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol. 2007; Strosberg JR. et al., Cancer 2010]; die PROMID Studie belegte in einer Placebo-kontrollierten Studie die antiproliferativen Effekte von Octreotid LAR bei NET des Midgut [Rinke A. et al., J Clin Oncol. 2009].

In der letzten Zeit werden außerdem vermehrt zielgerichtete Therapiestrategien in der Behandlung von GEP-NET eingesetzt. Diese richten sich gegen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, sowie Rezeptortyrosinkinasen und intrazelluläre Signalkaskaden. Durch deren Inhibierung sollen Tumorangio-genese und Tumorzellwachstum reduziert bzw. Apoptose induziert werden. Dies geschieht durch Hemmung überaktiverter und

überexprimierter Signalkaskaden, welche häufig in Tumorzellen nachgewiesen werden konnten. Bereits seit November 2010 ist der Multikinase-Inhibitor Sunitinib für die Therapie von GEP-NET zugelassen. Dieser richtet sich unter anderem gegen VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR und c-kit. In einer prospektiven randomisierten klinischen Phase III-Studie war die Wirkung von Sunitinib gegenüber die eines Placebos bei Patienten mit fortgeschrittenem pankreatischen NET untersucht worden. Bei deutlich längerem Progressions freien Überleben und verlängerter Gesamtüberlebenszeit sowie einer verbesserten objektiven Response rate in der Sunitinib-Gruppe verglichen mit der Placebo-Gruppe wurde diese Studie frühzeitig abgebrochen und Sunitinib in der Behandlung von GEP-NET zugelassen [Raymond E. et al., N Engl J Med 2011]. Ebenso wird im Laufe des Jahres 2011 die Zulassung für das Rapamycin-Analagon Everolimus erwartet. Es handelt sich dabei um einen mTORC-1-Inhibitor, der sich gegen die Überaktivierung von PI(3)K-AKT-mTOR richtet. Auch dieser Inhibitor ist in einer Phase III-Studie an Patienten mit fortgeschrittenem pankreatischen NET untersucht worden und konnte deutliche Erfolge gegenüber des Placebos erzielen [Yao JC. et al., N Engl J Med 2011].

Zusammenfassend kann man sagen, dass zahlreiche verschiedene Methoden zur Verfügung stehen, um die klinischen Symptomen einer GEP-NET-Erkrankung zu reduzieren und eine Tumorstabilisierung in der palliativen Situation zu erreichen. Die vollständige Remission gelingt allerdings nur bei Vorliegen einer lokalisierten GEP-NET-Erkrankung. Aus diesem Grund werden anderweitige bzw. zusätzliche Therapiestrategien benötigt. Dabei versucht man die Grundlagen der Entstehung und des Fortbestehens der GEP-NET zu verstehen. Außerdem interessiert man sich für die Ursachen primärer oder sekundärer Resistenzen gegenüber der vorhandenen Therapieoptionen wie Radio- oder Chemotherapie.

1.6. Neue Therapieoptionen

1.6.1. PI(3)K-AKT-mTOR- und RAS-RAF-MEK-ERK als „targets“ neuer Therapiestrategien

Die Entstehung und das Wachstum transformierter Zellen sind abhängig von der Aktivierung sogenannter „survival pathways“. Durch deren konstitutive Aktivierung entgehen entartete Zellen häufig pro-apoptotischen und Zellzyklus-inhibierenden Signalen. Diese Erkenntnisse wurden für den ersten Teil dieser Arbeit aufgegriffen und es wurde versucht durch gezielte Inhibition spezifischer „survival-pathways“ eine Hemmung der Zellteilung bzw. Induktion von Apoptose zu bewirken.

Insulin-like Growth factor (IGF) abhängige-Signalwege spielen eine entscheidende Rolle für Wachstum und Fortbestehen zahlreicher Zell- und Gewebetypen und sind normalerweise streng reguliert. Weitere wichtige durch Wachstumsfaktoren aktivierte Rezeptoren an der Zelloberfläche sind zum Beispiel der Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGF-R), der Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor (VEGF-R) und der Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor (PDGF-R) [Shridar SS .et al., Mol Cancer Ther 2005; Zitzmann K. et al., Expert Rev. Endocrinol. Metab. 2008]. Die Aktivierung dieser Rezeptoren durch die verschiedenen Wachstumsfaktoren trägt zur Tumorzellproliferation, Apoptosehemmung in der Tumorzelle und zur Angiogenese bei. Durch konstitutive Aktivierung eines dieser Signalwege kann dieser zu einem „survival-pathway“ werden, was wiederum zur onkogenen Transformation von Zellen führen kann. Die Aktivierung dieser Signalwege erfolgt unter anderem am IGF-Rezeptor (IGF-R) oder am Insulin-Rezeptor (IR). Dabei handelt es sich um Plasmamembranproteine der Rezeptortyrosinkinase-Familie (RTK). Sie bestehen aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten, welche über Disulfidbrücken mit zwei transmembranären β -Untereinheiten verbunden sind. Diese wiederum beinhalten die zytoplasmatische Tyrosinkinase-Aktivität [Ullrich A. et al., EMBO J 1986]. Die Rezeptoren können sowohl als Homodimere als auch als Hybridrezeptoren, zusammengesetzt aus IGFR- und IR-Heterodimeren, vorliegen. Sie werden durch IRS-1 und IRS-2 bzw. Insulin aktiviert und es folgt die Autophosphorylierung des Rezeptors [Pappano WN. et al, BMC Cancer 2009]. Daher scheint der IGF-Signalweg unter anderem ein optimaler Ansatzpunkt für antiproliferative Strategien zu sein. Es wurden bereits verschiedene molekular zielgerichtete Therapien auf den verschiedenen Ebenen dieses Signalwegs untersucht. Zum einen Neutralisieren des Rezeptorliganden durch einen monoklonalen Antikörper,

wie zum Beispiel Neutralisieren von VEGF durch den VEGF-Antikörper Bevacizumab. Als nächstes könnte die Bindung des Liganden an den Rezeptor selbst durch monoklonale Antikörper verhindert werden; Beispiele hierfür wären Cetuximab gegen den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) oder MK-0646 gegen den Insulin-like Growth Factor Receptor (IGFR). Auf der nächsten Ebene erfolgt die Blockade der Rezeptoraktivierung durch Hemmung der Rezeptortyrosinkinase zum Beispiel mittels des Multityrosinkinaseinhibitors (VEGF, PDGF) Sunitinib. Eine weitere Möglichkeit ist die molekular zielgerichtete Blockade der intrazellulären Signalweiterleitung. Diese erfolgt unter anderem durch Einsatz des PI(3)K-Inhibitors LY294002 oder des mTOR-Inhibitors Everolimus [Fazio N. et al., Cancer Treat Rev. 2010]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Blockade des IGF-Rezeptors und die Hemmung von PI(3)K, mTOR und RAF untersucht.

Hauptsignalewege, die durch IGF stimuliert werden, sind der PI(3)K-AKT-mTOR- und RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg. Störungen dieser komplexen Signalkaskaden können einerseits zu Tumorentstehung und andererseits zu einer Resistenzentwicklung gegenüber den herkömmlichen Therapiestrategien führen. Nach erfolgter Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase zum Beispiel des IGFR katalysiert PI(3)K die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃). Dieses bewirkt wiederum die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase AKT (Proteinkinase B). Diese muss sowohl an Thr 308 als auch an Ser 473 phosphoryliert sein, um vollständig aktiviert zu werden. Ein wichtiges Target von AKT beim NET ist der „mammalian target of rapamycin“ mTOR-Komplex1 (mTORC1). mTORC1 besteht aus mTOR, der Substrat-definierenden Untereinheit Raptor und der Regulationseinheit mLST8 und er beeinflusst Apoptose, Proliferation und Zellwachstum über eine Modulation des Zellzyklus. Mittels des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E-bindenden Proteins (4EBP1) und der p70 ribosomale Protein S6 Kinase (p70S6K) vermittelt mTOR den Übergang von der G1- in die S-Phase. Dies geschieht mittels Translation und Transkription Zellzyklus-fördernder Proteine wie c-Myc und Cyklin D1. Gleichzeitig erfolgt die Inhibierung Zellzyklus-hemmender Proteine wie zum Beispiel p27 und p21 (siehe Abb. 1).

Der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg führt über eine Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase zu einer Weiterleitung der extrazellulären Signale an RAS. Es kommt daraufhin zu einer Abfolge von Phosphorylierungen beginnend mit der Aktivierung der Serin-/Threonin-Kinase RAF. RAF wiederum bewirkt die Aktivierung von MEK, worauf es zu einer Phosphorylierung von ERK kommt. Das führt zu einer

Aktivierung zahlreicher weiterer Substrate, welche dadurch Einfluss auf verschiedene Zellfunktionen wie zum Beispiel Veränderungen des Zytoskeletts als auch der Transkription von Genen nehmen (siehe Abb. 1).

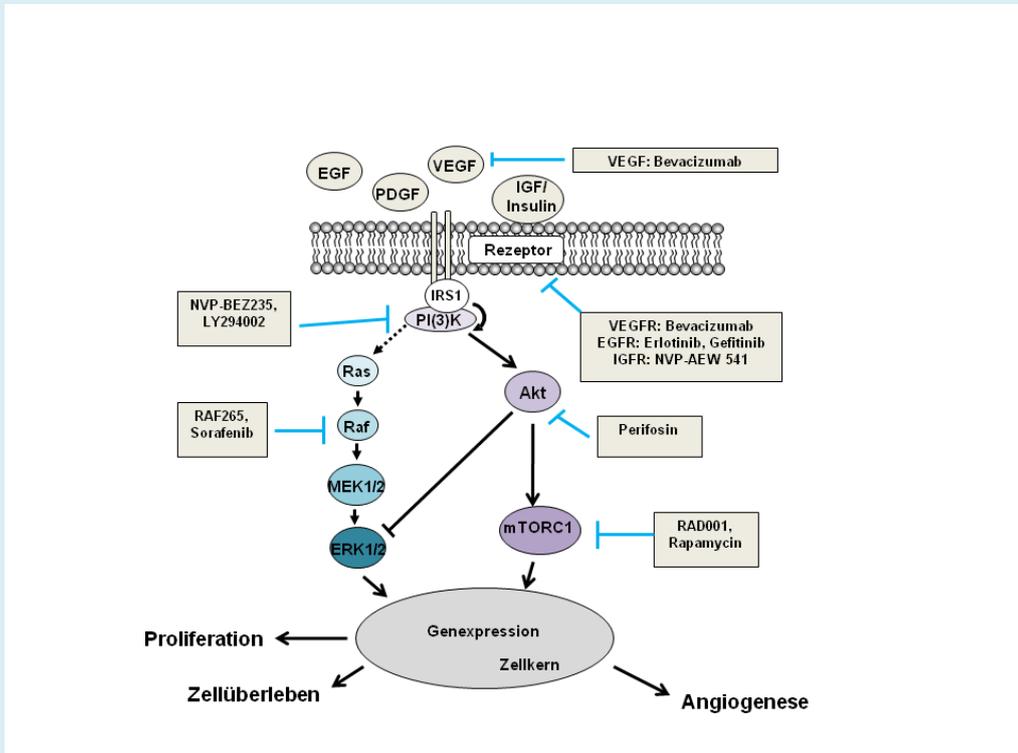


Abb. 1: Schematische Darstellung des PI(3)K-AKT-mTOR- und des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweges und der dazugehörigen molekular zielgerichteten Therapie. Adaptiert aus folgenden Literaturstellen: Serra V. et al., Cancer Res 2008; Hresko RC. et al., J Biol Chem 2005; Grant S., J Clin Invest 2008.

Die soeben beschriebenen Vorgänge laufen auch in nicht-transformierten Zellen ab. Verschiedene Mechanismen führen allerdings dazu, dass IGFR und damit PI(3)K-AKT-mTOR- und RAS-RAF-MEK-ERK in transformierten Zellen dauerhaft und übermäßig aktiviert sein können. Eine Ursache hierfür sind Mutationen oder Verlust von Tumorsuppressorgenen. So beobachtet man in 54% der gering differenzierten neuroendokrinen Karzinome eine Mutation oder „Silencing“ des „phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten“ (PTEN) [Wang L. et al., Appl. Immunohistochem. Mol. Morph]. Dabei handelt es sich um einen Tumorsuppressor, der für gewöhnlich die Signaltransduktion via PI(3)K-AKT-mTOR durch Inaktivierung von AKT hemmt. Bei Verlust oder inhibitorischen Veränderungen des PTEN-Gens hingegen kommt es zu einer unkontrollierten Aktivitätssteigerung von PI(3)K-AKT-mTOR und damit zu einer Begünstigung der Karzinogenese. Ebenso können in Tumoren aktivierende Mutationen von RAS und RAF vorliegen, diese konnten bei endokrinen Tumoren am häufigsten beim papillären Schilddrüsenkarzinom (66% der Fälle), seltener jedoch bei GEP-NET nachgewiesen werden [Perren A. et al., Endocr Relat Cancer. 2004]. Auch diese Mutationen können das Überleben und die Proliferation der transformierten Zellen fördern [Rowinsky EK. et al., J Clin Oncol 1999]. Dies erfolgt unter anderem mittels Telomerase-Induktion und autokrinen Sekretionsschleifen [Shridar SS. et al., Mol Cancer Ther. 2005]. Eine Studie von Shah T. et al. bestätigte den maßgebenden Einfluss von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK im Zusammenhang mit Tumorentstehung und -wachstum. In den untersuchten GEP-NET-Proben konnte in 76% der Fälle pAKT und in 96% der Fälle pERK nachgewiesen werden [Shah T. et al., J. Neuroendocrinol 2006].

Neben der Überaktivierung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK bestehen weitere Mechanismen, welche die Signaltransduktion zusätzlich verstärken und damit Wachstum und Proliferation von Tumorzellen unterstützen. So kommt es unter selektiver Blockade einzelner Moleküle der verschiedenen Signalwege zu zahlreichen Rückkopplungs- und Umgehungsmechanismen. Diese werden bei selektiver Inhibierung einzelner Proteinkinasen von PI(3)K-AKT-mTOR- und RAS-RAF-MEK-ERK aktiv und verleihen somit der Zelle eine Resistenz gegenüber der Inhibitoren. Dieser Effekt wurde unter anderem beim Einsatz von mTOR-Inhibitoren beobachtet. Unter der Hemmung von mTORC1 mittels Rapamycin kam es zu einer gesteigerten Aktivierung von AKT durch Induktion des IGFR und Steigerung des IRS-1-Level [O'Reilly KE. et al., Cancer Res 2006]. Zusätzlich wurde in einer aktuellen Studie von Carracedo A. et al. [Carracedo A. et al., J Clin Invest 2008] eine negative Rückkopplung zum RAS-RAF-MEK-ERK-

Signalweg beobachtet, welche durch PI(3)K vermittelt wird. Bei zahlreichen GEP-NET konnte außerdem das Vorliegen autokriner Sekretionsschleifen nachgewiesen werden. NET exprimieren häufig Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs) und deren Rezeptoren (IGFR) [Höpfner M. et al., *Endocr Relat Cancer* 2006; Zitzmann K. et al., *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 2008]. Von Wichert G. et al. demonstrierte dies an humanen BON1-Karzinoidzellen, welche den funktionell-aktiven IGFR und gleichzeitig IGF-1 exprimierten. Dadurch kam es zu gesteigertem Wachstum der Tumorzellen und einer vermehrten Sekretion von Chromogranin A [von Wichert G. et al., *Cancer Res* 2000].

Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass eine antiproliferative Behandlung durch Inhibierung einzelner oder mehrerer Bestandteile dieser Signalwege von Erfolg sein könnte. Es wurden bereits zahlreiche sogenannte „small-molecule“-Inhibitoren, folgend kurz Inhibitoren genannt, entwickelt, welche die Signalkaskaden an verschiedenen Punkten selektiv blockieren. Diese wurden auch an NET untersucht und werden zum Teil bereits in klinischen Studien getestet. Während Sorafenib (Inhibition von VEGFR/PDGFR und RAF) sich noch in Phase II-Studien befindet [Hobday TJ. et al., *J Clin Oncol.* 2007], haben Everolimus (RAD001, mTOR-Inhibitor) und Sunitinib (Inhibition von VEGFR/PDGFR) bereits Phase III-Studien absolviert. Sunitinib ist seit Ende 2010 bereits für die Behandlung von GEP-NET zugelassen. Ebenso steht die Zulassung von Everolimus im Laufe des Jahres 2011 bevor [Raymond E. et al., *N Engl J Med* 2011; Yao JC. et al., *N Engl J Med* 2011].

In der vorliegenden Arbeit wurde das antiproliferative Potential mehrerer dieser neuartigen Inhibitoren untersucht. Es wurde zunächst die Wirkung des singulären mTORC1-Inhibitors Everolimus (RAD001) auf PI(3)K-AKT-mTOR untersucht und mit der des dualen PI(3)K-/mTOR- Inhibitors NVP-BEZ235 verglichen. Mit Hilfe des selektiven RAF-Inhibitors RAF265 untersuchte man die Folgen einer Blockade von RAS-RAF-MEK-ERK. Anschließend wurde überprüft, ob Wachstums- und Proliferationshemmung durch eine kombinierte Inhibierung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK weiter verbessert werden können. Dazu wurde zuerst der IGFR, welcher Wachstumssignale sowohl an PI(3)K-AKT-mTOR als auch RAS-RAF-MEK-ERK weiterleitet, blockiert. Dabei kam der selektive IGFR-Inhibitor NVP-AEW541 zum Einsatz. Danach erfolgte eine kombinierte Anwendung von RAD001 oder NVP-BEZ235 mit RAF265.

1.6.2. Wiederherstellung der TRAIL-Empfindlichkeit in GEP-NET-Zellen als neue Therapiestrategie

Wie zuvor erwähnt vermindern die konstitutiv aktivierten PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionswege die Empfindlichkeit der NET-Zellen gegenüber pro-apoptotischen Signalen. Viele der bisher verfügbaren antiproliferativen Strategien in der Tumorthherapie zielen primär auf eine Apoptose-Induktion in den Karzinom-Zellen ab. Dieser Mechanismus wird allerdings häufig durch die gesteigerte Aktivität der „survival pathways“ umgangen. Das führt zu einem primären oder sekundären Wirkverlust von Chemo- oder Radiotherapie. Es wurden bereits verschiedene molekular zielgerichtete Inhibitoren erfolgreich eingesetzt, um die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Chemo- und Radiotherapie wieder zu steigern [Kimple R.J., Mol Interv. 2010; Wang S., Curr Med Chem. 2010].

Karzinomzellen sind häufig in der Lage neben der durch Chemo- oder Radiotherapie-induzierten Apoptose auch der endogen induzierten Apoptose zu entgehen. Diese wird durch den „Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)“ vermittelt, welcher damit eine Schlüsselfigur in der Tumorkontrolle durch das Immunsystem darstellt. Bei TRAIL handelt es sich um ein Mitglied der TNF-Überfamilie, welches 1995 von Wiley SR. et al. [Wiley SR. et al., Immunity 1995] durch die Sequenzhomologie zum Fas-Liganden und zu TNF vollständig identifiziert wurde. TRAIL bindet an vier verschiedene Rezeptoren: „Death Receptor“ (DR)4, DR5, DcR1 und DcR2. Während DcR1 und DcR2 keine intrazelluläre „funktionelle Domäne“ besitzen, initiiert der vom Liganden gebundene und aktivierte DR4 und DR5 mittels einer intrazellulären „Death domain“ den programmierten Zelltod der betroffenen Zelle [Mahalingam D. et al., Cancer Treat Rev. 2009]. Es kommt zur Ausbildung des „Death-inducing signaling complex“ (DISC) bestehend aus dem Adaptorprotein FADD (Fas-associated death domain) und Procaspase 8. TRAIL induziert Apoptose sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Signalweg [Ashkenazi A. et al., J Clin Oncol 2008]. Bei Typ-I-Zellen erfolgt ein Auslösen des programmierten Zelltodes mittels des extrinsischen Apoptose-Signalweges über eine Aktivierung der Pro-Caspase 8 im DISC. Dies führt wiederum zu einer Spaltung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7, welche die Spaltung weiterer intrazellulärer Proteine fördern und dadurch den programmierten Zelltod auslösen [Kischkel JC. et al., J Biol Chem. 2001]. Wird die Apoptose jedoch durch den intrinsischen Apoptose-Signalweg vermittelt (Typ-II-Zellen), so führt die aktivierte Caspase 8 zur Spaltung von Bid, einem Mitglied der pro-apoptotischen Bcl-2-

Familie. Das dabei entstehende t-Bid bildet mit Bax den Bid/Bax-Komplex, welcher die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c ermöglicht. Es kommt zur Ausbildung eines heptameren Apoptosomen-Komplexes, der sich aus Apaf1 und Caspase-9 zusammensetzt [Wang X. et al., Genes Dev. 2001]. Dieser Komplex bewirkt eine Aktivierung von Caspase-9, welche daraufhin die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 spaltet. Diese initiieren, wie auch im extrinsischen Weg, den programmierten Zelltod (siehe Abb. 2). Es konnte gezeigt werden, dass sich die pro-apoptische Wirkung von TRAIL auf Tumorzellen beschränkt und gesunde Zellen nicht geschädigt werden [Wang S. et al., Oncogene 2008/ Ashkenazi A. et al., J Clin Oncol 2008]. Auch die zu Beginn befürchtete Hepatotoxizität, welche bei einigen rekombinanten Formen von TRAIL beobachtet wurde, konnte in aktuellen Studien für natives humanes TRAIL widerlegt werden [Panner A. et al., Mol Cell Biol 2005]. Diese Erkenntnisse bestärken die Hoffnung TRAIL erfolgreich in der Tumorthherapie anwenden zu können. Bisher sind die Erfolge einer solchen Therapie allerdings begrenzt, da zahlreiche Tumorzellen Defekte in der Apoptose-Regulation aufweisen, welche den Zellen eine Resistenz gegenüber TRAIL verleihen. Während der komplette Verlust von TRAILR1 und TRAILR2 zu einer TRAIL-Resistenz führen kann [Elias A. et al., Clin Cancer Res.2009], gibt es keine eindeutige Korrelation zwischen der Empfindlichkeit gegenüber TRAIL und der Anzahl der exprimierten TRAIL-Rezeptoren. Stattdessen scheint die TRAIL-Resistenz vielmehr auf Veränderungen im Apoptose-Signalweg zu basieren. Somit käme es bei intaktem und aktiviertem Rezeptor zu einer verminderten Fortleitung des pro-apoptischen Signals.

