

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

Direktor Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**In vitro Untersuchungen zur Rolle der HSP90
Inhibitoren als neuer therapeutischer Ansatz in der
Therapie der neuroendokrinen Tumoren**

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

Vorgelegt von Galina Ailer-Märzluft
aus Tiraspol/Moldawien
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christoph Auernhammer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Felix Beuschlein
Priv. Doz. Dr. Stefan Böck

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2014

Inhalt

Direktor Prof. Dr. med. Burkhard Göke.....	1
I. Einleitung.....	5
II. HSP90	5
1. Definition, Isoformen	5
2. Aufbau von HSP90	7
3. Funktion.....	9
4. HSP90 als Therapieansatz in der Onkologie	13
5. Die Entwicklung von HSP90 Inhibitoren.....	15
6. NVP-AUY 922 und NVP-HSP990	19
III. Neuroendokrine Tumoren.....	23
1. Definition.....	23
2. Klassifikation.....	25
3. Metastasierungshäufigkeit von NET in Abhängigkeit von der Primariuslokalisation	28
4. NET des Pankreas.....	29
5. Jejuno-Ileale NETs.....	29
6. Molekular zielgerichtete medikamentöse Therapie der NET.....	30
IV. Material und Methoden	33
1. Material	33
2. Methoden.....	35
V. Ergebnisse.....	39
1. HSP90 Überexpression in NET-Zellen und gesteigerte HSP70 Expression als Biomarker für die HSP90 Inhibition.....	39
2. Beeinträchtigung der neuroendokrinen Zellviabilität durch die HSP90 Inhibition	40

3.	Auswirkung der HSP90 Inhibition auf die Verteilung der NET Zellen im Zellzyklus	45
4.	HSP90 Inhibition führt zu Apoptose in NET Zellen.....	49
5.	Prinzip der HSP90 Inhibition in NET Zellen: Effekte auf Signaltransduktionswege	52
VI.	Diskussion	55
VII.	Literaturverzeichnis.....	61
	Eidesstattliche Versicherung	64
	Danksagung	65

I. Einleitung

Unter dem Begriff „Neuroendokrine Neoplasien“ verbirgt sich eine heterogene Gruppe von neuroendokrinen Tumoren und neuroendokrinen Karzinomen des Gastroenteropankreatischen Systems und der Lunge. Häufig wird die Erkrankung erst im fortgeschrittenen fernmetastasierten Stadium diagnostiziert, wenn eine operative Intervention mit kurativem Ansatz nicht mehr möglich ist. Die palliativen Therapieoptionen sind in ihrer Effizienz begrenzt; aus diesem Grund sind neue, effektive Therapieoptionen von großer Relevanz.

Hitzeschockprotein 90 (HSP90) Inhibitoren gewannen in den letzten Jahren an Bedeutung und an ihrer Entwicklung wird viel geforscht, weil sie einen vielversprechenden Angriffspunkt in der molekularen Onkologie darstellen.

Diese Arbeit bietet zunächst eine kurze Literaturübersicht über aktuelle molekular zielgerichtete Therapieansätze bei neuroendokrinen Tumoren, sowie über die Rolle des Hitzeschockproteins 90 (HSP90) und über HSP90 Inhibitoren in der Onkologie. Es folgt eine Darstellung der allgemeinen Leitlinienempfehlungen zur Klassifikation, Diagnostik und Therapie der neuroendokrinen Tumoren entsprechend den ENETS Consensus Guidelines, 2012. In der vorliegenden Arbeit wurden - im Rahmen eines Teilprojekts des vom BMBF-geförderten Münchener Biotech Cluster m4-Projekts - die Effekte der zwei HSP90 Inhibitoren NVP-AUY922 (Novartis) und NVP-HSP990 (Novartis) in humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien in vitro untersucht. Die durchgeführten Versuche und ihre Auswertung werden präsentiert und die Ergebnisse im oben genannten Kontext diskutiert.

II. HSP90

1. Definition, Isoformen

HSP90 ist ein Vertreter der hoch konservierten Hitzeschockproteine-Familie¹. Synthetisiert wird es sowohl bei allen Bakterien als auch bei Eukaryoten. Namensgebend war in den 60er Jahren die Entdeckung, dass bei unphysiologisch

¹ The Hsp90 Chaperone machinery, Journal of biological chemistry, July 4,2008, Volume 283, Number 27,pp. 18473-18477

hohen Temperaturen die Syntheserate dieser Proteine gesteigert ist; jedoch können auch Azidose, Hypoxie, oder Nährstoffmangel die HSP Synthese in Zellen stimulieren².