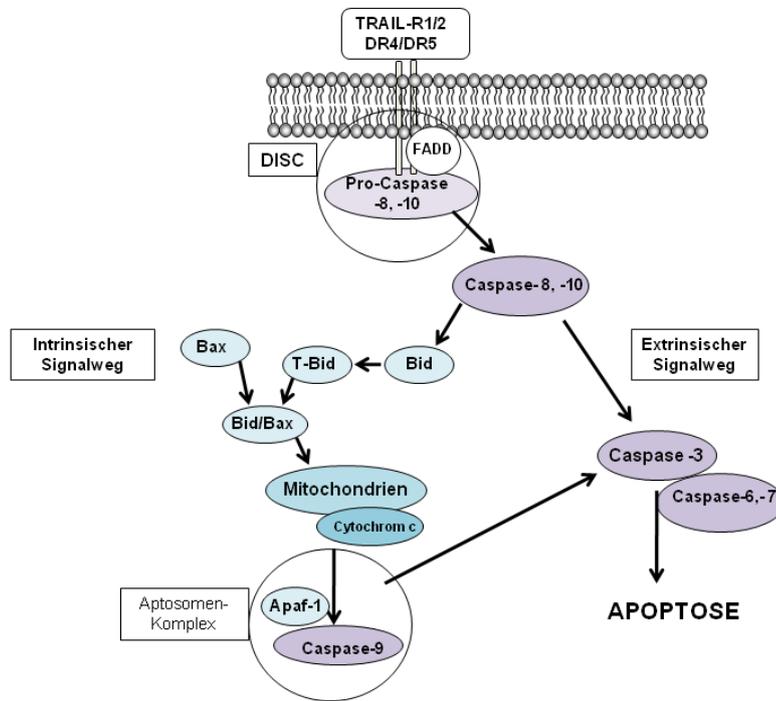


Abb.2: Schematische Darstellung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptose-Signalwegs vermittelt durch den Tumornekrosefaktor(TNF)-assoziierten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL), welche beide zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen. Adaptiert aus folgenden Literaturstellen: Panner A. et al., Mol Cell Biol 2005; Uchida M. et al., Int J Oncol 2007; Shivapurkar N. et al., Oncogene 2002.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Überexpression des Caspase-8-Inhibitors c-FLIP (cellular FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein) eine Ursache für verminderte TRAIL-Sensitivität sein kann [Kataoka T. et al., *Curr Biol* 1998]. Ein weiterer Grund könnten verminderte Spiegel der Caspase-8 durch Hypermethylierung des Promotors [Shivapurkar N. et al., *Cancer Biol Ther* 2002] oder erhöhte Spiegel von anti-apoptischen Bcl-2-Familienmitgliedern (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) sein [Shivapurkar N. et al., *Oncogene* 2002; Zhang L. et al., *Cancer Gene Ther* 2005]. Diese Veränderungen scheinen unter anderem durch konstitutive Aktivierung von PI(3)K-AKT-mTOR hervorgerufen zu werden. So führen beispielsweise hohe Konzentrationen von pAKT zu gesteigerter Aktivität von FLIP [Krüger A. et al., *J Biol Chem* 2001]. In zahlreichen Karzinomzellen wurde versucht die Empfindlichkeit gegenüber TRAIL durch eine selektive Inhibition von PI(3)K-AKT-mTOR wiederherzustellen. So konnte Uchida M. et al. zeigen, dass bei einer Inhibierung von PI(3)K die Expressionsniveaus von c-Flip und Bcl-2 gesenkt und das Expressionsniveau von Bax gesteigert werden. Dadurch stieg die durch TRAIL-induzierte Apoptose in oralen Plattenepithel-Karzinomzellen [Uchida M. et al., *Int J Oncol* 2007]. Ebenso unterliegt nur ein geringer Teil von Glioblastom-Zellen einer TRAIL-induzierten Apoptose. Dies konnte auf eine gesteigerte Expression des Caspase-8-Inhibitors c-FLIP infolge einer Überaktivierung von PI(3)K-AKT-mTOR zurückgeführt werden. Diese Tatsache wurde durch die Auswirkungen einer mTOR-Inhibierung und der Blockierung von dessen Zielprotein p70S6K verdeutlicht. Dabei kam es nämlich zu einer Abnahme der FLIPs-Expression und somit auch zu einer verminderten TRAIL-Resistenz [Panner A. et al., *Mol Cell Biol* 2005]. Diese Ergebnisse befürworten ähnliche Therapieansätze bei NET-Zellen. Defekte in der Apoptose-Regulation müssen erkannt und gezielt ausgeschaltet werden, um so die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber TRAIL wieder herzustellen. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung des mTORC1-Inhibitors RAD001, des PI(3)K-/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235, des RAF-Inhibitors RAF265 und des IGFR-Inhibitors NVP-AEW541 auf die TRAIL-Empfindlichkeit von NET-Zellen analysiert. Hierzu wurden vier verschiedene NET-Zelllinien (BON1- und CM-Zellen pankreatischen Ursprungs, GOT1 aus einem Mitteldarm-Karzinoid und NCI-H727 aus einem Bronchus-Karzinoid) auf ihre TRAIL-Empfindlichkeit untersucht und anschließend mit Kombinationen der verschiedenen Inhibitoren und TRAIL behandelt.

In dieser Arbeit zeigten alle Inhibitoren antiproliferative bzw. pro-apoptotische Effekte und somit stellen sowohl der IGFR als auch die nachgeschalteten Signalwege PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK essentielle „Targets“ molekular zielgerichteter Therapiestrategien dar. Außerdem wurde beobachtet, dass eine kombinierte Anwendung dieser Inhibitoren mit TRAIL eine Steigerung der TRAIL-Sensitivität auch in sonst weitgehend TRAIL-unempfindlichen NET-Zellen zur Folge hat, wodurch das antitumorale Potential dieser Substanzen bestätigt wurde. Die Frage einer möglichen klinischen antitumoralen Wirkung muss in weiteren vorklinischen und klinischen Studien untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat 50%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Borsäure	ICN Biomedicals, USA
Cell Titer 96 Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
1,4- Dithiothreit (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM/F12-Medium (1:1) [GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO [Dimethylsulfoxid]	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNTP 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Titriplex III) [Ethylendiamintetraessigsäure]	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler, 100bp, DNA-Ladder	Fermentas International Inc., Kanada
GOLD Universal Agarose	peglab Biotech GmbH, Erlangen, Deutschland
Hepes [2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure]	Boehringer Mannheim Chemicals, Deutschland
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Human VEGF, DY293B	R&D Systems, Minneapolis, USA
Isopropanol	C.Roth, Karlsruhe, Deutschland
6x Loading dye solution	Fermentas International Inc, Kanada
Magnesiumsulfat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland

Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS [Phosphat-gepufferte Salzlösung]	Apotheke Klinikum München, Deutschland
Platinum Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standard Dual Colors	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Reverse Transkriptase = M-MLV	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, IL, USA
RNAse-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rotigel 30 (30% Acrylamid)	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese SDS-Page	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640-Medium	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Sodium orthovanadate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SuperSignal West Dura Luminol (Enhancer Solution)	Thermo Fisher Scientific, Ulm, Deutschland
SuperSignal West Dura Stable Peroxide Buffer	Thermo Fisher Scientific, Ulm, Deutschland
TEMED [Tetramethylethylendiamin]	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma Base	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol Reagenz	GIBCO BRL/Life Technologies, MD, USA
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Tab.3: In den Versuchen eingesetzte Chemikalien

Geräte

Gerät	Hersteller
Agagel Mini Biometra	Biomed. Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
AGFA Curix 60	AGFA, Deutschland
Brutschrank CO2-AutoZero	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Elektrophoresekammer Protean II xi Cell	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
FACSCalibur	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
GeneAmp PCR-System 2400	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
Labornetzgerät TNG 30	Voltcraft, Deutschland
Medingen Wasserbad W-22	Funke Medingen, Deutschland
Mikroskop-CK2	Olympus, Japan
Mikrozentrifuge MC13	Millipore, MA, USA
MultiDoc-it Geldokumentationsgerät	UVP Inc., CA, USA
Netzgerät LKB-EPS 500/400	Pharmacia, Österreich
Oberflächen- und Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Orbital Shaker OS-20	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Orion II-Luminometer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Photometer-Sunrise	TECAN, Männerdorf, Schweiz
Power Pac 3000	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Semi-Dry-Western-Blot-Graphitelektroden	Laborwerkstätten, Klinikum Großhadern, München, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus instruments, Osterode, Deutschland
Video Graphic Printer UP890CE	Intas, Göttingen, Deutschland
Wärmeblock	Grant instruments, Cambridge, UK
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge und Vortex	ELMI, Riga, Lettland

Tab.4.: In den Versuchen eingesetzte Geräte.

Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chromatography paper1/3CHR	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Electric Koch- und Gefrierfolie Typ FO 70	Petra, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Medical-X-Ray-Film, Super RX	FUJI, USA
Glaspipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multiwell-96-Well	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Multiwell-12-Well	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Multiwell-6-Well	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR tubes	Biozym Biotech Trading GmbH, Österreich
Präzisionspipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transfermembran Immobilon P, PVDF hydrophob, Porengröße 0,45 µM	Millipore, MA, USA
Zellkulturflaschen 250/750 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen Nunclon Surface 250 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Sigma-Aldrich, MO, USA
Zentrifugenröhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tab. 5: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien

Verwendete Puffer:

- SDS-Probenpuffer: 0,25M Tris Hcl, 40% Glycerol, 2% Natriumdodezylsulfat (SDS), 1% Dithiothreitol, Bromphenolblau pH 8,8
- Lysispuffer: 50mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Na₄P₂O₇, 100mM NaF und 2mM Natriumorthovanadate, pH 7,4
- Milchpulver-TBS-T-Puffer: 0,02M Tris HCl, 0,15M NaCl, 2% 0,01% Natriumacid.
- Nicoletti-Puffer: 1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100 und 50µg/ml Propidiumjodid
- Waschpuffer: TRIZMA®base, Sigma-Aldrich, MO, USA

2.2. Methoden

Zellkulturmethoden

Allgemeines: Alle vier NET Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, in Wasserdampf-gesättigter und 5 % CO₂ enthaltender Atmosphäre kultiviert. Zum Schutz vor Kontaminationen wurden alle Arbeiten an den Zellkulturen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. BON1-, CM- und NCI-H727-Zellen wurden in den Falcon-Zellkulturflaschen von 75cm² (Becton-Dickinson, Deutschland) aufbewahrt. Um ein adhärentes Wachstum der GOT1-Zellen zu sichern, wurden in diesem Fall „nunclon surface“-Zellkulturflaschen (Becton-Dickinson, Deutschland) eingesetzt.

Bestimmung der Zellzahl: Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer, wobei abgestorbene Zellen durch eine Markierung mit Trypanblau (Endkonzentration 0,2%, Sigma-Aldrich, Deutschland) von der Zählung ausgeschlossen wurden.

NET-Zelllinien:

Zelllinie	Primarius	Verwendetes Medium + Zusätze
BON1	Humane Karzinoid-Zellen mit Ursprung im Pankreas, Mit freundlicher Unterstützung von R. Göke (Marburg, Deutschland)	DMEM/F12 + 10% FKS + 1% Penicillin-Streptomycin + 0,2% AmphotericinB
CM	Humane Insulinom-Zellen	RPMI + 10% FKS + 1% Penicillin-Streptomycin + 0,2% AmphotericinB
NCI-H727	Humane Bronchuskarzinoid-Zellen ATCC (VA, USA)	RPMI + 10% FKS + 1% Penicillin-Streptomycin + 0,2% AmphotericinB
GOT1	Humane Mitteldarmkarzinoid-Zellen Mit freundlicher Unterstützung von O.Nilsson (Göteborg, Schweden)	RPMI + 10% FKS + 1% Penicillin-Streptomycin + 0,2% AmphotericinB + Insulin (0,135 IE/ml) + ApoTransferrin (5 mg/ml)

Tab.6: Verwendete NET-Zelllinien und dazugehörige Nährmedien

Zellviabilitäts-Assay

Für die Zellviabilitäts-Versuche wurden die Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät. Dabei wurden die verschiedenen Zelllinien abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit in unterschiedlichen Mengen überführt, um vor dem Versuchsbeginn auf allen Platten eine annähernd gleiche Zelldichte zu erreichen [BON1 - 3000 Zellen/ Well, CM – 2500 Zellen/ Well, NCI-H727 – 4500 Zellen/ Well, GOT1 – 0,5 Mio Zellen/ Well]. Die Zellen wurden daraufhin für 24 Stunden herangezüchtet. Danach wurde das jeweilige Medium durch Serum-reiches Medium (10% FKS) frei von Penicillin/ Streptomycin und AmphotericinB ersetzt. Dieses enthielt ansteigenden Konzentrationen von RAD001 (10-100-1000-10000 nM), NVP-BEZ235 (10-100-1000-10000 nM), NVP-AEW541 (0,1-1-10-100 µM) und RAF265 (0,1-1-10-100 µM). Die Zellproliferationsrate wurde nach 24 bzw. 72 Stunden mittels des Cell Titer 96 Kit entsprechend der Herstellerinstruktionen bestimmt. Dazu wurden 2 µl des Cell Titer 96 Kit in jedes Well gegeben und dieses für drei Stunden damit inkubiert. Im Anschluss wurde die Extinktion bei 492 nm im Photometer Sunrise RC Remonte Control gemessen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden diese Versuche in Kombination der Inhibitoren mit TRAIL wiederholt. Dazu wurde die NET-Zellen analog ausgesät und herangezüchtet und nach 24 Stunden das Medium ersetzt. In diesem Fall wurde den verschiedenen Konzentrationen von RAD001, NVP-BEZ235, RAF265 und NVP-AEW541 je 10 ng/ ml TRAIL hinzugefügt. Auch diese Versuchsreihen wurden nach 24 bzw. 72 Stunden mit dem Cell Titer 96 Kit inkubiert und die Proliferationsrate bei einer Extinktion von 492 nm im Photometer bestimmt.

Kristallviolett-Färbung

Um die in den Zellviabilitäts-Versuchen gemessenen Effekte auf die Zellzahl zu visualisieren, wurden die Platten der Versuche mit Kristallviolett eingefärbt. Dazu wurden die Zellen innerhalb von 20 Minuten mit 4% Paraformaldehyd fixiert und danach mit 0.05% Kristallviolett, gelöst in destilliertem Wasser, 30 Minuten lang angefärbt. Nach zweimaligem Waschen der Platten wurden diese fotografiert. Die Versuchsreihen, in denen die Inhibitoren mit TRAIL kombiniert worden sind, wurden analog angefärbt.

Höchst-Färbung

Zur morphologischen Beurteilung der Chromatinkondensation und der DNA-Fragmentierung wurden die behandelten Zellen innerhalb von 20 Minuten mit 4%-Paraformaldehyd auf den Platten fixiert. Daraufhin wurden sie mit PBS gewaschen und mittels 250 µg/ ml Hoechst 33258, in PBS gelöst, innerhalb einer Stunde angefärbt und schließlich mittels Fluoreszenzmikroskopie begutachtet.

Messung der VEGF-Sekretion

Es sollte der Einfluss von RAD001, NVP-BEZ235, RAF265 und NVP-AEW541 auf die VEGF-Sekretion analysiert werden. Dazu wurden die Überstände der Zellviabilitäts-Assays ausgewertet. Dies erfolgte mit Hilfe des DuoSet Elisa Development kit „human VEGF“ (R&D Systems, DY293B). Der Proliferationsassay wurde entsprechend der Versuchsanleitung durchgeführt. Daraufhin wurden je 50 µl der jeweiligen Probe auf eine ELISA-Platte (Luminunc, Nunc, 436110) überführt, deren Wells mit VEGF-Capture-Antikörper beschichtet waren. Nach Zugabe von 50 µl Reagent Diluent (R&D Systems, DY995) wurden diese Platten mit Folie bedeckt und für zwei Stunden inkubiert. Danach erfolgte das Absaugen und Waschen der Platten und die Zugabe von 100 µl Detection Antikörper. Nach erneuter Inkubation von zwei Stunden, wurden die Platten abgesaugt, gewaschen und 100 µl der Working Solution, welche mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Streptavidin (Streptavidin-HRP, R&D Systems, DY293B) enthielt, hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation über 20 Minuten und die Platte wurde erneut gewaschen. Die Intensität der gebundenen Meerrettich-Peroxidase wurde durch Inkubation mit 50 µl SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (PIERCE, 37075) nachgewiesen und in einem Orion-II-Microplate-Luminometer gemessen.

Proteinextraktion und Western Blot-Analyse

Proteinextraktion: Um die antiproliferative Wirkung der untersuchten Inhibitoren auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die NET-Zelllinien auf 6-Well-Platten ausgezählt. Die dabei verwendete Anzahl der Zellen wurde erneut an die Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie angepasst, um nach 24 Stunden eine einheitliche Dichte zu erhalten [BON1-Zellen 0,4 Mio. Zellen/ Well, CM-Zellen 0,35 Mio. Zellen/ Well, NCI-H737-Zellen 0,5 Mio. Zellen/ Well und GOT1-Zellen 1 Mio.Zellen/ Well]. Nach 24 Stunden Wachstum wurde das Medium durch Serum-reiches Medium (10% FKS) ohne Penicillin/ Streptomycin bzw. AmphotericinB ersetzt. Dieses enthielt die bereits bekannten Konzentrationen von RAD001, NVP-BEZ235, RAF265 und NVP-AEW54. Die Zellen wurden daraufhin für 2, 8 bzw. 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium aus den Wells in Eppendorfgefäße überführt und bei 4000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Entfernen des Überstands mit 50 µl Lysispuffer bedeckt. Parallel dazu wurden die Platten ebenfalls mit PBS gewaschen und danach mit 150 µl Lysispuffer bedeckt. Sowohl die Überstände in den Eppendorfgefäßen als auch die Platten wurden über

Nacht bei - 40°C aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben aufgetaut, die Zellen mit Zellschabern von den Platten gekratzt und in die dazugehörigen Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden dann bei 13000 g für 10 Minuten zentrifugiert. In Folge wurden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford (BioRad GmbH, Deutschland) bestimmt und es erfolgte ein Proteinkonzentrations-Ausgleich mittels Lysispuffer.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western blot: Die Proben aus der Proteinextraktion wurden mit einem denaturierenden SDS-Probenpuffer 1:4 versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden 50-70µl des Protein-Puffer-Gemisch, welches 5-20µg Protein enthielt, in die Taschen eines Polyacrylamid-Gels (T= 10%, T= 12%, T= 15%; Acrylamidkonzentration (T) entsprechend den zu untersuchenden Proteinmolekulargewichtsmassen) geladen und bei 50 mA / 200 V nach dem relativen Molekulargewicht aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Precision Plus ProteinTM Standard Dual Colors eingesetzt. Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine innerhalb von 60 Minuten mittels eines Semi-Dry-Blotters auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und damit immobilisiert. Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen und für 30 Minuten in einem Milchpulver-TBS-T-Puffer geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei Raumtemperatur dem jeweiligen Erstantikörper ausgesetzt (siehe Tabelle 7). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal je 10 Minuten lang auf einem Rotationsschüttler gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit einem Zweitantikörper (siehe Tabelle 8) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran erneut gründlich gewaschen und es erfolgte die Detektion der Peroxidase-Aktivität des Zweitantikörpers. Dazu wurde die Membran 15 Minuten lang mit dem Super-Signal-West-Dura-Chemolumineszenz-Substrat benetzt und im Anschluss die dabei entstehende Chemolumineszenz auf dem FUJI Medical-X-Ray-Film festgehalten. Dieser wurde in einer AGFA Curix60 entwickelt. Die PVDF-Membranen wurden mit dem RestoreTM Plus Western Blot Stripping Buffer „gestrippt“, wobei die Antikörper von der Membran abgelöst wurden. Nach gründlichem Waschen wurde die soeben beschriebene Vorgehensweise mit weiteren Erstantikörpern wiederholt.

Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-pAkt (Ser 473), # 9271	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:5000
Anti-pAkt (Thr 308), #4055	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000
Anti-Akt, # 9272	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:5000
Anti-pp70S6K (Thr 389), # 9243	Cell Signaling Technology Inc., MA, USA	1:2000
Anti-p70S6K, #9202	Cell Signaling Technology Inc., MA, USA	1:1000
Anti-pERK1/2, #9101	Cell Signaling Technology Inc., MA, USA	1:20000
Anti-ERK1/2, #9102	Cell Signaling Technology Inc., MA, USA	1:2000
Anti-FLIPs, #3210	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000
Anti-Caspase 8, AF 1650	R&D Systems, MN, USA	1:10000
Anti-Bcl-2, 610539	BD Biosciences, CA, USA	1:1000
Anti-Bcl-XL, #2762	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:2000
Anti-cleaved Caspase 9 (Asp 330), # 9501	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:2000
Anti-Caspase 9, #9502	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000
Anti-Bid, BD 6111528	BD Biosciences, CA, USA	1:1000
Anti-PARP, #9542	Cell Signaling Technology Inc., MA, USA	1:1000
Anti-cleaved Caspase 3 (Asp 175), # 9661	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000
Anti-Caspase 3, # 9662	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000
Anti-Actin β , 20272	Abcam Inc., MA, USA	1:100000

Tab. 7: Verwendete Erstantikörper

Sekundärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Meerrettich Peroxidase konjugierter Zweitantikörper – Maus, #31432	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland	1:25000
Meerrettich Peroxidase konjugierter Zweitantikörper – Kaninchen, #31452	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland	1:25000

Tab. 8: Verwendete Zweitantikörper

FACS-Analyse

Mittels Durchflusszytometrie wurde das Ausmaß der DNA-Fragmentation quantifiziert und die Effekte auf den Zellzyklus analysiert. Dabei kam die von Nicoletti I. et al. etablierte Versuchsanleitung zum Einsatz [Nicolletti I. et al., J Immunol Methods 1991]. Dazu wurden die Versuchsanordnungen, die bereits in den Zellviabilitäts-Versuchen und für die Western blot Analyse verwendet wurden, auf 12-Well-Platten übertragen. Die Zellen wurden erneut entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit ausgezählt [BON1-Zellen 0,1 Mio. Zellen/ Well, CM-Zellen 0,1 Mio. Zellen/ Well, NCI-H727-Zellen 0,25 Mio. Zellen/ Well und GOT1-Zellen 0,5 Mio. Zellen/ Well] und innerhalb von 24 Stunden herangezüchtet. Daraufhin wurde das Medium durch Serum-reiches Medium (10% FKS), welches frei von Penicillin/ Streptomycin und AmphotericinB war, ersetzt. Dieses enthielt jeweils die verschiedenen Konzentrationen von RAD001, NVP-BEZ235, RAF265 und NVP-AEW541. Die Zellen wurden für 24 Stunden damit behandelt und anschließend mit Zellschabern von den Platten abgekratzt, mit PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden im sogenannten Nicoletti-Puffer (hypotoner Puffer) aufbewahrt. Danach erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Es wurde ein FACSCalibur-Gerät und das CellQuest-Programm angewendet. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden Zellkerne links vom „G1-Gipfel“, welche hypodiploide DNA enthielten, als apoptotisch erachtet.

RNA- Isolation und reverse Transkriptions - PCR

Isolierung der Nukleinsäuren und reverse Transkription: Für die Nukleinsäuregewinnung wurden zunächst konfluente Zellrasen von BON1-, CM-, NCI-H727- und GOT1-Zellen aus einem Zellkulturgefäß extrahiert und das Kulturmedium durch Zentrifugation entfernt. Anschließend konnte mit Hilfe des Trizol Reagenz die RNA isoliert werden. Da die extrahierte RNA nicht direkt als Untersuchungsmaterial und Vorlage in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dienen kann, musste dem Amplifikationsschritt immer die reverse Transkription (RT) vorausgehen. Dabei wurde eine zur RNA komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) generiert. Diese Erststrangsynthese geschah mit Hilfe der M-MLV Reverse Transcriptase entsprechend der Herstellerinstruktionen.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Spezifische Genabschnitte der soeben gewonnen cDNA wurden mit Hilfe der GeneAmp PCR-System 2400-Maschine vermehrt. Dies geschah unter Zugabe der für den zu vermehrenden Genabschnitt spezifischer Primer. (siehe Tabelle 9). Außerdem wurde zu den spezifischen Primern das Enzym Taq-DNA-Polymerase zusammen mit dNTPs in PCR-Puffer und MgSo₄ hinzugefügt. Das PCR-Protokoll der GeneAmp PCR-System 2400-Maschine begann mit der Denaturierung der Doppelstränge über zweieinhalb Minuten bei 94°C, gefolgt von dem Anlagern der Primer an die Einzelstränge bei 61°C. Dadurch wurde der Startpunkt der Taq-Polymerase festgelegt und die 30 Vermehrungszyklen initiiert, die aus je einer Phaselänge von 30 s bei 72°C bestanden.

GEN	Primer-Sequenz	Hersteller
TRAIL-R1 (DR4)	Sense 5'-AGAGAGAAGTCCCTGCACCA-3' Antisense 5'- GTCACTCCAGGGCGTACAAT-3'	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
TRAIL-R2 (DR5)	Sense 5'-GCCTCATGGACAATGAGATAAAGGTGGCT-3' Antisense 5'CCAAATCTCAAAGTACGCACAAACGG-3'	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
GAPDH	Sense 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' Antisense 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'	Thermo Electron GmbH, Ulm, Deutschland

Tab. 9: Verwendete Primer

Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren: Zum qualitativen Nachweis wurde die in der PCR vermehrte DNA in 1%igen-Agarosegelen mit TBE-Laufpuffer elektrophoretisch bei einer Feldstärke von 80 mA nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Um die aufgetrennte DNA indirekt nachweisen zu können, wurden die Gele mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Angeregt durch UV-Strahlung ($\lambda = 254 \text{ nm}$) wird vom EtBr-Molekül sichtbares Licht ($\lambda = 590 \text{ nm}$) zurückgeworfen. An DNA gebundenes EtBr erzeugt eine deutlich stärkere Fluoreszenz, wodurch sich charakteristische Banden nachweisen lassen.

Extraktion und Sequenzierung der Banden: Im Anschluss erfolgte die Identifikation der entsprechenden Banden mittels Gelextraktion (QIAquick) nach Herstelleranleitung und anschließender Sequenzierung im Institut für Klinische Chemie im Klinikum Großhadern, München.

Statistik

Die statistische Analyse im ersten Abschnitt der Arbeit erfolgte mittels zweiseitigen t-Tests. Dabei wurde $p < 0.05$ als statistisch signifikant erachtet. Um die verschiedenen TRAIL-Dosierungen im Vergleich zu einer TRAIL-freien Kontrolle in Hinblick auf die Zellviabilität zu vergleichen (in Prozent zur Kontrolle), wurde Dunnett's t-Test eingesetzt. Mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden Synergismen bzw. Antagonismen zwischen den Inhibitoren und TRAIL in Hinblick auf die Zellviabilität berechnet (in Prozent zur Kontrolle). Dabei wurden folgende Faktoren berücksichtigt: Art der Substanz (Substanz alleine oder in Kombination mit TRAIL) und Dosis der Substanz. Trends in den Mitteln der Dosen wurden dabei mittels orthogonalen polynomialen Kontrasten modelliert. Das Vorliegen eines Synergismus einer bestimmte Substanzdosis und TRAIL wurde mittels F-Test ermittelt. Insgesamt wurden 16 Interaktionen zu einem Signifikanzniveau von 0.05 getestet, da die zweifaktorielle Varianzanalyse jeweilig für alle Kombinationen bestehend aus den Zelltypen (BON1, CM, NCI-H727 und GOT1) und den verwendeten Substanzen (RAD001, NVP-BEZ235, RAF265 und NVP-AEW54) durchgeführt worden ist. Da somit ein multiples Testproblem vorliegt, wurde die Familywise Error Rate (FWER) mit der Bonferroni-Holm-Methode kontrolliert. Die FWER ist definiert als die Wahrscheinlichkeit mindestens eine von allen betrachteten Nullhypothesen fälschlicherweise abzulehnen. Analog wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Bonferroni-Holm-Methode verwendet, um Synergismen zwischen Substanzen und TRAIL in Hinblick auf Apoptose festzustellen (in Prozent zur Kontrolle). Dies erfolgte für NCI-H727 und GOT1-

Zellen und die untersuchten Substanzen RAF265 und NVP-AEW541. Die erhobenen Endpunkte (Zellviabilität und Apoptose) wurden mit Potenzfunktion transformiert, um eine konstante Varianz der Residuen (Homoskedastizität) zu erhalten.

3. Ergebnisse

3.1. Teil I

3.1.1. Effekte von RAD001, NVP-BEZ235 und RAF265 auf die Viabilität von GEP-NET-Zellen

Es ist bekannt, dass der Entstehung und Progression von Karzinomen zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen zugrunde liegen. Mit der „Addiktionstheorie“ beschreibt Weinstein IB. et al. die Theorie, dass Krebszellen von einzelnen Veränderungen abhängig und somit angreifbar werden [Weinstein IB. et al., Cancer Res 2008]. In den vergangenen Jahren konnte diese Theorie in verschiedenen Studien bekräftigt werden. So liegt bei humanen Karzinomen häufig eine dauerhafte und gesteigerte Aktivierung von PI(3)K-AKT-mTOR vor, welche den Karzinomzellen häufig eine Resistenz gegenüber konventioneller Therapiestrategien verleiht. Diese Zellen reagieren empfindlich auf eine Inhibition von mTOR, es kommt zu einer verminderten Zellviabilität oder einer wiederhergestellten Empfindlichkeit gegenüber anderer antiproliferativer Therapien [Neshat MS. et al., Pract Natl Acad Sci 2001; Wendel HG. et al., Cancer Res 2006]. Dies spricht dafür weitere Versuche zu unternehmen die Viabilität von Karzinomen-Zellen durch Inhibition einzelner Schlüsselenzyme zu vermindern. Um zu untersuchen, ob diese Form der Behandlung auch in den untersuchten GEP-NET-Zellen angewendet werden könnte, wurde zunächst ein möglicher Angriffspunkt dieser Tumorzellen bestimmt. Vorab war bereits bekannt, dass BON1-Zellen eine konstitutive AKT-Phosphorylierung aufgrund einer autokrinen IGF-Schleife aufweisen [von Wichert G. et al., Cancer Res 2000]. Mittels Western Blot konnte eine ähnlich hohe AKT-Phosphorylierung bei NCI-H727 und GOT1-Zellen nachgewiesen werden. Außerdem wurden erhöhte Spiegel an phosphoryliertem ERK beobachtet. Dabei zeigten sich deutlich höhere Spiegel von pERK bei GOT1-Zellen im Vergleich zu BON1- und NCI-H727-Zellen (siehe Abb. 4). BON1-, GOT1- und NCI-H727-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des singulären mTORC1-Inhibitors RAD001, des dualen PI(3)K-/ mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235, und des RAF-Inhibitors RAF265 für je 24h und 72h inkubiert. Alle drei Inhibitoren senkten die Zellviabilität der drei NET-Zelllinien Dosis- und Zeit-abhängig (Abb. 3A-C). Dabei bestand kein Zusammenhang zwischen der basalen ERK-Phosphorylierung und der Empfindlichkeit gegenüber RAF265, denn die

beste Wirkung durch RAF-Inhibition wurde nicht in GOT1-, sondern in NCI-H727-Zellen erreicht (Abb. 3C). Außerdem erwies sich eine Behandlung mit NVP-BEZ235 effektiver als eine singuläre mTORC1-Inhibition mittels RAD001 (Abb. 3A-C). Eine ähnliche Beobachtung hatte zuvor bereits Serra V. et al. in einer Studie mit Mamma-CA-Zellen gemacht hat [Serra V. et al., Cancer Res 2008]. Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der Zellviabilitätsversuche auf einer verminderten metabolischen Aktivität der GEP-NET-Zellen beruhen, wurden die Zellen der Versuchsanordnung mit Kristallviolett angefärbt (Abb. 3D). Es wurde festgestellt, dass alle drei Inhibitoren die Anzahl vitaler Zellen reduzieren, was mit dem Ergebnis der Zellviabilitäts-Versuche korreliert.

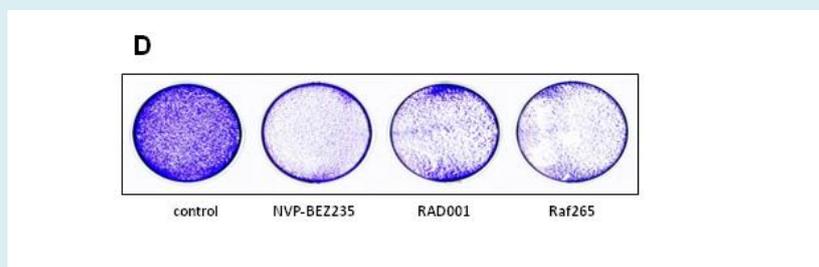
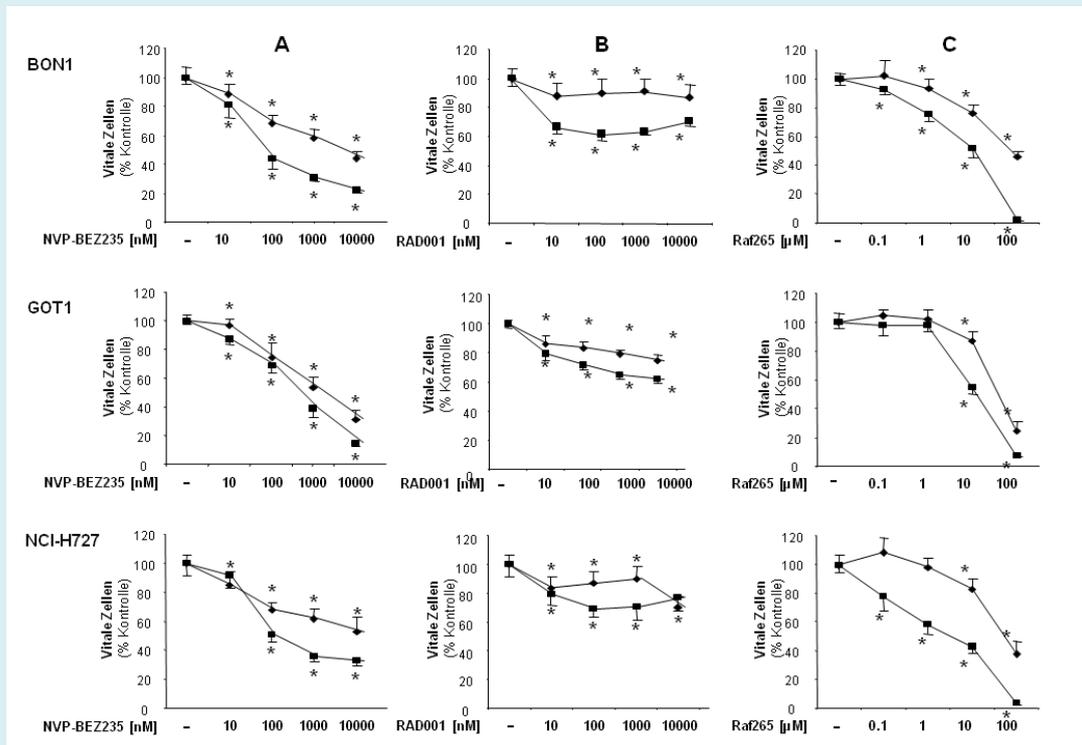


Abb.3: Eine Behandlung mit NVP-BE2235, RAD001 und RAF265 senkt die Zellviabilität von GEP-NET-Zellen Zeit und Dosisabhängig.

BON1-, GOT1- und NCI-H727-Zellen wurden mit oben angegebenen Konzentrationen von NVP-BE2235 **(A)**, RAD001 **(B)** und RAF265 **(C)** für 24 (◆) bzw. 72 (■) Stunden inkubiert. Die Zellviabilität wurde mittels des Cell Titer 96 kit (Promega) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen, n=6/ Gruppe für beide Versuchen und p < 0.05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

(D) NVP-BE2235, RAD001 und RAF265 vermindern die Anzahl vitaler Zellen.

Die Zellen wurden mit 100 nM NVP-BE2235, 100 nM RAD001 oder 10 µM RAF265 für 72 Stunden inkubiert. Die Zelldichte wurde mittels Kristallviolett-Färbung dargestellt.

3.1.2 Interaktionen und intrazelluläre Kompensationsmechanismen bei Inhibierung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK – Argumente für eine duale Inhibierung

Unterschiede einer Behandlung von GEP-NET-Zellen mit RAD001 und NVP-BEZ235

Die in unseren Versuchen beobachtete verminderte antiproliferative Wirkung der singulären mTOR Complex 1(mTORC1)-Inhibitors RAD001 verglichen zum dualen PI(3)K-/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 könnte auf einem bekannten Nebeneffekt der singulären mTORC1-Inhibition beruhen. Es kommt dabei zur Inhibierung einer negativen Rückkopplung zum PI(3)K-AKT-mTOR-Signalweg mittels p70S6K [O'Reilly KE.et al, Cancer Res 2006] und einer daraus resultierender Aktivierung von PI(3)K und AKT, was die antiproliferative Wirkung von singulären mTORC1-Inhibitoren schwächt. Daher scheint eine gleichzeitige Inhibierung von PI(3)K eine aussichtsreiche Strategie, um die Wirkung von mTORC1-Inhibitoren zu verbessern. Im Einklang mit dieser Überlegung zeigten die vorangegangenen Versuche eine überlegene Wirkung des dualen PI(3)K-/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 verglichen zum singulären mTORC1-Inhibitor RAD001. Die Inkubation der GEP-NET-Zellen mit RAD001 über eine Zeit von 2h bewirkte in allen drei GEP-NET-Zelllinien eine erhebliche AKT-Phosphorylierung an den Aminosäuren Ser473 und Thr308 (siehe Abb. 4A). Unter Verwendung von NVP-BEZ235 wurde diese Aktivierung von Akt in BON1 und GOT1-Zellen hingegen effektiv vermieden. In NCI-H727-Zellen wurde nur die AKT-Phosphorylierung an Ser473 verhindert, während die Induktion der Thr308-Phosphorylierung genauso stark ausfiel wie nach einer Inkubation der Zellen mit RAD001. Nach einer Inkubation mit RAD001 über 24 Stunden ging die AKT-Phosphorylierung an Ser473 in BON1- und GOT1-Zellen wieder bis oder sogar unter das Ausgangsniveau zurück, während sie in NCI-H727-Zellen unverändert erhöht blieb. Die Phosphorylierung an Thr308 zeigte hingegen in allen drei GEP-NET-Zelllinien weiterhin erhöhte Spiegel. Unter der gleichen Inkubationsdauer mit NVP-BEZ235 kam es in GOT1- und NCI-H727-Zellen zu einer Abnahme der Phosphorylierung an Ser473. Allerdings kam es auch hierbei in keiner der drei GEP-NET-Zelllinien zu einer Abnahme der Phosphorylierung an Thr308 (siehe Abb. 4A). Ein guter Parameter für die Aktivität von mTOR ist pp70S6K, eines der „targets“, über die mTOR seine Wirkung entfaltet. Daher wurde das Expressionsniveau von pp70S6K nach einer Behandlung der GEP-NET-Zellen mit RAD001 oder NVP-BEZ235 bestimmt. Unabhängig von der Inkubationsdauer bewirkten beide Inhibitoren eine Dephosphorylierung von p70S6K (siehe Abb. 4B).

Effekte von RAD001 und NVP-BEZ235 auf RAS-RAF-MEK-ERK

In einer aktuellen Studie von Carracedo A. et al. wurde eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK unter mTOR-Inhibition beobachtet [Carracedo A. et al., J Clin Invest 2008]. Man machte eine negative Rückkopplung zwischen PI(3)K-AKT-mTOR- und RAS-RAF-MEK-ERK für diesen Effekt verantwortlich. Es werden mittlerweile zahlreiche Verknüpfungen zwischen diesen beiden Signalwegen vermutet. Bei Inhibition bzw. Ausfall des einen Signalweges könnte es zu einer gesteigerten Aktivität des zweiten Signalweges kommen, wodurch das Fortbestehen und die Progression des Tumors gesichert wären. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine ähnliche Beobachtung gemacht werden. Man stellte bei mit RAD001 oder NVP-BEZ235 behandelten GEP-NET-Zellen leicht erhöhte Spiegel von aktiviertem ERK (pERK) fest. Diese Zunahme der ERK-Phosphorylierung war abhängig von der Inkubationsdauer und fiel in den verschiedenen GEP-NET-Zelllinien unterschiedlich stark aus (siehe Abb. 4B).