Klassifiziert werden Hitzeschockproteine nach ihrem Molekulargewicht in kDa. Man unterscheidet HSP100, 90, 70, 60 und smallHSP 15-30kDa³. Mit 1-2% Anteil an löslichen Zellproteinen, ist HSP90 eines der am häufigsten in der Zelle vorkommenden Proteine⁴.

Fünf humane Gene kodieren für HSP90 Protein Isoformen. Es gibt cytoplasmatische (HSP90 alpha und beta), im endoplasmatischen Reticulum auffindbare (GRP94) und in der mitochondrialen Matrix positionierte(HSP90 N) Isoformen⁵:

Family	Subcellular Location	Subfamily	Gen	Protein
HSP90 A	Cytosol	HSP90 AA	HSP90AA1	HSP90-alpha1
HSP90 A	Cytosol	HSP90 AA	HSP90 AA2	HSP90-alpha2
HSP90 A	Cytosol	HSP90 AB	HSP90AB1	HSP90-beta1
HSP90 B	ER		HSP90B1	Endoplasmin/Grp 94
TRAP	Mitochondriale Matrix		TRAP1	TNF-Receptor associated protein1

Cytosolische Isoformen sind bis jetzt, die am besten untersuchten Isoformen. Alle Isoformen besitzen die gleiche Struktur, außer das membran-assoziierte HSP90N mit der stumpfen aminoterminalen Domäne, die keine ATP- Bindungsregion aufweist⁶.

² Whitesell L, R. Bagatell & R. Falsey 2003. The stress response: implications for the development of Hsp90 inhibitors. *Curr. Cancer Drug Targets* 3: 349-358

³ V Dudeja, S. M. Vickers, A. K. Saluja: The role of heat shock proteins in gastrointestinal diseases, *Gut* 2009 July; 58(7): 1000-9.review

⁴ D. Mahalingam, R. Swords, JS. Carew, ST. Nawrocki, K. Bhalla and FJ. Giles, Targeting HSP90 for cancer therapy, Minireview, *British Journal of Cancer* (2009) 100, 1523-1529

⁵ Garrido C., Gurbuxani S., Ravagnan L., et.al. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 433-442

⁶ Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett.* 2007 Jul 31;581(19):3758-69. Epub 2007 May 25.

HSP90 ist ein sogenanntes molekulares Chaperone, aus dem engl. „chaperone“ Anstandsdame. Kontrolle der Faltung und Oligomerisierung von Proteinen zeichnet diese aus.

Zahlreiche solide Tumoren und hämatonkologische Erkrankungen weisen gesteigerte Expressionsraten von HSP90 auf⁷. Dieser Umstand ermöglicht es den entarteten Zellen im azidotischen, hypoxischen Milieu zu überleben⁸.

2. Aufbau von HSP90

Das HSP90 Monomer setzt sich zusammen aus drei Domänen: der aminoterminalen, der mittleren und der carboxyterminalen Domäne⁹.

Die aminoterminal Domäne (24-28 kDa) beherbergt die ATP Bindungstasche. ATP Hydrolyse ermöglicht die Dimerisierung des HSP90. Diese Region wird noch eingehend untersucht, weil ATP Bindung und Hydrolyse unabdingbar für die Funktion des Proteins sind und somit die Zielscheibe der HSP90 Inhibition darstellt¹⁰.

An die mittlere Domäne (38-44 kDa) docken sogenannte „client“ Proteine an und unterteilt wird die mittlere Domäne in drei Regionen: ein dreischichtiges α - β - α „Sandwich“, eine α Helix mit drei Windungen und irreguläre loops und eine α Helix mit sechs Windungen¹¹. Bekannt ist auch, dass die Bindung von Substratproteinen die ATPase Aktivität von HSP90 erhöht¹². Was genau mit „client“ Proteinen gemeint ist und welche das sind, darauf wird später Bezug genommen.

⁷ Kyung-Hun Lee, Ju-Hee Lee, Sae-Won Han, Seock-Ah Im, Tae-You Kim, Do-Youn Oh and Yung-Jue Bang: Antitumor activity of NPV-AUY 922, a novel heat shock protein 90 inhibitor, in human gastric cancer cells is mediated through proteasomal degradation of client proteins, Japanese Cancer Association, July 2011, vol. 102, no. 7, 1388-1395

⁸ Kimura E., Erns RE., Alcaraz JE., Arboleda J., Slamon DJ., Howell SB. Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60kDa heat shock protein Hsp60. J Clinical Oncol 1993;11: 891-898.

⁹ Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L, Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. Nat Rev Cancer 10: 537-549

¹⁰ Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. Exp Biol Med 2003; 111-33.