Effekte von RAF265 auf PI(3)K-AKT-mTOR

Daraufhin wurde die antiproliferative Wirkung des RAF-Inhibitors RAF265 ermittelt. Nach einer Inkubation der GEP-NET-Zellen mit RAF265 für zwei Stunden kam es in allen untersuchten Zelllinien zu einer Abnahme der ERK-Phosphorylierung. Diese erreichte nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden fast wieder ihr Ausgangsniveau (siehe Abb. 4B). Die zuvor beobachtete Umgehung einer mTOR-Inhibition mittels eines Anstiegs der ERK-Phosphorylierung führte zu der Frage, ob auch umgekehrt eine negative Rückkopplung zwischen PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK besteht. Das heißt, ob eine Inhibition von RAS-RAF-MEK-ERK kompensatorisch eine gesteigerte Aktivität von PI(3)K-AKT-mTOR hervorruft. Es wurden die Spiegel von pAKT unter einer Behandlung mit RAF265 bestimmt. Tatsächlich konnte eine gesteigerte AKT-Phosphorylierung beobachtet werden. Diese erfolgte sowohl an Ser743 als auch an Thr308. Dabei konnte keine gesteigerte Phosphorylierung von p70S6K nachgewiesen werden (siehe Abb. 4B).

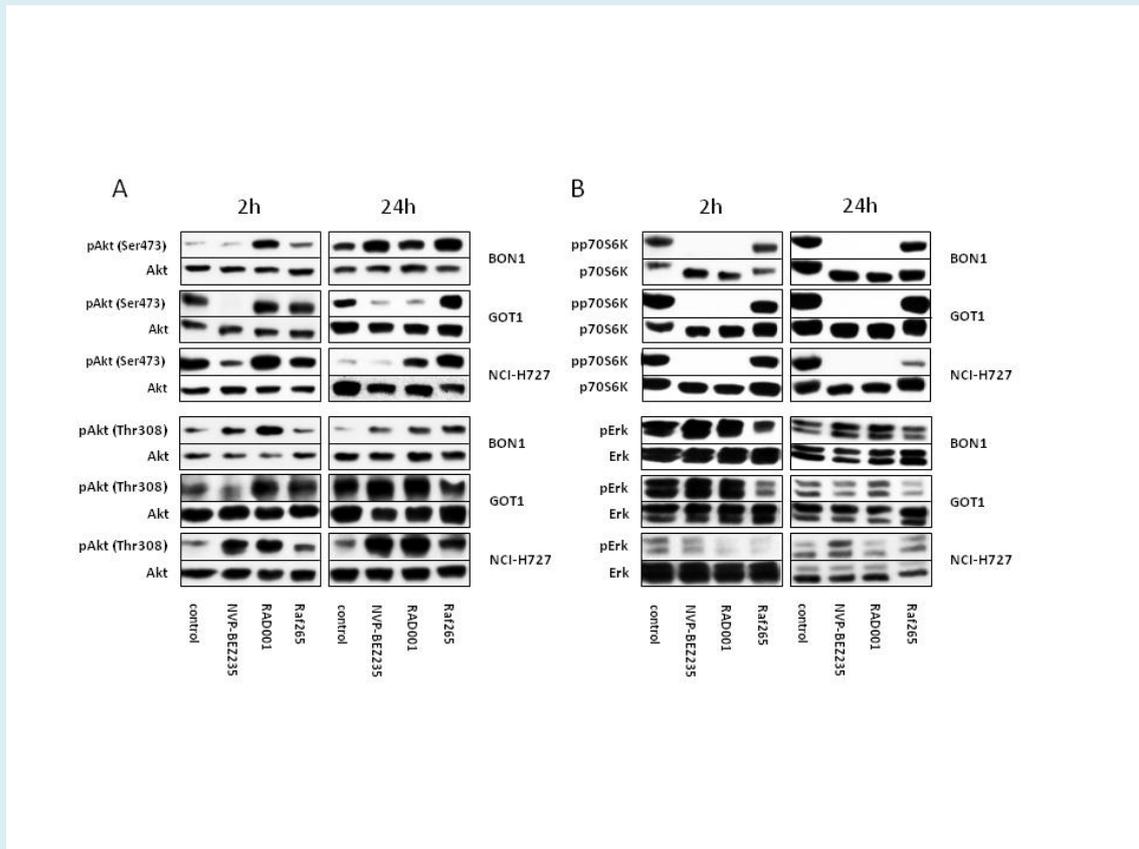


Abb.4: NVP-BEZ235 unterbindet die über negative Rückkopplung gesteuerte Aktivierung von AKT, welche bei Anwendung von RAD001 induziert wird.

Die Zellen wurden mit 100 nM NVP-BEZ235, 100 nM RAD001 oder 10 μ M RAF265 für 2 bzw. 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde die Proteinexpression von dem phosphorylierten und gesamten AKT, p70S6K (**A**) und ERK 1/2 (**B**) mittels einer Western Blot-Untersuchung bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen von drei repräsentativen Western Blots.

3.1.4. Effekte einer Inhibierung von PI(3)K-Akt-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK auf die VEGF-Sekretion in GEP-NET-Zellen

Bei GEP-NET handelt es sich um stark vaskularisierte Tumore [Zitzmann K. et al., Expert Rev Endocrinol Metab 2008]. Die tumorale Angiogenese wird durch die Expression und Sekretion Angiogenese-fördernder Zytokine sowie durch die gesteigerte Expression verschiedener Wachstumsrezeptoren im Tumorgewebe gesteuert. Ein wichtiger Faktor ist hierbei der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Die VEGF-Sekretion hängt vor allem vom Hypoxie-induzierenden Faktor 1α (HIF 1α) ab. Dessen Aktivierung wird sowohl durch PI(3)K-AKT-mTOR als auch RAS-RAF-MEK-ERK reguliert [Lim JH. et al., Oncogene 2004; Skinner HD. et al., J Biol Chem 2004]. Um die Transkription des VEGF-Gens zu initiieren, transloziert der aktivierte HIF- 1α in den Zellkern und bildet einen Komplex mit der konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF- 1β . Alternativ kann AKT die VEGF-Expression unabhängig von HIF 1α durch die Aktivierung von NF- κ B induzieren [Huang S. et al., Cancer Res 2000; Mizukami Y. et al., Clin Cancer Res 2007]. Daher sollte der Effekt von RAD001, NVP-BE235 und RAF265 auf die VEGF-Sekretion untersucht werden. Dazu wurde in den Überständen der vorangegangenen Versuche mit Hilfe des DuoSet Elisa Development kit „human VEGF“ die Spiegel des sezernierten VEGF bestimmt. Es konnte unter einer Behandlung mit NVP-BE235 und RAD001 eine signifikante Abnahme der absoluten VEGF-Spiegel im Medium der BON1- und GOT1-Zellen festgestellt werden. Es kam allerdings nur zu einer geringen Beeinflussung der relativen VEGF-Spiegel, die sich aus dem Quotienten des sezernierten VEGF und der Anzahl vitaler Zellen zusammensetzen (siehe Abb. 5A und B). Bei NCI-H727-Zellen induzierten beide mTOR-Inhibitoren eine mäßige VEGF-Sekretion. Unter einer Behandlung mit RAF265 wurde bei allen drei NET-Zelllinien jedoch eine massiv Freisetzung von VEGF festgestellt werden (siehe Abb. 5C).

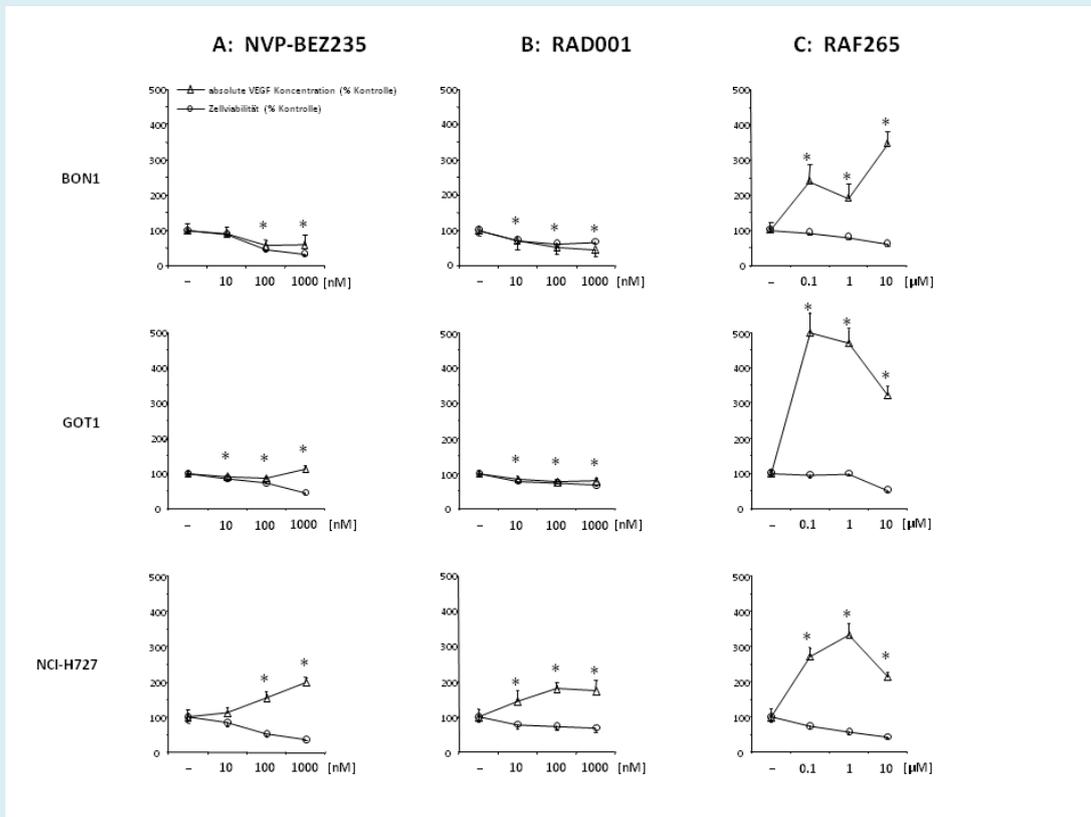


Abb.5: RAF265 induziert eine erhebliche VEGF-Sekretion.

Die Zellen wurden mit 100 nM NVP-BE235 **(A)**, 100 nM RAD001 **(B)** oder 10 µM RAF265 **(C)** für 72 Stunden inkubiert. Die Zellviabilität wurde mittels Cell Titer 96 kit (Promega) gemessen. Anschließend wurden die VEGF-Level in den Überständen bestimmt. Dazu wurde ein immunoluminometrischer Test (ILMA), welcher aus einem kommerziell erhältlichen ELISA Kit (R&D Systems) angepasst wurde, verwendet. Gezeigt werden die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus einem repräsentativen von 3 durchgeführten Experimenten

3.1.5. Zugrundeliegende Mechanismen der Effekte von RAD001, NVP-BEZ235 und RAF265 auf die Viabilität von GEP-NET-Zellen

Anschließend sollten die zugrundeliegenden Mechanismen der antiproliferativen und pro-apoptotischen Wirkung von RAD001, NVP-BEZ235 und RAF265 aufgeklärt werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie [Nicoletti I. et al., J Immunol Methods 1991] wurde das Ausmaß der Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest bestimmt. Unter allen drei Inhibitoren kam es Dosis-abhängig zu einem erhöhten Anteil von Zellen mit subG1-DNA-Inhalt (siehe Abb. 6A). Analog zu den Ergebnissen der Zellviabilitäts-Versuche, erreichte die durch RAD001-induzierte Apoptose (siehe Abb. 3B) ein Plateau bei einer Konzentration von 100 nM und konnte auch durch höhere Dosen nicht weiter gesteigert werden. Im Anschluss an eine Inkubation mit NVP-BEZ235, RAD001 und RAF265 wurden mittels HOECHST-Färbung ein Schrumpfen der NET-Zellen und eine Chromatin-Kondensation nachgewiesen (siehe Abb. 6B). Außerdem kam es unter allen Inhibitoren zu einer deutlichen Zunahme von Zellen in G0/G1-Phase, während jener in der S-Phase abnahm (siehe Abb.7A). Entsprechend beobachtete man in der Western Blot Analyse eine deutlich verminderte Expression von Cyclin D1 und D3 (siehe Abb.7B). Unter RAF265 nahm zusätzlich die Expression von Zellzyklus-inhibierenden Proteinen wie p21 Waf1/ Cip und p27kip1 zu (siehe Abb.7B).

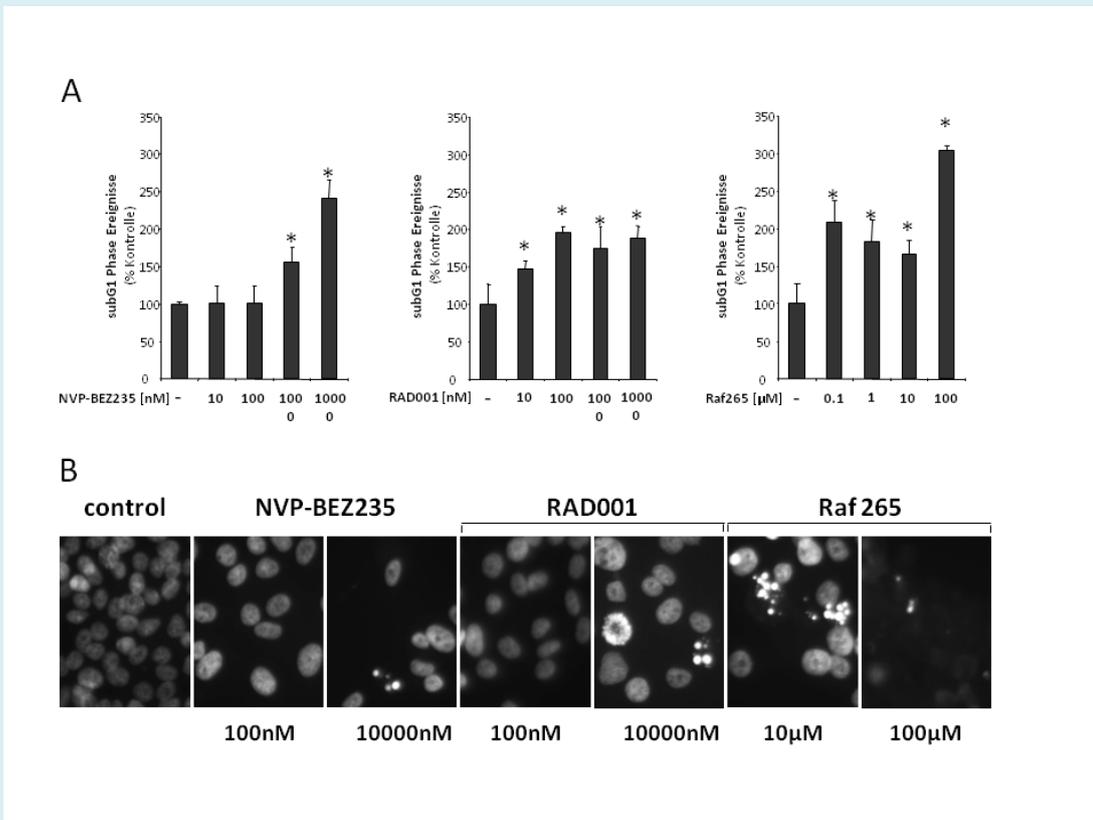


Abb. 6: Unter RAD001, NVP-BEZ235 und RAF265 kommt es zu Apoptose-Induktion und Chromatin Kondensation.

BON1-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von NVP-BEZ235, RAD001 und RAF265 für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde das Ausmaß der DNA-Fragmentierung und der Chromatin-Kondensation mittels der Durchflusszytometrie **(A)** und der Hoechst-Färbung **(B)** untersucht. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen (n= 3 je Gruppe für jeden Versuch). *, P < 0,05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

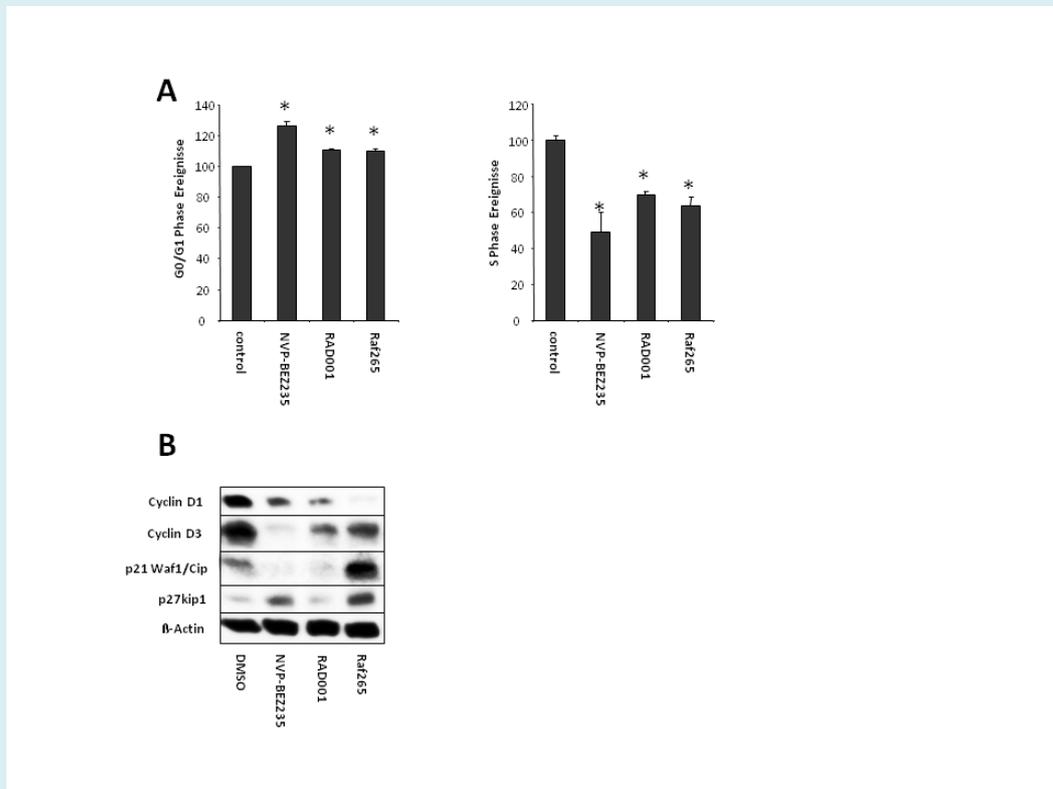


Abb. 7: Eine Therapie mit RAD001, NVP-BE2235 und RAF265 führt zu Zellzyklusarrest.

(A) BON1-Zellen wurden mit 100 nM NVP-BE2235, 100 nM RAD001 oder 10 μ M RAF265 für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der Zellen in G0/G1 bzw. S-Phase mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt (n= 3 je Gruppe für jeden Versuch). *, P < 0,05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

(B) Die Expression von Cyclin D1, Cyclin D3, p21Waf/ Cip und p27kip wurde mittels Western Blot ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei Durchgängen gezeigt.

3.1.6. Effekte von NVP-AEW541 auf AKT und ERK und auf die Zellproliferation

Die Gruppe um von Wichert G. hat gezeigt, dass IGF-1 in BON1-Zellen die Aktivität von PI(3)K, p70S6K und ERK2 fördert [von Wichert G. et al., Cancer Res 2000]. Damit stellte sich die Frage, ob PI(3)K-AKT-mTOR- und RAS-RAF-MEK-ERK durch IGFR-Inhibition gehemmt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde der IGFR-Inhibitor NVP-AEW541 eingesetzt und dessen Wirkung auf GEP-NET-Zellen untersucht. In BON1-, GOT1- und NCI-H727-Zellen kam es zu einer stark verminderten AKT- und ERK-Phosphorylierung (siehe Abb. 8A). Zusätzlich zeigte sich in GOT1- und NCI-H727-Zellen eine Abnahme der p70S6K-Phosphorylierung, während die Phosphorylierung von p70S6K in BON1-Zellen beinahe unverändert blieb (siehe Abb. 8A). Es wurden BON1-, GOT1- und NCI-H727-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von NVP-AEW541 für 24h bzw. 72h inkubiert. Bei der Auswertung zeigte sich eine Dosis-abhängige Abnahme der Zellviabilität in allen drei untersuchten NET-Zelllinien (siehe Abb. 8B).

3.1.7. Auswirkungen einer parallelen Hemmung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK

An diesem Punkt der Arbeit gab es bereits zahlreiche Hinweise auf die Existenz multipler kompensierender Rückkopplungsschleifen zwischen PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK. Daher war es von Interesse, ob deren parallele Inhibition mit verbesserten antiproliferativen Effekten einhergehen würde. Deshalb wurde je einen Inhibitor von PI(3)K-AKT-mTOR mit einem Inhibitor von RAS-RAF-MEK-ERK kombiniert. BON1-Zellen wurden mit einer Kombination aus NVP-BEZ235 und RAF265 oder RAD001 und RAF265 inkubiert. Ergänzte man NVP-BEZ235 oder RAD001 mit 1 μ M RAF265, so konnte die antiproliferative Wirkung der jeweiligen Einzelsubstanz nicht gesteigert werden (siehe Abb. 9A). Erst eine Ergänzung durch 10 μ M RAF265 führte zu einer additiven Steigerung der antitumoralen Effekte (siehe Abb. 9B).

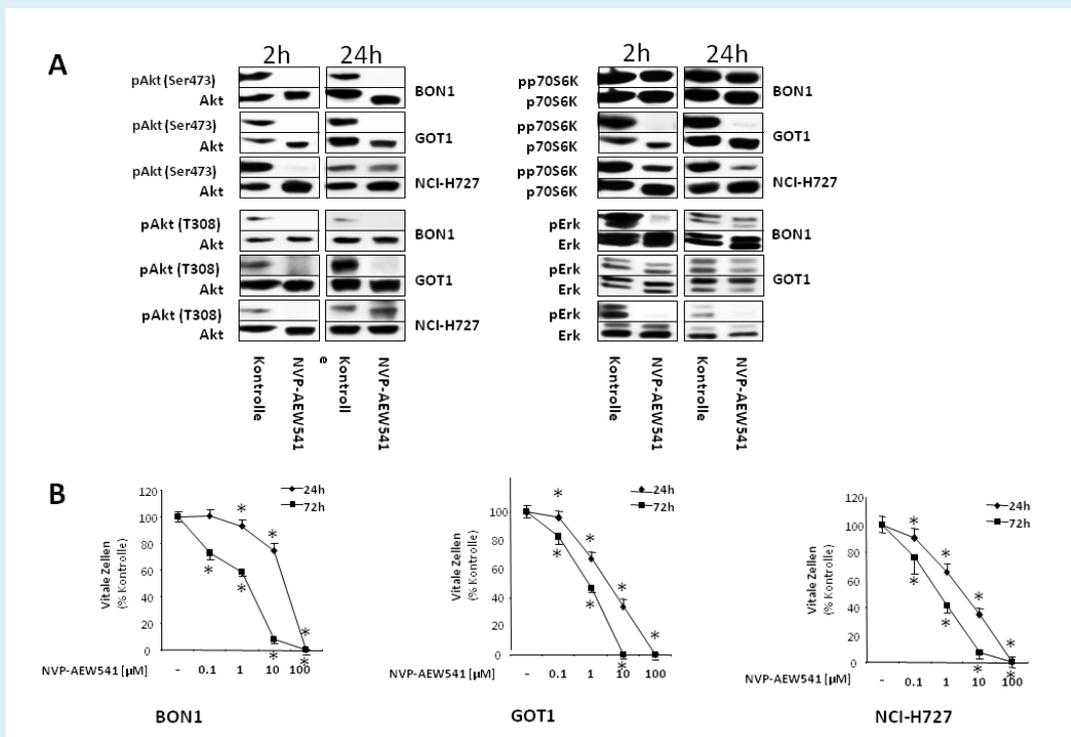


Abb. 8: Inhibition des IGFR mittels NVP-AEW541 führt zu einer Abnahme der Zellviabilität und zu einer Reduktion der AKT- und ERK-Phosphorylierung.

(A) BON1-, GOT1- und NCI-H727-Zellen wurden mit 1 μ M NVP-AEW541 für 2 bzw. 24 Stunden inkubiert. Danach wurde mittels Western Blot Analyse die Protein-Expression von phosphoryliertem und gesamtem AKT, p70S6K und ERK ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentativer aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Western Blots.

(B) BON1-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von NVP-AEW541 für 24 bzw. 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des Cell Titer 96 kit (Promega) bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ($n = 6$ je Gruppe für jedes Experiment).

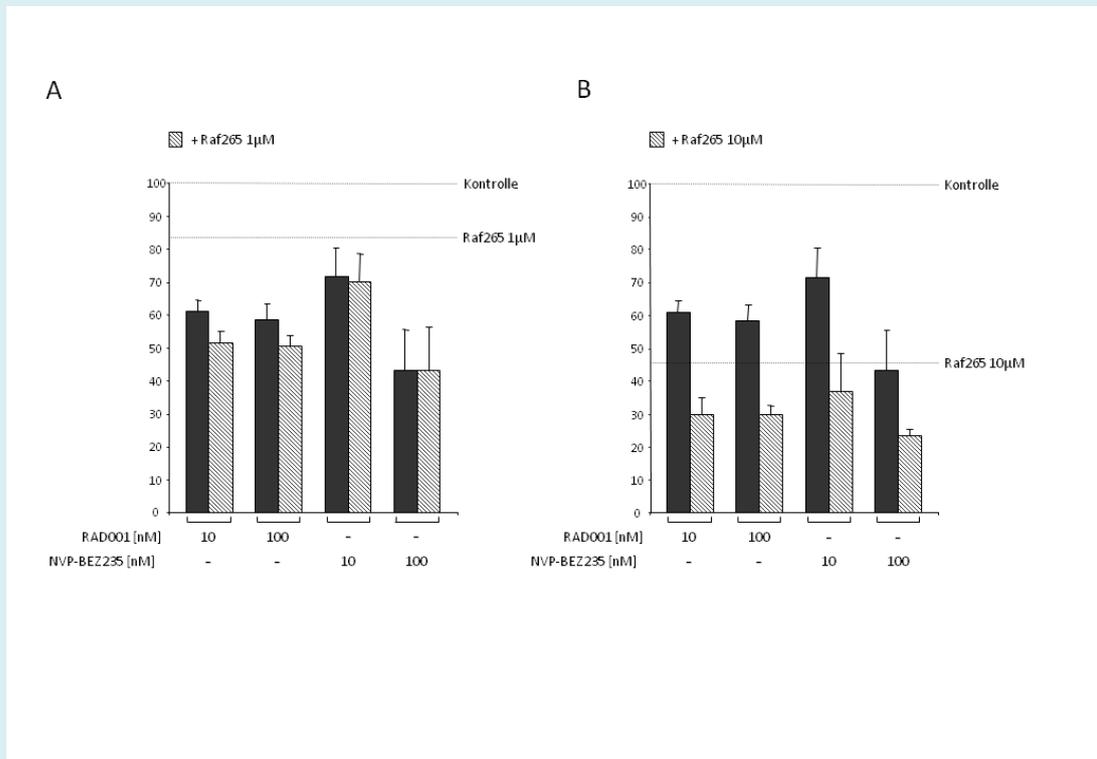


Abb.9: Die parallele Inhibition von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK ermöglicht eine additive Wirkverstärkung der antiproliferativen Therapie.

BON1-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von RAD001 und NVP-BE2235 alleine oder in Kombination mit 1 µM **(A)** oder 10 µM **(B)** RAF265 für 72h behandelt. Daraufhin wurde die Zellviabilität mittels Cell Titer 96 kit (Promega) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei unabhängig durchgeführten Versuchen (n= 6 je Gruppe für jeden Versuch).

3.2. Teil II

3.2.1. Expression von TRAIL-Rezeptoren in GEP-NET-Zellen

Bisher konnte keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Expression von TRAIL-Rezeptoren und der TRAIL-Sensitivität von Karzinomzellen festgestellt werden. In einer aktuellen Studie zur TRAIL-Resistenz in Glioblastom-Zellen zeigte sich, dass die Hypermethylierung des Promotors des TRAIL-Gens zu einer verminderten Expression des DR4 und damit zu einer TRAIL-Resistenz führt [Elias A. et al., Clin Cancer Res 2009]. Mittels RT-PCR wurde zunächst untersucht, ob die in der vorliegenden Arbeit verwendeten GEP-NET-Zelllinien (pankreatische BON1- und CM-, bronchiale NCI-H727 und Mitteldarm-GOT1-Zellen) die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 exprimieren. In allen untersuchten GEP-NET-Zellen konnte mRNA beider TRAIL-Rezeptoren nachgewiesen werden (siehe Abb. 10A). Die Spezifität der beiden Amplifikate wurde für alle vier Zelllinien durch eine vollständige Sequenzierung bestätigt.

3.2.2. Identifizierung von TRAIL-empfindlichen und TRAIL-resistenten GEP-NET-Zelllinien

Um die TRAIL-Sensitivität der GEP-NET-Zelllinien zu bestimmen, wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen von TRAIL inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Zellviabilität mit Hilfe des Cell Titer 96 Kit gemessen. Die GEP-NET-Zelllinien aus dem Pankreas (BON1 und CM) zeigten sich besonders empfindlich gegenüber TRAIL und reagierten bereits bei niedrigen Konzentrationen von 1 ng/ml mit einer erheblich verminderter Zellviabilität (siehe Abb. 10 B). Während die NCI-H727-Bronchus-Karzinoidzellen eine mäßige TRAIL-Empfindlichkeit bei Konzentrationen > 5ng/ml zeigten, waren die GOT1-Mitteldarm-Karzinoidzellen unempfindlich gegenüber allen in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen von TRAIL (siehe Abb. 10B).

3.2.3. Die TRAIL-Empfindlichkeit von GEP-NET-Zellen korreliert mit der Überexpression von FLIPs und Bcl-2 und niedrigen Caspase-8-Spiegeln

FLIPs, Caspase-8, Bcl-2 und Bcl-XL sind bekannte Modulatoren des TRAIL-Rezeptor-Signalwegs hinsichtlich der Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6, -7 und damit der Initiation von Apoptose (siehe Kapitel 1.6.2). In Folge wurde überprüft, ob einer dieser Modulatoren im Zusammenhang mit den verschiedenen Reaktionen der GEP-NET-Zellen auf TRAIL stehen könnte. Dazu wurden die Spiegel von FLIPs, Caspase-8, Bcl-2 und Bcl-XL in allen vier GEP-NET-Zelllinien bestimmt. Die gegenüber TRAIL unempfindlichen GOT1- bzw. mäßig empfindlichen NCI-H727- Zellen wiesen signifikant erhöhte Spiegel des anti-apoptotischen FLIPs und Bcl-2 verglichen zu den TRAIL-sensitiven BON1- und CM-Zellen auf (siehe Abb. 10C). Gleichzeitig zeigten die GOT1-Zellen die niedrigste Expression der pro-apoptotisch wirkenden Caspase-8 unter allen untersuchten GEP-NET-Zelllinien (siehe Abb. 10C).

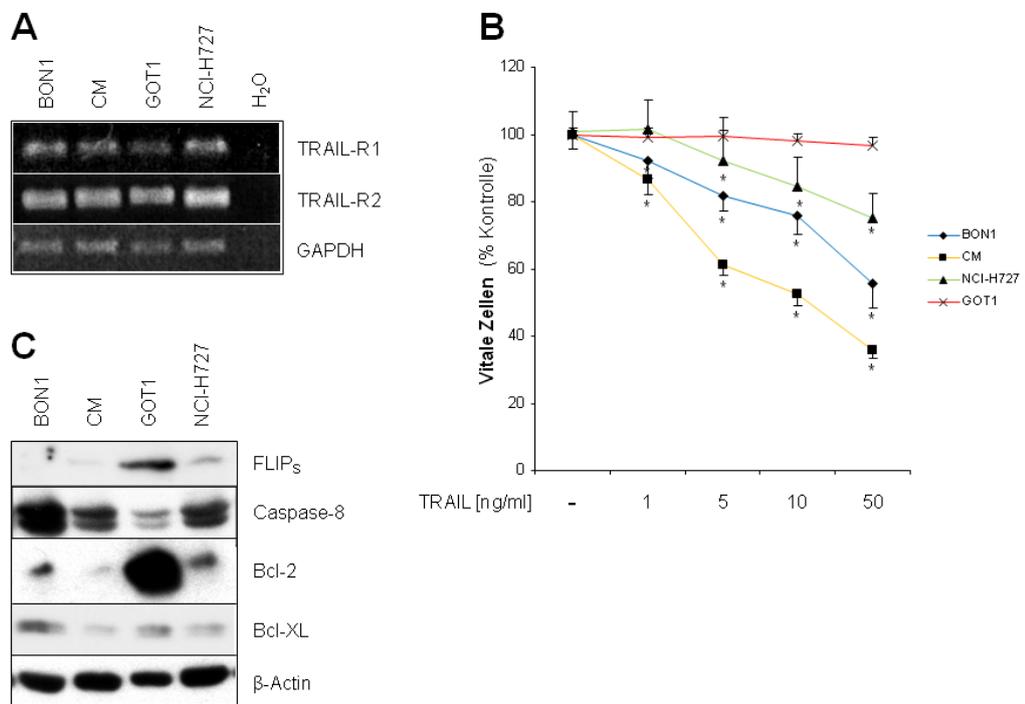


Abb. 10: Identifizierung TRAIL-empfindlicher und TRAIL-resistenter GEP-NET-Zelllinien.

(A) Die neuroendokrinen BON1-, CM-, GOT1- und NCI-H727-Zellen exprimieren DR4 und DR5. Die Expression der beiden Rezeptoren wurde mittels RT-PCR bestimmt. Die Spezifität der mittels RT-PCR nachgewiesenen Banden wurde durch deren Sequenzierung bestätigt.

(B) Die GEP-NET-Zellen wurden mit den angegebenen TRAIL-Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des Cell Titer 96 Kit (Promega) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen (n= 30 je Gruppe für jeden Versuch). *, P < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

(C) TRAIL-empfindliche und TRAIL-resistente GEP-NET-Zellen wurden mittels Western Blot auf ihre basale FLIPs-, Caspase-8-, Bcl-2- und Bcl-XL-Expression untersucht. Es ist ein repräsentativer aus drei unabhängig durchgeführten Western Blots dargestellt.

3.2.4. Wiederherstellung der TRAIL-Empfindlichkeit in GEP-NET-Zellen

Effekte einer PI(3)K-/ mTOR-Inhibierung auf die TRAIL-Empfindlichkeit von GEP-NET-Zellen

Einige Studien haben gezeigt, dass die Überaktivierung von mTOR eine TRAIL-Resistenz bedingt, welche durch die Anwendung von mTOR-Inhibitoren umgangen werden kann [Panner A. et al., Mol Cell Biol 2005]. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass RAD001 ein potenter mTORC1-Inhibitor in NET-Zellen ist (siehe Abb. 3B). Alle vier Zelllinien wurden daher mit 100 nM RAD001 behandelt, bevor TRAIL in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt wurde. Dieser Versuch sollte die Rolle von mTOR bei der TRAIL-induzierten Apoptose untersuchen und feststellen, ob man durch dessen Inhibition die TRAIL-Sensitivität steigern könnte. Unter einer Kombination von RAD001 und TRAIL wurden in den Tumorzelllinien jedoch weniger als additive Effekte auf Zellviabilität und SubG1-Ereignisse (siehe Abb. 11) erreicht. In Übereinstimmung damit, steigerte die zusätzliche Therapie mit RAD001 weder die Spaltung der Caspasen-8, -9 und -3, noch senkte sie die Expression von Bcl-2 und Bcl-XI verglichen zu einer alleinigen Gabe von TRAIL (siehe Abb. 13). In den vorangehenden Versuchen wurde unter mTORC1-Inhibition in BON1-, GOT1- und NCI-H727-Zellen eine negative Feedback-Aktivierung von AKT beobachtet. Mittels Anwendung des dualen PI(3)K-/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 konnte diese negative Rückkopplung vermieden werden und bessere antiproliferative Effekte erzielt werden. Deshalb wurde in Folge NVP-BEZ235 mit TRAIL kombiniert, in der Absicht dadurch wiederum die antiproliferative Wirkung zu steigern. Ebenso wie unter einer dualen Therapie mit RAD001 und TRAIL kam es jedoch auch bei dieser Kombination zu einer weniger als additiv verstärkten Wirkung auf Zellviabilität und DNA-Fragmentation (siehe Abb. 11). Es zeigte sich unter NVP-BEZ235 und TRAIL ebenso keine vermehrte Spaltung der Caspasen-8, -9 und -3, Bid und PARP (siehe Abb. 13A). Gleichzeitig kam es zu keiner Abnahme der Expression von Bcl-2 und Bcl-XL im Vergleich zur Monotherapie mit TRAIL.

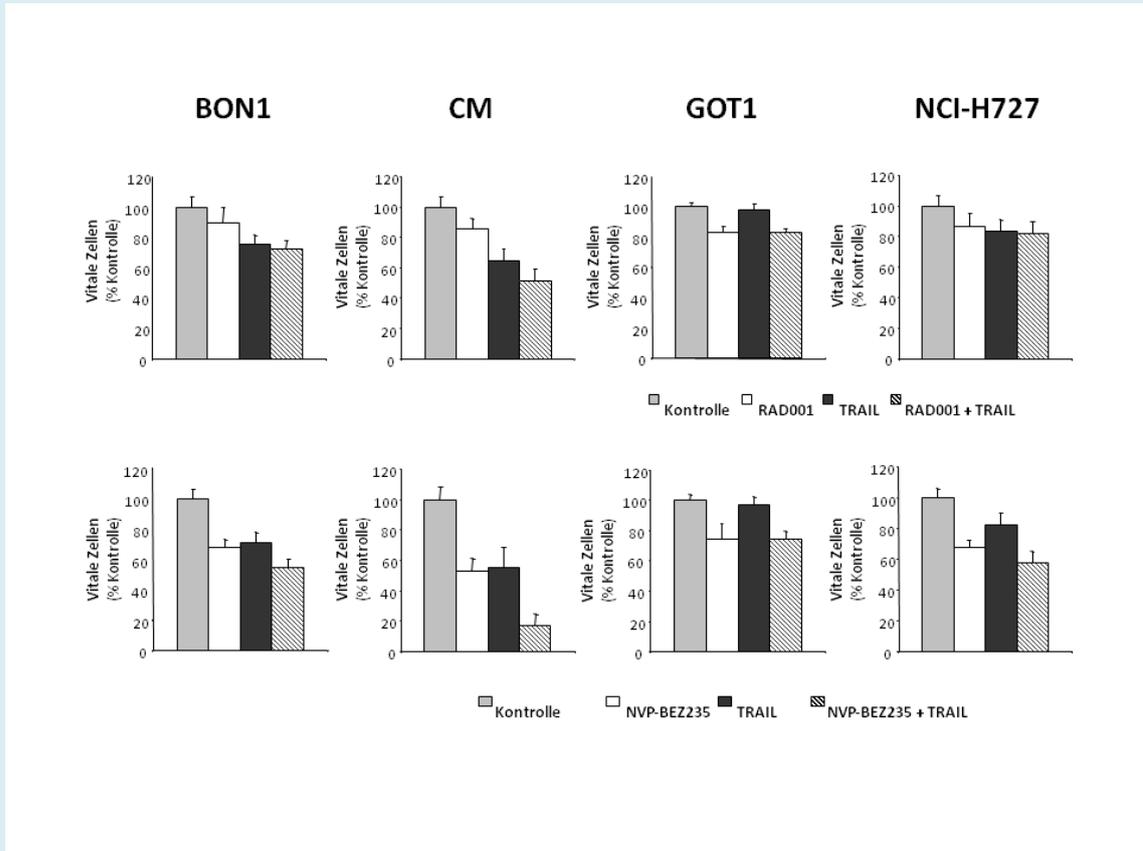


Abb. 11: Weder der mTOR-Inhibitor RAD001 noch der PI(3)K-/mTOR-Inhibitor NVP-BE2235 beeinflussen die TRAIL-Sensitivität.

Die GEP-NET-Zellen wurden mit 100 nM RAD001 oder mit 100 nM NVP-BE2235 alleine oder in Kombination mit 10 ng/ml TRAIL für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Zellviabilität mit dem Cell Titer 96 Kit (Promega) bestimmt. In der Abbildung werden die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt (n= 6 je Gruppe für jeden Versuch). *, P < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Auswirkungen einer IGFR-Inhibierung auf die TRAIL-Empfindlichkeit von GEP-NET-Zellen

Der IGFR spielt eine bedeutende Rolle als Vermittler der Aktivität von PI(3)K-AKT-mTOR in GEP-NET-Zellen. Wie bereits in einem früheren Abschnitt der Arbeit gezeigt, erzielt der IGFR-Inhibitor NVP-AEW541 gute antiproliferative Effekte in BON1-, GOT1- und NCI-H727-Zellen (siehe Abb. 8). Es wurde daher geprüft, ob die TRAIL-Sensitivität der GEP-NET-Zellen durch IGFR-Inhibierung positiv beeinflusst werden könnte. Wie in Abbildung 12 dargestellt steigerte eine vorangehende Behandlung mit NVP-AEW541 in NCI-H727-Zellen erheblich die Empfindlichkeit gegenüber TRAIL. Bei NCI-H727-Zellen konnte in der Western Blot Analyse eine verstärkte Spaltung von Caspase-9, Caspase-3 und PARP im Vergleich zur singulären Anwendung von TRAIL aufgezeigt werden (siehe Abb. 13A). Der Einfluss auf anti-apoptotisches Bcl-2 und Bcl-XL war hingegen nur schwach ausgeprägt (siehe Abb. 14). In BON1-, GOT1- und CM-Zellen wurden durch eine Kombination NVP-AEW541 und TRAIL hingegen weniger als additive Effekte erreicht.

Auswirkungen einer RAF-Inhibierung auf die TRAIL-Empfindlichkeit von GEP-NET-Zellen

Zusätzlich zu PI(3)K-AKT-mTOR aktiviert IGF-1 RAS-RAF-MEK-ERK. Durch die Inhibition von PI(3)K-AKT-mTOR durch den mTORC1-Inhibitor RAD001 und den PI(3)K-/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 konnte die TRAIL-Sensitivität in GEP-NET-Zellen nicht wiederhergestellt werden. Es stellte sich daher die Frage, ob der soeben beobachtete Anstieg der TRAIL-Sensitivität in NCI-H727-Zellen auf eine Inhibition von RAS-RAF-MEK-ERK zurückzuführen sein könnte. Es wurden daher die GEP-NET-Zellen mit dem RAF-Inhibitor RAF265 vor Zugabe von TRAIL behandelt. Es ergab sich dabei ein deutlicher Anstieg der TRAIL-Sensitivität in CM- und NCI-H727-Zellen (siehe Abb. 12). Wie in Abbildung 13 dargestellt bewirkte eine kombinierte Behandlung von NCI-H727-Zellen mit RAF265 und TRAIL eine vermehrte Spaltung von Caspase-9, Caspase-3 und PARP im Vergleich zu einer singulären TRAIL-Anwendung. Außerdem erhöhte eine Behandlung mit RAF265 die subG1-Ereignisse (siehe Abb. 13).

3.2.5. Zugrundeliegende Mechanismen des Synergismus von NVP-AEW541 bzw. RAF265 und TRAIL

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der synergistischen Effekte einer Kombination von NVP-AEW541 bzw. RAF265 mit TRAIL aufzudecken, wurden die Expressionsmuster von FLIPs, Bcl-2 und Bcl-XL im Western Blot untersucht. In den Zelllinien, bei denen RAF265 die Empfindlichkeit gegenüber TRAIL steigern konnte (CM- und NCI-H727-Zellen), wurde eine reduzierte Expression von Bcl-2 beobachtet (siehe Abb.14). Im Gegensatz dazu wurden die Bcl-2-Level durch NVP-AEW541 nicht beeinflusst (siehe Abb. 14). Jedoch konnte NVP-AEW541 in Kombination mit TRAIL die Bcl-2-Expression supprimieren. Weder unter einer Behandlung mit RAF265 noch mit NVP-AEW541 wurden signifikante Veränderungen der Expression von FLIPs oder Bcl-XL beobachtet (siehe Abb. 14).

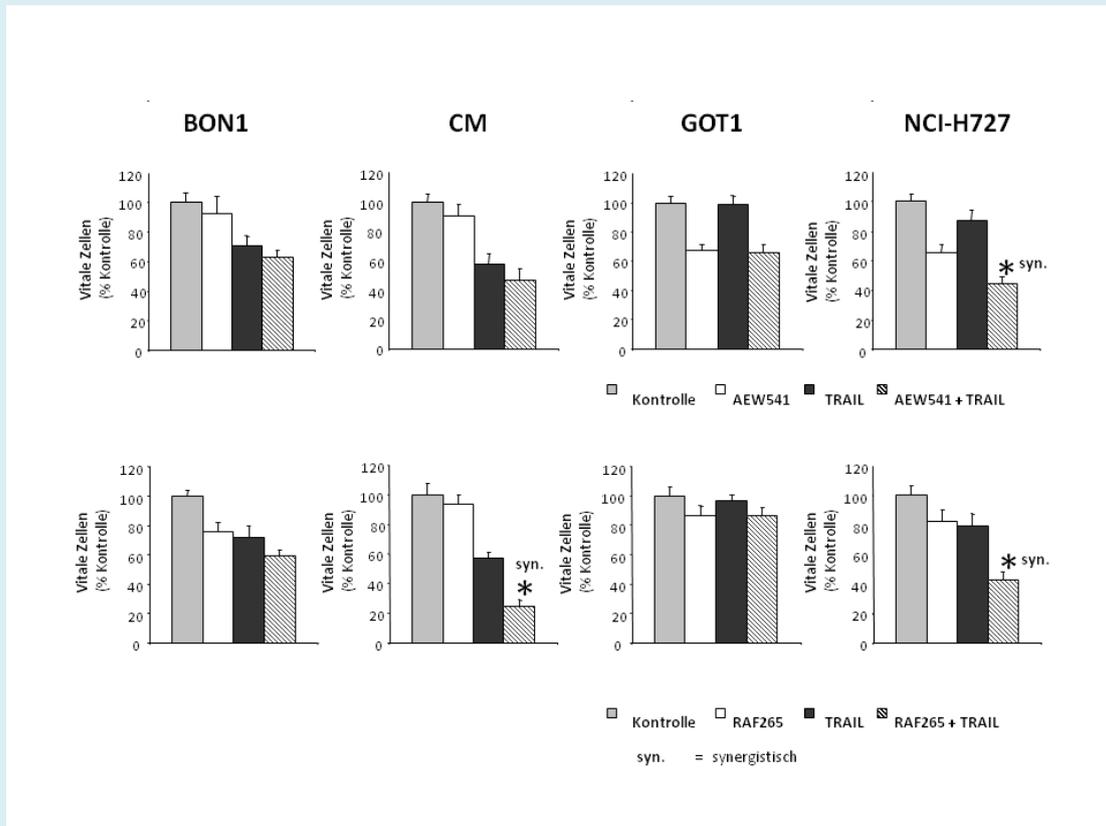


Abb. 12: Der IGFR-Inhibitor NVP-AEW-541 und der RAF-Inhibitor RAF265 steigern die TRAIL-Sensitivität von GEP-NET-Zellen.

Die GEP-NET-Zellen wurden mit 1 μ M NVP-AEW541 oder 10 μ M RAF265 alleine oder in Kombination mit 10 ng/ml TRAIL für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mit Cell Titer 96 Kit (Promega) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (n= 6 je Gruppe in jedem Versuch). *, P < 0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es konnte ein synergistischer Effekt bei der Kombination von NVP-AEW541 oder RAF265 mit TRAIL beobachtet werden.

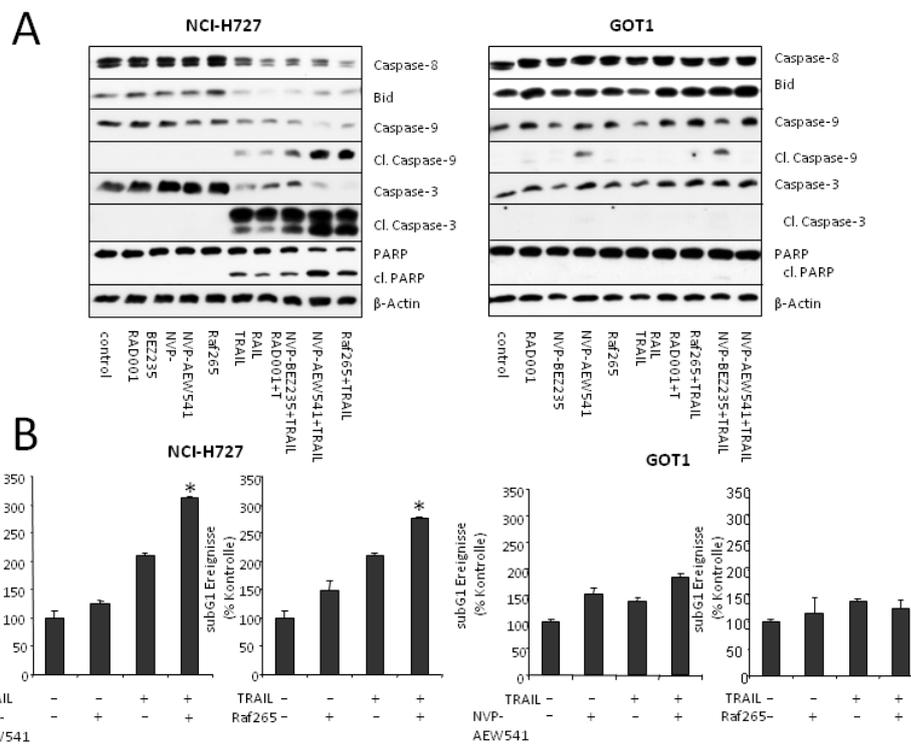


Abb. 13: Die Inhibition von IGFR oder RAF steigert die TRAIL-induzierte Apoptose in NCI-H727-Zellen, nicht aber in GOT1-Zellen.

NCI-H727- und GOT1-Zellen wurden mit 100 nM RAD001, 100 nM NVP-BE2235, 1 μ M NVP-AEW541 oder 10 μ M RAF265 alleine oder in Kombination mit 10 ng/ml TRAIL inkubiert. Nach 8 Stunden wurde mittels Western Blot die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine bestimmt (A). Dabei ist einer von drei repräsentativen Western Blots dargestellt. Nach 24 Stunden wurde das Ausmaß der DNA-Fragmentation mittels Durchflusszytometrie gemessen (B). Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei Versuchen (n= 3 je Gruppe in jedem Versuch).

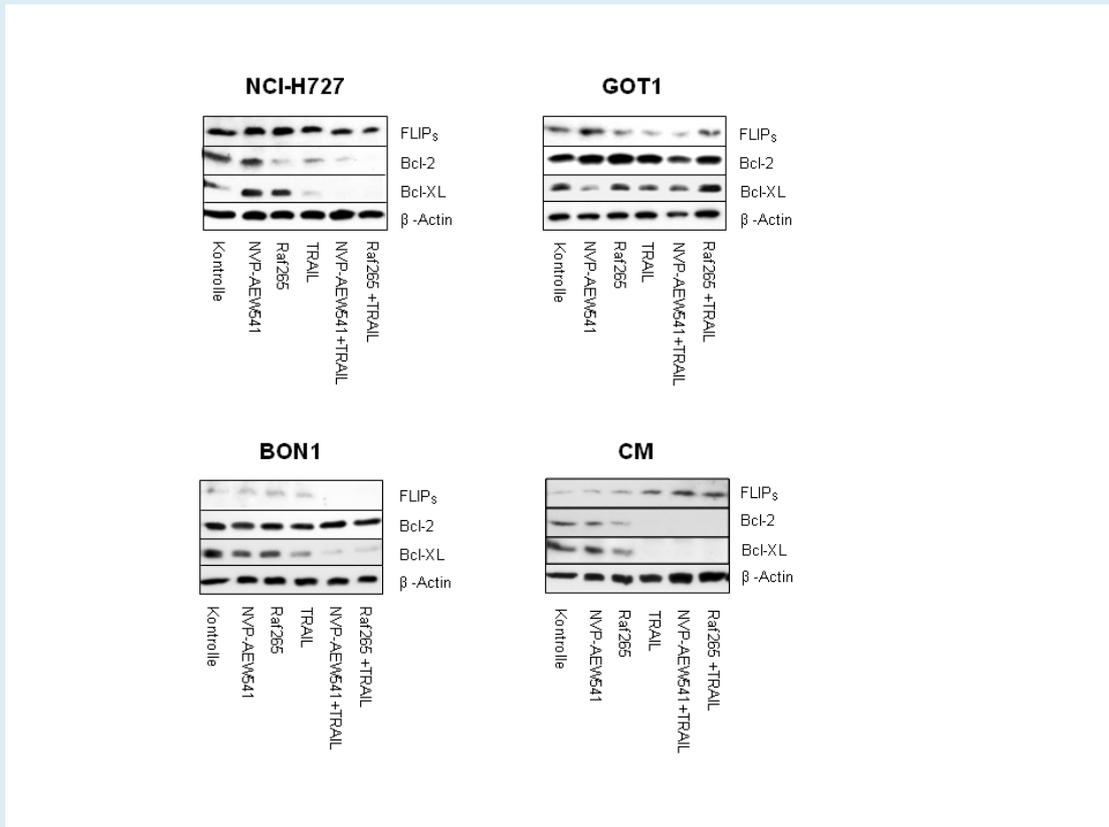


Abb. 14: NVP-AEW541 und RAF265 steigern die TRAIL-Sensitivität in Korrelation mit einer Bcl-2-Suppression.

Die GEP-NET-Zellen wurden für 8 Stunden mit 1 μ M NVP-AEW541 oder 10 μ M RAF265 alleine oder in Kombination mit 10 ng/ ml TRAIL inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot die Expression von FLIPs, Bcl-2 und Bcl-XL bestimmt. Für jede Zelllinie wird einer von drei repräsentativen Western Blots gezeigt.

4. Diskussion

4.1. Teil I

Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (NET-GEP) sind eine seltene und heterogene Tumorentität. Daraus ergeben sich zahlreiche Unterschiede in Klinik, Diagnostik und auch dem therapeutischen Vorgehen. Unter den verschiedenen Strategien bietet die vollständige Resektion des Tumors die einzige Möglichkeit zur Kuration. Diese Vorgehensweise ist aufgrund fortgeschrittener Krankheitsstadien oft nicht mehr möglich und es bleiben verschiedene therapeutische Mittel, um die klinischen Symptome, die durch eine hormonelle Hypersekretion bedingt sind, zu reduzieren. Diese sind allerdings häufig nicht in der Lage in der palliativen Situation die Tumorprogression aufzuhalten. Aus diesem Grund ist man darum bemüht neue Therapieoptionen zu entwickeln.

Weinstein IB. et al begründete die „onkogene Addiktionstheorie“, welche beinhaltet, dass Tumorzellen auf onkogene Signalwege angewiesen sind und besonders empfindlich auf die Inhibierung von Schlüsselpositionen dieser Signalwege reagieren [Weinstein IB. et al., Cancer Res 2008]. Diese Theorie befürwortet es, derartige onkogene Signalwege selektiv zu blockieren. PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK sind typische Beispiele für Überlebenssignalwege, die mit der Entstehung vieler Neoplasien, darunter auch der Entstehung von GEP-NET, in Verbindung gebracht werden. Um die konstitutive Aktivierung solcher Überlebenssignalwege zu unterbinden, wurden neuartige sogenannte „small-molecule“-Inhibitoren zur molekular zielgerichteten Therapie entwickelt. Diese zeigten bereits in verschiedenen Tumorentitäten sowohl *in vitro* und als auch *in vivo* antitumorales Potential.

In dieser Studie wurden verschiedene Proteinkinase-Inhibitoren von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK auf ihre antiproliferative und proapoptische Wirkung in humanen GEP-NET-Zelllinien aus Pankreas, Mitteldarm und Bronchus untersucht. Dabei handelte es sich um Inhibitoren von mTORC1 (RAD001), PI(3)K/mTOR (NVP-BEZ235), RAF (RAF265) und IGFR (NVP-AEW541) (siehe Abb. 15).

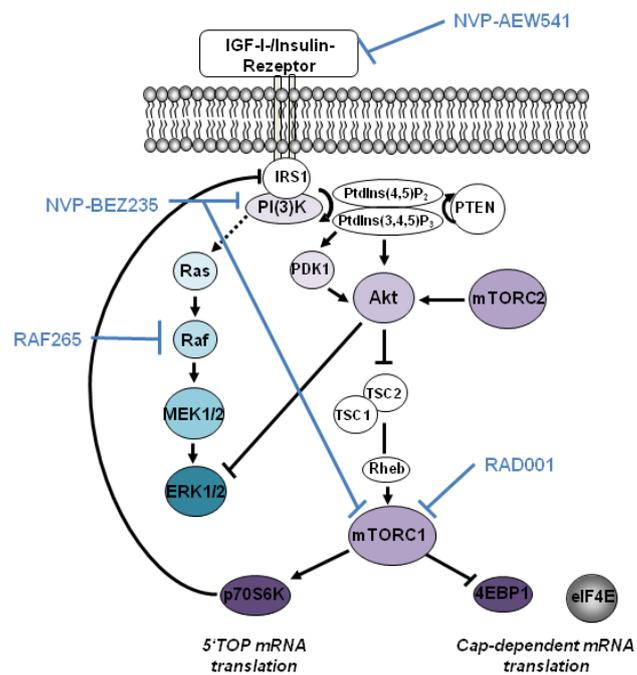


Abb.15: Schematische Darstellung der Angriffspunkte des mTOR-Inhibitors RAD001, des PI(3)K-/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235, des RAF-Inhibitors RAF265 und des IGFR-Inhibitors NVP-AEW542 auf PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren zeigten antiproliferative und proapoptotische Effekte. Das Ausmaß dieser Wirkungen war abhängig von der untersuchten Substanz, der verwendeten Substanzdosis und der Inkubationsdauer. Dabei konnte die Zellviabilität unter einer Behandlung mit NVP-BEZ235 und RAF265 durch Dosissteigerung immer weiter reduziert werden, während es zu einer Stabilisierung der Zellviabilität bei einer Inkubation mit RAD001 ab einer Dosis von 100nM kam. Bereits bei Untersuchungen an Brustkrebs-Zelllinien ist eine ähnliche Beobachtung gemacht worden, nämlich dass eine duale PI3K/mTOR-Inhibition mittels NVP-BEZ235 stärkere antiproliferative Effekte erzielt hatte als eine singuläre mTORC1-Inhibition durch RAD001 [Serra V. et al., Cancer Res 2008]. Um die zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken, wurden die NET-Zelllinien BON1, NCI-H727 und GOT1 mittels Western Blot auf Proteinebene genauer untersucht. Sie wiesen zu Beginn alle hohe Ausgangslevel von phosphoryliertem Akt auf. Sie reagierten dann deutlich empfindlicher auf eine Inkubation mit NVP-BEZ235 als auf eine Inkubation mit RAD001. Dies beruht vermutlich auf einer Umgehung der negativen Feedback-Aktivierung von Akt, welche ein bekannter Nebeneffekt der singulären mTORC1-Inhibition ist und als Ursache für die verminderte Effektivität einer Behandlung mit RAD001 gesehen wird [O'Reilly KE. et al., Cancer Res 2006]. Die Behandlung mit dem dualen Inhibitor NVP-BEZ235 führt neben einer Blockade von mTOR auch zu einer Hemmung von PI(3)K, wodurch konsequent die Akt-Phosphorylierung vermieden wird. Die Studie von Serra V. et al. hat gezeigt, dass die mTOR-inhibierende Wirkung von NVP-BEZ235 besonders in niedrigen Dosierungen auftritt, wohingegen bei Verwenden höherer Dosierungen eine PI(3)K-Inhibition auftritt und somit die Akt-Aktivierung verhindert werden kann [Serra V. et al., Cancer Res 2008]. Neben einer Behandlung mit NVP-BEZ235 oder RAD001 führte auch eine Inkubation mit RAF265 zu einer Akt-Phosphorylierung. Dieser Effekt tritt allerdings erst spät auf, möglicherweise zu spät, um die Zellen vor dem Untergang zu bewahren. Passend zu dieser Vermutung erreichte die antiproliferative Wirkung von RAF265 keine Plateau-Phase, sondern konnte mittels höherer Konzentrationen stetig gesteigert werden. Diese Beobachtungen befürworteten das Prinzip der vertikalen Inhibition von PI(3)K-AKT-mTOR, bei der mehrere Ebenen des Signalwegs gleichzeitig gehemmt werden, um somit eine stärkere Wirkung zu erzielen als durch selektive Blockade eines einzelnen Moleküls des Signalwegs.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten unter Anwendung der unterschiedlichen Inhibitoren verschiedene Interaktionen und intrazelluläre Kompensationsmechanismen zwischen PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK beobachtet werden. So kam es

nach einer Inkubation mit NVP-BEZ245 und RAD001 zu einer Zunahme der ERK-Phosphorylierung. Im Gegenzug bewirkte eine Behandlung der Zellen mit dem RAF-Inhibitor RAF265 eine gesteigerte AKT-Phosphorylierung. Diese Ergebnisse sprechen dafür neben der vertikalen Blockade von Signalwegen auch die horizontale Inhibierung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK näher zu untersuchen. Es wurden dazu die beiden Signalwege gleichzeitig inhibiert. Dies erfolgte erstens durch die Anwendung des IGFR-Inhibitors NVP-AEW541. Der IGFR ist ein bedeutender Rezeptor, welcher über IGF1/2 vermittelte Wachstumssignale von extrazellulär an PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK weiterleitet. Eine Inkubation mit NVP-AEW541 hatte eine starke Reduktion der AKT- und ERK-Phosphorylierung und damit der Zellproliferation zur Folge. Zweitens erfolgte die Kombination von Inhibitoren, die jeweils gegen einen der beiden Signalwege gerichtet sind. Dazu wurde der mTORC1-Inhibitor RAD001 bzw. der PI(3)K-/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 mit dem RAF-Inhibitor RAF265 kombiniert und die Zellen damit inkubiert. Tatsächlich zeigte sich in diesen Versuchen eine additive Zunahme der Effekte auf die GEP-NET-Zellviabilität ab einer Zugabe von 10µM RAF265.

Weitere Hinweise auf Rückkopplungs- und Umgehungsschleifen bei Inhibierung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK ergaben sich bei Untersuchungen zur VEGF-Sekretion. Bei GEP-NET handelt es sich um stark vaskularisierte Neoplasien. Die Angiogenese wird vor allem durch die gesteigerte Sekretion von VEGF und der vermehrten Expression von VEGFR vermittelt. Sowohl PI(3)K-AKT-mTOR als auch RAS-RAF-MEK-ERK1 sind beteiligt an der Regulation von VEGF und VEGFR [Lim JH. et al., *Oncogene* 2004; Skinner HD. et al., *J Biol Chem* 2004]. Diese Vermutung wird durch verschiedene Studien bekräftigt, in denen beispielsweise eine selektive Hemmung von B-Raf oder Raf-1 eine signifikante Abnahme der VEGF-vermittelten Angiogenese hervorgerufen hat [Meng F. et al., *Cancer Biol Ther* 2009; Galabova-Kovacs G. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurde nach einer Behandlung mit RAF265 allerdings ein starker Anstieg der VEGF-Sekretion in allen drei NET-Zelllinien beobachtet. Vermutlich waren diese erhöhten VEGF-Spiegel unter RAF265 nicht speziell auf die RAF-Inhibierung zurückzuführen. RAF265 ist nämlich nicht nur ein potenter Inhibitor der drei RAF-Isoformen und des mutierten B-RAF, sondern blockiert auch VEGFR2 [Stuart D. et al., *AACR Meeting Abstracts Online* 2008]. Verschiedene präklinische und klinische Studien berichteten von erhöhten VEGF-Spiegeln nach einer Behandlung mit dem dualen VEGFR2-/PDGR-Inhibitor Sunitinib oder nach Inkubation mit VEGFR2-spezifischen Antikörpern [Motzer RJ. et al., *J Clin Oncol* 2006; Ebos JM. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; Kerbel RS. et al., *N Engl J Med* 2008].

Möglicherweise basiert auch die aktuell beobachtete, gesteigerte VEGF-Sekretion auf der Fähigkeit von RAF265 den VEGFR zu blockieren. Bisher konnten die zugrundeliegenden Mechanismen, welche bei VEGFR-Inhibition zu einer vermehrten VEGF-Sekretion führen, nicht geklärt werden. Die meisten Erklärungen beziehen sich auf die Ganzkörper-Physiologie und lassen sich nicht auf *in vitro*-Bedingungen überführen [Bocci G. et al., Cancer Res 2004]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine negative Feedback-Aktivierung von Akt, welche unter VEGFR-Inhibition eine gesteigerte VEGF-Sekretion bewirkt. Eine aktuelle Studie an Patienten mit alveolären Weichteilsarkomen lässt ebenfalls vermuten, dass Akt während einer VEGFR-Inhibition eine kompensatorische Aktivierung alternativer Rezeptortyrosinkinasen und der dazugehörigen Überlebenssignalwege vermittelt. Unter einer Therapie dieser Patienten mit Sunitinib (VEGFR2-/PDGR-Inhibitor) beobachtete man nämlich eine Aktivierung von EGFR, PDGFR, HGFR und RET [Stacchiotti S. et al., Clin Cancer Res 2009]. Diese Vorstellung wird ebenfalls durch die Ergebnisse von Buck E. et al. gestützt. Hier wurde ein ähnlicher Mechanismus beschrieben, bei dem es unter Inhibition von EGFR oder IGF-IR jeweils zu einer Aktivierung des reziproken Rezeptors kam [Buck E. et al., Cancer Res 2008].

Um die exakten Mechanismen kompensatorischer Rückkopplungsschleifen zwischen PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK zu verstehen, werden weitere Studien auf diesem Gebiet benötigt.

4.2. Teil II

Die meisten onkologischen Therapien erzielen ihre Effekte primär durch eine Apoptose-Induktion in den Karzinom-Zellen. Als endogener Apoptose-Induktor, spielt der „Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)“ eine Schlüsselfigur in der Tumorkontrolle durch das Immunsystem. Zahlreiche Studien schlagen daher vor, dass exogen zugeführtes TRAIL enormes Potential in der Karzinom-Therapie haben könnte [Smyth MJ. et al., Immunity 2003]. Ein bedeutender Anteil der humanen Neoplasien wird jedoch als TRAIL-resistent erachtet. In der vorliegenden Studie wurde die TRAIL-Sensitivität von vier GEP-NET-Zelllinien heterogenen Ursprungs untersucht. Während Mitteldarmkarzinoid-Zellen (GOT1) resistent gegenüber proapoptotischen Wirkung von TRAIL waren, zeigten sich pankreatische BON1- und CM-Zellen sowie bronchiale NCI-H727-Zellen empfindlich und reagierten mit einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität nach einer Behandlung mit TRAIL-Konzentrationen zwischen 1-10 ng/ml (siehe Abb.10). Unter Einbeziehung bekannter Ursachen einer TRAIL-Resistenz beobachtete man bei GOT1-Zellen verglichen zu den übrigen NET-Zelllinien niedrige Caspase-8 und extrem hohe FLIPs und Bcl-2-Spiegel. In den vergangenen Jahren haben zahlreiche Studien die übermäßige Aktivierung von PI(3)K-AKT-mTOR mit einer Apoptose-Resistenz und einer ungünstigen klinischen Prognose in Zusammenhang gebracht. So ermöglicht die AKT-Phosphorylierung ein Entkommen einer durch t-BID-induzierten Apoptose, indem sie eine Zunahme anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und BCL-XL sowie eine Abnahme pro-apoptotischer Proteine wie Bax und Bak vermittelt [Majewski M. et al., Mol Cell Biol 2004]. Außerdem ist mTOR ein wichtiger Regulator der FLIPs-Translation [Panner A. et al., Mol Cell Biol 2005]. Im Einklang dazu konnte in zahlreichen Tumormodellen eine Wiederherstellung der Empfindlichkeit der Krebszellen gegenüber Apoptose-fördernder Signale - darunter auch TRAIL- unter Inhibition von PI(3)K, AKT und mTOR mit einer einhergehenden Abnahme von FLIPs, Bcl-2 oder Bcl-XL beobachtet werden [Opel D. et al., Cancer Res 2008; Zauli G. et al., J Cell Physiol 2005]. So konnte eine aktuelle Studie von Panner A. et al. einen Zusammenhang zwischen der TRAIL-Resistenz in Glioblastom-Zellen und einer mTOR-bedingten, gesteigerten FLIPs-Translation aufdecken. Eine mTORC1-Inhibition mittels Rapamycin führte konsekutiv zu einer Suppression der FLIPs-Expression und somit zur Umkehr der TRAIL-Resistenz [Panner A. et al., Mol Cell Biol 2005].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch eine Behandlung der GEP-NET-Zellen mit dem mTORC1-Inhibitor RAD001 allerdings keine Abnahme der FLIPs-Expression herbeigeführt werden. Und obwohl eine signifikante Abnahme der Expression von Bcl-2 und Bcl-XL erreicht wurde, gelang es nicht NCI-H727-Zellen mittels RAD001 gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose zu sensibilisieren. Jedoch ist bekannt, dass eine singuläre mTOR-Inhibierung zu einer negativen Feedback-Aktivierung von Akt führt; dieses wiederum spielt eine entscheidende Rolle bei Regulation der Proteine aus der Bcl-2-Familie. In einigen Studien konnten hingegen bedeutende TRAIL-sensibilisierende Effekte unter einer Behandlung mit PI(3)K-Inhibitoren nachgewiesen werden. Opel D. et al. demonstrierte, dass eine mTOR-Inhibition im Gegensatz zur PI(3)K-Inhibition keinen Einfluss auf die TRAIL-Empfindlichkeit von Glioblastom-Zellen hat [Opel D. et al., Cancer Res 2008]. Diese beobachteten Effekte wurden daraufhin in den GEP-NET-Zellen durch eine kombinierte Behandlung aus dem PI(3)K-/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 mit TRAIL überprüft. Bereits zu Beginn der vorliegenden Arbeit konnte durch den dualen PI(3)K-/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 eine negative Feedback-Aktivierung von Akt vermieden werden, welche hingegen im Rahmen einer singulären mTOR-Inhibierung für gewöhnlich auftritt (siehe Kapitel 2.1.) Zusätzlich verminderte NVP-BEZ235 erheblich die Akt-Phosphorylierung an Ser473 und Thr308 in GOT1-Zellen. Jedoch konnte trotz signifikanter Abnahme der Bcl-2- und Bcl-XL-Expression durch eine Kombination mit NVP-BEZ235 weder in GOT1- noch in den übrigen untersuchten GEP-NET-Zellen die Empfindlichkeit gegenüber TRAIL wiederhergestellt werden.

IGF-1 ist ein wichtiger Regulator der PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK-Aktivität in NET-Zellen [v. Wichert G. et al., Cancer Res 2000]. Es ist bekannt, dass eine Überaktivierung dieser Signalwege durch verschiedene Interaktionen mit dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg zu einer Umgehung der Apoptose führt. An einer früheren Stelle dieser Arbeit konnte durch eine Behandlung der GEP-NET-Zellen mit dem selektiven IGFR-Inhibitor NVP-AEW541 eine deutliche Aktivitätshemmung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK erzielt werden. Dies erfolgte mittels Apoptose-Induktion und Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase. Deshalb wurde anschließend untersucht, inwieweit NVP-AEW541 die TRAIL-Empfindlichkeit wiederherstellen kann. Dabei konnten stark synergistische Effekte einer dualen Behandlung mit NVP-AEW541 und TRAIL in den humanen Bronchuskarzinoidzellen (NCI-H727) gezeigt werden. Somit erreichte die duale Hemmung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK in Kombination mit TRAIL deutlich bessere Ergebnisse als die singuläre Inhibition von PI(3)K-AKT-mTOR durch

RAD001 oder NVP-BEZ235 in Kombination mit TRAIL. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob diese verbesserte TRAIL-Empfindlichkeit auf die Inhibition des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs zurück zu führen sein könnte. Die GEP-NET-Zellen wurden mit einer Kombination aus dem selektiven RAF-Inhibitor RAF265 und TRAIL inkubiert. Erstaunlicherweise zeigte sich unter der selektiven Inhibition von RAS-RAF-MEK-ERK in Kombination mit TRAIL ein deutlich höherer Synergismus als unter der dualen Inhibition beider Signalwege mittels NVP-AEW541. Außerdem sensibilisierte RAF265 neben NCI-H727-Zellen auch CM-Zellen (humane Insulinom-Zellen) gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Dies waren die ersten positiven Ergebnisse für NVP-AEW541 und RAF265 hinsichtlich einer TRAIL-sensibilisierenden Wirkung in NET-Zellen. In anderen Studien konnte bereits eine Zunahme der TRAIL-Empfindlichkeit mit Hilfe des RAF-Inhibitors Sorafenib erreicht werden, wobei eine Abnahme von Mcl-1 für diesen Effekt verantwortlich gemacht wurde [Ricci MS. et al., Cancer cell 2007; Rosato RR. et al., Cancer Res 2007; Meng XW. et al., J Biol Chem 2007]. In der vorliegenden Arbeit hatten NVP-AEW541 und RAF265 keinen Einfluss auf die Expression von FLIPs oder Caspase-8, aber bewirkten eine deutlich verminderte Expression von Bcl-2 und Bcl-XL in den untersuchten GEP-NET-Zelllinien, bei denen eine Zunahme der TRAIL-Empfindlichkeit beobachtet wurde. NVP-AEW541 und RAF265 scheinen diesen Effekt mittels einer verminderten Bindung von t-Bid mit Bcl-2 bzw. Bcl-XL zu erzielen. Das daraufhin ungebundene t-Bid veranlasst die TRAIL-induzierte Permeabilitätssteigerung der äußeren mitochondrialen Membran. Zur genauen Abklärung dieser Mechanismen werden weitere Studien, welche siRNA gegen Bcl-2 und Bcl-XL anwenden, benötigt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden wichtige neue Erkenntnisse in das komplexe Ineinandergreifen von PI(3)-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK gewonnen. GEP-NET-Zellen scheinen in der Lage der singulären Hemmung von mTOR-, VEGFR- oder RAS-RAF-MEK-ERK durch eine kompensatorische Aktivitätssteigerung von PI(3)K-AKT-mTOR entkommen zu können. Dazu passend wurde gezeigt, dass die duale Hemmung von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK - entweder durch den IGFR-Inhibitor NVP-AEW541 oder durch Kombinationen von RAD001 bzw. NVP-BEZ235 mit RAF265 - potente antiproliferative und proapoptotische Effekte erzielt. Sowohl NVP-AEW541 als auch die Kombinationen von RAD001 bzw. NVP-BEZ235 mit RAF265 wirkten deutlich stärker als die singuläre Inhibition eines einzelnen Überlebenssignalweges. Demzufolge bekräftigen diese Daten, dass eine Vermeidung von Umgehungs- und negativen Rückkopplungsschleifen durch eine vertikale und eine horizontale Blockade von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK sich als effektive Therapie von GEP-NET-Erkrankungen erweisen könnte. Zusätzlich ermöglichte eine Inhibition von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK eine Wiederherstellung der TRAIL-Empfindlichkeit in GEP-NET-Zellen.

In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen eine Kombination aus Inhibitoren von PI(3)K-AKT-mTOR und RAS-RAF-MEK-ERK bzw. eine Kombination aus Inhibitoren von RAS-RAF-MEK-ERK mit TRAIL geeignete neue Therapiestrategien bei GEP-NET-Tumoren zu sein, welche in weiteren präklinischen *in vitro* Studien und nachfolgend in klinischen *in vivo* Studien untersucht werden sollten.

6. Literaturverzeichnis

Ambrosini V, Campana D, Tomassetti P, Grassetto G, Rubello D, Fanti S. *PET/CT with ⁶⁸Gallium-DOTA-peptides in NET: An overview*. Eur J Radiol. 2010 [Epub ahead of print]

Apostolova I, Riethdorf S, Buchert R, Derlin T, Brenner W, Mester J, Klutmann S. *SPECT/CT stabilizes the interpretation of somatostatin receptor scintigraphy findings: a retrospective analysis of inter-rater agreement*. Ann Nucl Med. 2010; 24:477-83

Appetecchia M., Baldelli R. *Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours, current aspects and new perspectives*. J Exp Clin Cancer Res. 2010; 29: 19

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

Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. *Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL)*. J Clin Oncol. 2008; 26: 3621-30

Auernhammer CJ, Jauch KW, Hoffmann JN. *Liver metastases from neuroendocrine tumours of the gastroenteropancreatic system--therapeutic strategies*. Zentralbl Chir. 2009; 410-7

Auernhammer CJ., Spitzweg C., Heinemann V., Göke B. *Neuroendokrine Karzinome (NEC) von Dünndarm und Pankreas – Biotherapie, Chemotherapie und neue medikamentöse Therapieansätze*. Verdauungskrankheiten Jahrgang 27, Nummer 5/2009

Auernhammer CJ, Göke B. *Therapeutic strategies for advanced neuroendocrine carcinomas of jejunum/ileum and pancreatic origin*. Gut. 2011 [Epub ahead of print]

Balmanno K., Cook SJ. *Tumour cell survival signaling by the ERK 1/2 pathway*. Cell Death Differ 2009, 16: 368-77

Baudin E, Bidart JM, Rougier P, Lazar V, Ruffié P, Ropers J, Ducreux M, Troalen F, Sabourin JC, Comoy E, Lasser P, DeBaere T, Schlumberger M. *Screening for multiple endocrine neoplasia type 1 and hormonal production in apparently sporadic neuroendocrine tumors*. J Clin Endocrinol Metab. 1999, 84:69-75

Berber E, Flesher N, Siperstein AE. *Laparoscopic radiofrequency ablation of neuroendocrine liver metastases*. World J Surg 2002, 26: 985-90

Bocci G, Man S, Green SK, Francia G, Ebos JM, du Manoir JM, Weinerman A, Emmenegger U, Ma L, Thorpe P, Davidoff A, Huber J, Hicklin DJ, Kerbel RS. *Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies*. Cancer Res. 2004, 64:6616-25

Boisvert-Adamo K, Aplin AE. *Mutant B-Raf mediates resistance to anoikis via Bad and Bim*. Oncogene 2008, 27:3301-12

Bornschein J, Kidd M, Malfertheiner P, Modlin IM. *Gastrointestinal neuroendocrine tumors*. Dtsch Med Wochenschr. 2008, 133: 1505-10

Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: IARC Press; 2010

Boucher MJ, Morisset J, Vachon PH, Reed JC, Lainé J, Rivard N. *Mek/Erk signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells*. J Cell Biochem. 2000, 79: 355-69

Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G. *SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile*. Eur J Endocrinol 2002, 146:707-16

Buck E, Eyzaguirre A, Rosenfeld-Franklin M, Thomson S, Mulvihill M, Barr S, Brown E, O'Connor M, Yao Y, Pachter J, Miglarese M, Epstein D, Iwata KK, Haley JD, Gibson NW, Ji QS. *Feedback mechanisms promote cooperativity for small molecule inhibitors of epidermal and insulin-like growth factor receptors*. Cancer Res 2008, 68: 8322-32

Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S, Eisenhut M, Runz A, Schäfer M, Schilling T, Haufe S, Herrmann T, Haberkorn U. *Comparison of 68-GA-DOTATOC PET and 111In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours*. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007, 34:1617-26

Bussolati G, Volante M, Papotti M. *Classic and recent special stains used in differential diagnosis of endocrine tumors*. Endocr Pathol. 2001; (4):379-87

Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G. *Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut*. Virchows Arch. 1995; 425: 547-560

Caplin ME, Buscombe JR, Hilson AJ, Jones AL, Watkinson AF, Burroughs AK. *Carcinoid tumour*. Lancet. 1998; 352:799-805

Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP. *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer*. J Clin Invest 2008, 118: 3065-74

Ebos JM, Lee CR, Christensen JG, Mutsaers AJ, Kerbel RS. *Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy*. Proc Natl Acad Sci USA 2007, 104: 17069-74

Elias A, Siegelin MD, Steinmüller A, v. Deimling A, Lass U, Korn B, Mueller W. *Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas*. Clin Cancer Res 2009, 15: 5457-65

ENETS-Guidelines: www.neuroendocrine.net

Fazio N, Cinieri S, Lorizzo K, Squadroni M, Orlando L, Spada F, Maiello E, Bodei L, Paganelli G, Delle Fave G, de Braud F. *Biological targeted therapies in patients with advanced enteropancreatic neuroendocrine carcinomas*. Cancer Treat Rev. 2010, 36 Suppl 3: 87-94

Ferolla P, Faggiano A, Mansueto G, Avenia N, Cantelmi MG, Giovenali P, Del Basso De Caro ML, Milone F, Scarpelli G, Masone S, Santeusano F, Lombardi G, Angeletti G, Colao A. *The biological characterization of neuroendocrine tumors: the role of neuroendocrine markers*. J Endocrinol Invest 2008, 31:277-86

Galabova-Kovacs G, Matzen D, Piazzolla D, Meissl K, Plyushch T, Chen AP, Silva A, Baccarini M. *Essential role of B-Raf in Erk activation during extraembryonic development*. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 1325-30

Grant, S. *Cotargeting survival signaling pathways in cancer*. J Clin Invest. 2008, 118:3003-3006

Happel B, Niederle B, Puespoek A, Ba-Ssalamah A, Schima W. *Benign neuroendocrine and other rare benign tumors of the pancreas*. Radiologe 2008; 48:752-763

Herrmann KA, Sommer W, Schmidt-Tannwald C, Reiser MF und Zech CJ *Bildgebende radiologische Diagnostik bei neuroendokrinen Tumoren*. Verdauungskrankheiten, Jahrgang 27, Nr. 3/2009, S. 122-132

Hobday TJ, Rubin J, Holen K. *MC044h, a Phase II trial of sorafenib in patients with metastatic neuroendocrine tumours (NET): a Phase II Consortium (P2C) study*. J Clin Oncol. 2007, 25:4504

Höpfner M, Baradari V, Huether A, Schöfl C, Scherübl H. *The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours*. Endocr Relat Cancer 2006, 13: 135-49

Horton KM, Kamel I, Hofmann L, Fishman EK. *Carcinoid tumors of the small bowel: a multi -technique imaging approach*. Am J Roentgenol. 2004; 182: 559-567

Hresko RC, Mueckler M. *mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes.* J Biol Chem. 2005 Dec 9; 280(49):40406-16

Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ. *Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8.* Cancer Res 2000, 60: 5334-9

Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB. *The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors.* Endocr Rev. 2004, 25:458-511

Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J. *The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways.* Curr Biol. 2000; 10:640-8

Kerbel RS. *Tumor angiogenesis.* N Engl J Med 2008, 358: 2039-49

Kimple RJ. *Strategizing the clone wars: pharmacological control of cellular sensitivity to radiation.* Mol Interv. 2010; 10:341-53

Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8.* J Biol Chem. 2001; 276:46639-46

Klöppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, Komminoth P. *Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.* Virchows Arch 2007; 451(suppl 1):9–27

Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. *Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex.* J Biol Chem. 2001; 276:20633-40

Kulke MH, Bergsland EK, Yao JC. *Glycemic control in patients with insulinoma treated with everolimus.* N Engl J Med 2009, 360:195-197

Kwekkeboom DJ, de Herder WW, Kam BL, van Eijck CH, van Essen M, Kooij PP, Feelders RA, van Aken MO, Krenning EP. *Treatment with the radiolabelled*

somatostatin analog [177Lu-DOTA 0,TYR] octreotate: toxicity, efficacy and survival. J Clin Oncol 2008, 26: 2124-30

Kwekkeboom DJ, de Herder WW, van Eijck CH, Kam BL, van Essen M, Teunissen JJ, Krenning EP. *Peptide receptor radionuclide therapy in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.* Semin Nucl Med. 2010; 40:78-88

Lim JH, Lee ES, You HJ, Lee JW, Park JW, Chun YS. *Ras-dependent induction of HIF-1 alpha785 via the RAF/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion.* Oncogene 2004, 23: 9427-9431

Madoff DC, Gupta S, Ahrar K, Murthy R, Yao JC. *Update on the management of neuroendocrine hepatic metastases.* J Vasc Interv Radiol. 2006; 17:1235-49

Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by ERK implications for tuberous sclerosis and cancer.* Cell 2005, 121:179-93

Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, Jong S, Samali A. *TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL.* Cancer Treat Rev. 2009; 35:280-8

Majewski N, Nogueira V, Robey RB, Hay N. *Akt inhibits apoptosis downstream of Bid cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases.* Mol Cell Biol 2004, 24: 730-40

Massironi S, Sciola V, Peracchi M, Ciafardini C, Spampatti MP, Conte D;. *Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system.* World J Gastroenterol. 2008, 14:5377-84

Meng F, Dong B, Li H, Fan D, Ding J. *RNAi-mediated inhibition of Raf-1 leads to decreased angiogenesis and tumor growth in gastric cancer.* Cancer Biol Ther 2009,8:174-9

Meng XW, Lee SH, Dai H. *Mcl-1 as a buffer for proapoptotic Bcl-2 family members during TRAIL-induced apoptosis: a mechanistic basis for sorafenib (Bay 43-9006)-induced TRAIL sensitization.* J Biol Chem 2007; 282: 29831-46.

Mignon M. *Natural history of neuroendocrine enteropancreatic tumors.* Digestion. 2000; 62 Suppl 1:51-8

Mizukami Y, Kohgo Y, Chung DC. *Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis.* Clin Cancer Res 2007, 13: 5670-4

Modlin IM, Lye KD, Kidd M. *A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors.* Cancer 2003, 97:934-59

Modlin IM, Champaneria MC, Chan AK, Kidd M. *A three-decade analysis of 3,911 small intestinal neuroendocrine tumors: the rapid pace of no progress.* Am. J. Gastroenterol. 2007,102: 1464-1473

Modlin IM, Pavel M, Kidd M, Gustafsson BI. *Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours.* Aliment Pharmacol Ther. 2010; 31:169-88

Modlin IM, Gustafsson BI, Pavel M, Svejda B, Lawrence B, Kidd M. *A nomogram to assess small-intestinal neuroendocrine tumor ('carcinoid') survival.* Neuroendocrinology 2010; 92:143-57

Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, Li JZ, Bello CL, Theuer CP, George DJ, Rini BI. *Activity of Su11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma.* J Clin Oncol 2006, 24:16-24

NANETS-Guidelines: <http://nanets.net>

Nazario J, Gupta S. *Transarterial liver-directed therapies of neuroendocrine hepatic metastases.* Semin Oncol. 2010; 37:118-26

Neshat MS, Mellinshoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H, Sawyers CL. *Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR*. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98: 10314-9

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J Immunol Methods 1991, 139:271-9

Niccoli P, Raoul J, Bang Y, et al. *Updated safety and efficacy results of the phase III trial of sunitinib (SU) versus placebo (PBO) for treatment of pancreatic neuroendocrine tumors (NET)*. Journal of Clinical Oncology 2010, 28: Abstract

Oberndorfer S. *Karzinoid Tumoren des Dünndarms*. Frankfurter Zeitschrift für Pathologie 1907, 1:426-429

Öberg K. *Advances in chemotherapy and biotherapy of endocrine Tumors*. Curr Opin Oncol 1998; 10: 58–65

Öberg K. *Management of neuroendocrine tumours*. Ann Oncol. 2004; 15 Suppl 4:293-8.

Öberg K, Eriksson B. *Endocrine tumours of the pancreas*. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2005, 19:753-781

Öberg K, Jelic S; ESMO Guidelines Working Group. *Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol. 2008, 19 Suppl 2:ii104-5

Opel D, Westhoff MA, Bender A, Braun V, Debatin KM, Fulda S. *Phosphatidylinositol-3-Kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis*. Cancer Res 2008, 68:6271-80

O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. Cancer Res 2006, 66:1500-8

Panner A, James CD, Berger MS, Pieper RO. *mTOR controls FLIPs translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells*. Mol Cell Biol. 2005, 25:8809-23

Pape UF, Berndt U, Müller-Nordhorn J, Böhmig M, Roll S, Koch M, Willich SN, Wiedenmann B. *Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*. Endocr Relat Cancer. 2008, 15(4):1083-97

Pape UF, Jann H, Müller-Nordhorn J, Bockelbrink A, Berndt U, Willich SN, Koch M, Röcken C, Rindi G, Wiedenmann B. *Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Cancer 2008, 113:256-65

Pappano WN, Jung PM, Meulbroek JA, Wang YC, Hubbard RD, Zhang Q, Grudzien MM, Soni NB, Johnson EF, Sheppard GS, Donawho C, Buchanan FG, Davidsen SK, Bell RL, Wang J. *Reversal of oncogene transformation and suppression of tumor growth by the novel IGF-1 kinase inhibitor A928605*. BMC Cancer 2009, 9: 314

Perren A, Schmid S, Locher T, Saremaslani P, Bonvin C, Heitz PU, Komminoth P. *BRAF and endocrine tumors: mutations are frequent in papillary thyroid carcinomas, rare in endocrine tumors of the gastrointestinal tract and not detected in other endocrine tumors*. Endocr Relat Cancer. 2004;11:855-60

Plöckinger U, Wiedenmann B. *Neuroendocrine tumors. Biotherapy*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol 2007, 21:145-62

Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Hörsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzniewski P. *Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med. 2011; 364:501-13.

Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SW. *Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications*. J Steroid Biochem Mol Biol. 1992; 43:27-35

Reubi JC, Waser B, Liu Q, Laissue JA, Schonbrunn A. *Subcellular distribution of Somatostatin SST2A receptors in human tumors of the nervous and neuroendocrine*

systems: membranous versus intracellular location. J Clin Endocrinol Metab. 2000, 85:3882-91

Reubi JC. *Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy.* Endocr Rev. 2003, 24:389-427

Ricci MS, Kim SH, Ogi K. *Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death.* Cancer Cell 2007; 12: 66-80

Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Bläker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold R, PROMID Study Group. *Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group.* J Clin Oncol. 2009; 27:4656-63

Rindi G, Capella C, Solcia E. *Introduction to a revised clinicopathological classification of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic tract.* Q J Nucl Med 2000, 44: 13-21

Rindi G, Kloppel G, Alhman H et al.. *TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system.* Virchows Arch. 449, 395-401 (2006)

Rindi G, Kloppel G, Couvelard A et al.. *TNM staging of midgut and hindgut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system.* Virchows Arch. 451, 757-762 (2007)

Rosato RR, Almenara JA, Coe S, Grant S. *The multikinase inhibitor sorafenib potentiates TRAIL lethality in human leukemia cells in association with Mcl-1 and cFLIPL down-regulation.* Cancer Res 2007; 67: 9490-500

Rosch T, Lightdale CJ, Botet JF, Boyce GA, Sivak MV Jr, Yasuda K, Heyder N, Palazzo L, Dancygier H, Schusdziarra V. *Localization of pancreatic endocrine tumors by endoscopic ultrasonography.* N Engl J Med. 1992; 326: 1721-1726

Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD.; „Ras protein farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development”; J Clin Oncol 1999;17:3631–52

Ruf J, Heuck F, Schiefer J, Denecke T, Elgeti F, Pascher A, Pavel M, Stelter L, Kropf S, Wiedenmann B, Amthauer H. *Impact of Multiphase 68Ga-DOTATOC-PET/CT on therapy management in patients with neuroendocrine tumors*. Neuroendocrinology. 2010, 9:101-109

Sabatini DM. *mTOR and cancer: insights into a complex relationship*. Nat Rev Cancer 2006, 6:729-34

Schillaci O, Spanu A, Scopinaro F, Falchi A, Danieli R, Marongiu P, Pisu N, Madeddu G, Delle Fave G, Madeddu G. *Somatostatin receptor scintigraphy in liver metastasis detection from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. J Nucl Med 2003, 44: 359-68

Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S, Maira M, Garcia-Echeverria C, Parra JL, Arribas J, Baselga J. *NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations*. Cancer Res 2008, 68:8022-30

Shah T, Hochhauser D, Frow R, Quaglia A, Dhillon AP, Caplin ME. *Epidermal growth factor receptor expression and activation in neuroendocrine tumours*. J Neuroendocrinol. 2006, 18:355-60

Shivapurkar N, Reddy J, Matta H, Sathyanarayana UG, Huang CX, Toyooka S, Minna JD, Chaudhary PM, Gazdar AF. *Loss of expression of death-inducing signaling complex (DISC) components in lung cancer cell lines and the influence of Myc amplification*. Oncogene 2002, 21:8510-4

Shivapurkar N, Toyooka S, Eby MT, Huang CX, Sathyanarayana UG, Cunningham HT, Reddy JL, Brambilla E, Takahashi T, Minna JD, Chaudhary PM, Gazdar AF. *Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers*. Cancer Biol Ther. 2002; 1:65-9

Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, Agani F, Jiang BH. *Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1alpha, HDM2 and p70S6K1 in response to Phosphatidylinositol3-Kinase/Akt signaling*. J Biol Chem 2004, 279-45643-51

Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H. *Nature's TRAIL-on a path to cancer immunotherapy*. *Immunity* 2003, 18:1-6

Solcia E, Klöppel G, Sobin LH et al.. *Histological typing of endocrine tumours, ed 2. WHO International Histological Classification of Tumours*. Berlin, Springer 2000.

Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. *Raf kinase as a target for anticancer therapeutics*. *Mol Cancer Ther*. 2005;4: 677-85

Srirajaskanthan R, Kayani I, Quigley AM, Soh J, Caplin ME, Bomanji J. *The role of 68Ga-DOTATATE PET in patients with neuroendocrine tumors and negative or equivocal findings on 111In-DTPA-octreotide scintigraphy*. *J Nucl Med*. 2010, 51:875-82

Stacchiotti S, Tamborini E, Marrari A, Brich S, Rota SA, Orsenigo M, Crippa F, Morosi C, Gronchi A, Pierotti MA, Casali PG, Pilotti S. *Reponse to sunitinib malate in advanced alveolar soft part sarcoma*. *Clin Cancer Res* 2009, 15:1096-104

Strosberg JR, Fine RL, Choi J, Nasir A, Coppola D, Chen DT, Helm J, Kvols L. *First-line chemotherapy with capecitabine and temozolomide in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas*. *Cancer*. 2010 Sep 7. [Epub ahead of print]

Stuart D, Aardalen K, Venetsanakos E, Nagel T, Wallroth M, Batt D, Ramurthy S, Poon D, Faure M, Lorenzana E, Salangsang F, Dove J. *RAF265 is a potent Raf kinase inhibitor with selective anti-proliferative activity in vitro and in vivo*. AACR Meeting Abstracts Online 2008

Tomassetti P, Migliori M, Lalli S, Campana D, Tomassetti V, Corinaldesi R. *Epidemiology, clinical features and diagnosis of gastroenteropancreatic endocrine tumours*. *Ann Oncol*. 2001; 12: 95-9

Tomassetti M, Rippo MR, Moretti S, Vescovi S, Orecchia S, Amici G, Catalano A, Procopio A. *FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells*. *Oncogene* 2004, 14:7753-60

Tomassetti P, Campana D, Piscitelli L, Casadei R, Santini D, Nori F, Morselli-Labate AM, Pezzilli R, Corinaldesi R. *Endocrine pancreatic tumors: factors correlated with survival*. *Ann Oncol*. 2005; 16:1806-10

Toth-Fejel S, Pommier RF. *Relationship among delay of diagnosis, extent of disease, and survival in patients with abdominal carcinoid tumors.* Am J Surg 2004, 187:575-9

Uchida M, Iwase M, Takaoka S, Yoshiba S, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Nagumo M, Shintani S. *Enhanced susceptibility to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells treated with Phosphatidylinositol3-Kinase inhibitors.* Int J Oncol 2007, 30: 1163-71

UICC: „TNM-Classification of Malignant Tumours“, 7. Ausgabe, www.uicc.org

Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E. *Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity.* EMBO J. 1986 Oct; (10):2503-12

Vilar E, Salazar R, Pérez-García J, Cortes J, Oberg K, Tabernero J. *Chemotherapy and role of the proliferation marker KI-67 in digestive neuroendocrine tumors.* Endocr Relat Cancer 2007, 14:221-32

Vink SR, Lagerwerf S, Mesman E, Schellens JH, Begg AC, van Blitterswijk WJ, Verheij M. *Radiosensitization of squamous cell carcinoma by the alkylphospholipid perifosine in cell culture and xenografts.* Clin Cancer Res 2006, 12:1615-22

Virgolini I., Ambrosini V., Bomanji J., Baum R., Fanti S., Gabriel M., Papathanasiou N., Pepe G., Oyen W., De Cristoforo C., Chiti A. *Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010 37:2004–2010

Vogl TJ, Naguib NN, Zangos S, Eichler K, Hedayati A, Nour-Eldin NE. *Liver metastases of neuroendocrine carcinomas: interventional treatment via transarterial embolization, chemoembolization and thermal ablation.* Eur J Radiol 2009, 72:517-28

von Wichert G, Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedenmann B, Boehm BO, Adler G, Seufferlein T. *Insulin-like growth factor-1 is an autocrine regulator*

of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res* 2000, 60: 4573-81

Wang L, Ignat A, Axiotis CA. *Differential expression of the PTEN tumor suppressor protein in fetal and adult neuroendocrine tissues and tumors: progressive loss of PTEN expression in poorly differentiated neuroendocrine neoplasm.* *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002, 10: 139-46

Wang S. *The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway.* *Oncogene* 2008, 27: 6207-15

Wang S. *TRAIL: a sword for killing tumors.* *Curr Med Chem.* 2010; 17:3309-17

Wang X. *The expanding role of mitochondria in apoptosis.* *Genes Dev.* 2001, 15:2922-33

Warner RR. *Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances.* *Gastroenterology* 2005, 128: 1668-84

Weinstein IB, Joe A. *Oncogene addiction.* *Cancer Res* 2008, 68: 3077-80

Wendel HG, Malina A, Zhao Z, Zender L, Kogan SC, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW. *Determinants of sensitivity and resistance to rapamycin-chemotherapy drug combinations in vivo.* *Cancer Res* 2006, 66:7639-46

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.* *Immunity* 1995, 3: 673-82

Williams ED, Sandler M. *The classification of carcinoid tumours.* *Lancet* 1963, 1:238-9

World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics of tumours of endocrine organs (2004). IARC, Lyon

Yao JC, Lombard-Bohas C, Baudin E, Kvols LK, Rougier P, Ruzsniwski P, Hoosen S, St Peter J, Haas T, Lebwohl D, Van Cutsem E, Kulke MH, Hobday TJ, O'Dorisio TM, Shah MH, Cadiot G, Luppi G, Posey JA, Wiedenmann B. *Daily oral everolimus activity in*

patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: a phase II trial. J Clin Oncol. 2010, 28:69-76

Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. *Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors.* N Engl J Med. 2011; 364:514-23

Zaidi H, Prasad R. *Advances in multimodality molecular imaging.* J Med Phys. 2009 Jul, 34:122-8

Zauli G, Sancilio S, Cataldi A, Sabatini N, Bosco D, Di Pietro R. *PI3K/Akt and NF-KappaB/IKappaBalpha pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment.* J Cell Physiol 2005, 202:900-11

Zitzmann K., Vlotides G., Göke B., Auernhammer CJ. *PI(3)K–Akt–mTOR pathway as a potential therapeutic target in neuroendocrine tumors.* Expert Rev. Endocrinol. Metab. 2008; 3:207-22

Zitzmann K, Rüden J, Brand S, Göke B, Lichtl J, Spöttl G, Auernhammer CJ. *Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors – a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease.* Cancer Lett 2010; 295:100-9

Zhang L, Fang B. *Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer.* Cancer Gene Ther 2005, 228-37

7. Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
Bax	Bc2-assoziiertes X Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
FLIP	cellular FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein
CgA	Chromogranin A
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleine acid
DR-4/DR-5	Death receptor 4/5
4ebp1	4E-bindendes Protein
EC-Zellen	Enterochromaffine-Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FKS	Fetales Kälberserum
FLIP	FLICE inhibitory protein
GAPDH	Glyeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEP	Gastroenteropankreatisch
G-Phase	engl. "gap"-Phase der Mitose
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
5-HIES	5-Hydroxy-Indolessigsäure
HIF-1α/β	Hypoxie-induzierender Faktor 1 α/β
IGF	Insulin-like growth factor
IGFR	Insulin-like growth factor- Rezeptor
ILMA	Immunoluminometric assay
IR	Insulinrezeptor
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
IRS-2	Insulin-Rezeptor-Substrat 2
Mcl-1	Myeloid leukemia cell differentiation protein
MDCT	Multidetektor-CT
MEK	MAP/ERK Kinase Kinase
MEN1	Multiple Endokrine Neoplasie 1

MgSO4	Magnesiumsulfat
MPR	Multiplanare Reformation
MRT	Magnetresonanztomographie
MSCT	Mehrschicht-CT
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NANETS	North American Neuroendocrine Tumor Society
NET	Neuroendokriner Tumor
NF-κB	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NSE	Neuronen spezifische Enolase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PET	Positronen Emissions Tomographie
P70S6K	P70 ribosomale Protein S6 Kinase
PI(3)K	Phosphoinositol-(3)-Kinase
PIKK	Phosphoinositol-(3)-Kinase-abhängige Kinase-Familie
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PRRT	Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom ten
RAF	rapidly growing fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	Ribonucleine acid
RPMI	Roswell park memorial institute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomographie
S-Phase	Synthesephase der Mitose
SRS	Somatostatinrezeptorzintigraphie
SSA	Somatostatinanaloga
SSR	Somatostatinrezeptor
TAE	Transarterielle Embolisation
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM-Stadien	Tumor, Lymphknoten, Metastasen-abhängige Tumorstadien
TRAIL	Tumornekrosefaktor-assoziierter Apoptose-induzierender Ligand
TRAILR1/2	TRAIL Rezeptor 1/2
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

8. Publikationen

8.1. Originalpublikationen

- Zitzmann K., Rüden J., Brand S., Göke B., Lichtl J., Spöttl G., Auernhammer CJ; „Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - A rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease”. *Cancer Lett* 2010; 295:100-9.
- Zitzmann K., de Toni E., Rüden J, Brand S., Göke B., Laubender RP. and Auernhammer CJ.; „The novel Raf inhibitor Raf265 decreases Bcl-2 levels and confers TRAIL-sensitivity to neuroendocrine tumor cells”. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18:277-85.

8.2. Kongressbeiträge

Zitzmann K., Rüden J., Brand S., Göke B., Lichtl J., Spöttl G., Auernhammer CJ.; „Duale Inhibition der PI(3)K-Akt-mTOR- und der Ras-Raf-MEK-Erk1/2-Signalkaskade in neuroendokrinen Tumorzelllinien pankreatischen -, midgut- und bronchialen- Ursprungs.“ Poster für den Kongress der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Hamburg, Oktober 2009

9. Lebenslauf

Persönliche Daten: Janina Maria von Rüden,
geboren am 26.2.1985 in Princeton/USA

Schule:

- 1991-1995 Christian-Bucher-Volksschule in Wien
- 1995-1998 Frauengassen-Gymnasium in Baden bei Wien
- 1998-2004 Kurt-Huber-Gymnasium in Gräfelfing mit Auslandsaufenthalt am Jehan-de-Beauce-Gymnasium in Chartres/Frankreich
Abitur 2004

Hochschulstudium:

- Seit 2004 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 2006 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2007 Famulatur in der orthopädischen Gemeinschaftspraxis Pasing
(Dr.med. Christian Carl, Dr. med. Heiko Mitnacht, Prof. Dr. med. J.-H. Kühne, Wolfgang Orth)
- Famulatur in der Onkologie, Universitätsklinikum Wien
(Prof. Dr. Christian Zielinski)
- 2008 Famulatur in der Kardiologie, Universitätsklinikum Großhadern/München
(Prof. Dr. Gerhard Steinbeck)
- 2009 Famulatur in der Gastroenterologie, Klinikum München-Pasing
(Prof. Dr. Brigitte Mayinger)
- 2009/2010 Praktisches Jahr
Klinikum Starnberg, Klinik für Pädiatrie (Prof. Dr. Thomas Lang)
Kantonsspital Fribourg/Schweiz, Klinik für Innere Medizin
(Prof. Dr. Daniel Hayoz)
Klinikum Ingolstadt, Klinik für Chirurgie
(Prof. Dr. Stefan Hosch, Prof. Dr. Michael Wenzl)
- 2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufliche Laufbahn:

- 02/2011 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik III, Zentralklinikum Augsburg,
Prof. Dr. Helmut Messmann

Dissertation:

Seit 2007 „*In vitro* Untersuchungen zur Rolle des PI(3)K-AKT-mTOR-, des RAS-RAF-MEK-ERK- und des TRAIL-Signalwegs als Targets in der molekular zielgerichteten Therapie von neuroendokrinen Tumoren“.
Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern
Betreuer PD Dr. Christoph Auernhammer

10. Danksagung

Mein Dank gilt:

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

Dr. rer. nat. Kathrin Zitzmann für die Einarbeitung und die Hilfestellungen für den experimentellen Abschnitt sowie die Unterstützung beim Verfassen einer wissenschaftlichen Arbeit.

Gerald Spöttl und Jennifer Lichtl für ihre stete Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung.

Sandra Andersen für die gemeinsamen arbeitsreichen aber auch unterhaltsamen Stunden im Labor.