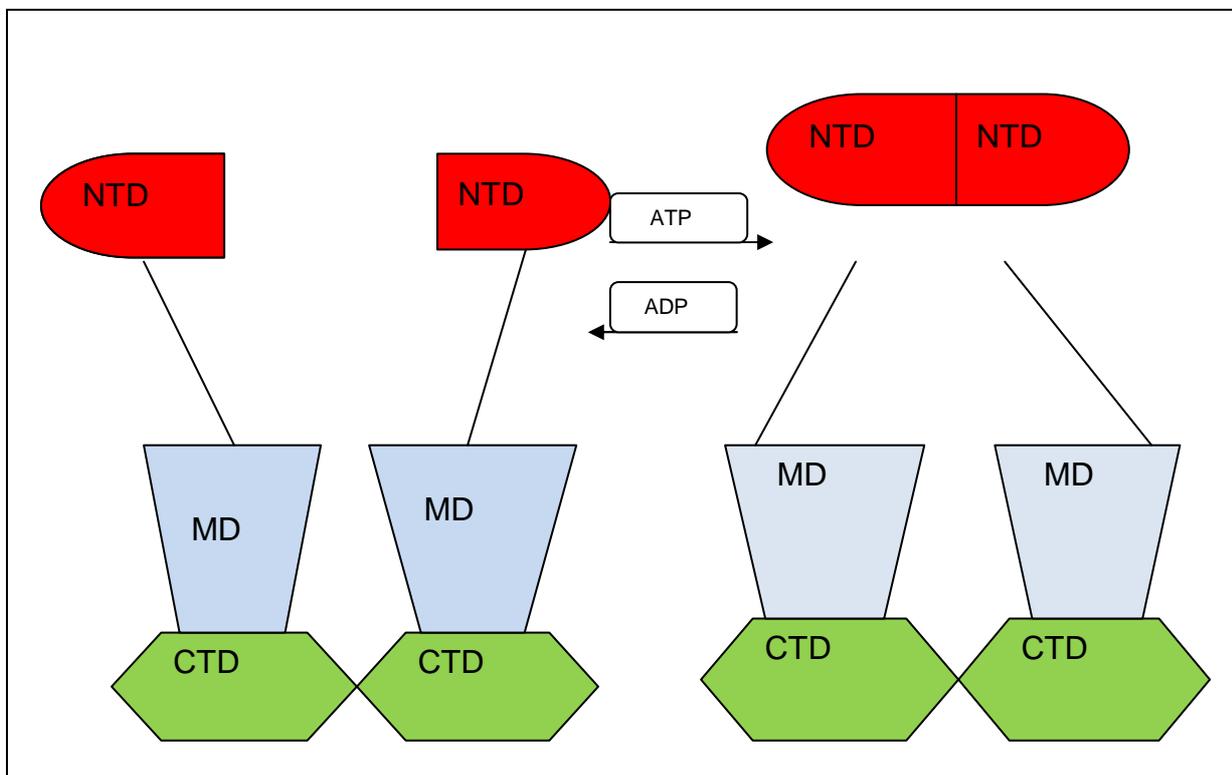
¹¹ Prodromou C, Pearl LH (2001). "Structure and functional relationships of HSP90" Curr Cancer Drug Targets 3(5): 301-23.

¹² Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH (March 2003) „Structural and functional analysis oft he middle segment of hsp 90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions „ Mol. Cell 11(3): 647-58.

Die carboxyterminale Domäne (11-15 kDa) dient der Dimerisierung des HSP90 Monomers¹³. Außerdem befindet sich dort eine weitere ATP Bindungstasche, für den Fall, dass die an der aminoterminalen bereits besetzt ist¹⁴.

Das HSP90 Protein erfüllt seine Rolle als Chaperone in Form eines Homodimers. Dieses kann zwei unterschiedliche Konformationszustände einnehmen. In der ATP-gebundenen offenen Konformation exponiert das Homodimer hydrophobe Residuen, welche ungefaltete oder missfaltete Proteine mit unüblichen hydrophoben Resten mit hoher Affinität rekrutieren.

Nach der erfolgten Substratbindung bewirkt die durch die ATP Hydrolyse freigesetzte Energie eine Konformationsänderung zur ADP-gebundenen geschlossenen Form, sodass das „client“ Protein in das HSP90 Homodimer eingeschlossen ist¹⁵



ATP induzierte N-terminale Dimerisation von HSP90

¹³ Terasawa K, Minami M, Minami Y. Constantly updated knowledge of Hsp90. J Biochem. 2005 Apr;137(4):443-7. Review

¹⁴ Söti C, Rácz A, Csermely P (March 2002): A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-Terminal domain of HSP90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket." J. Biol. Chem 277 (9): 7066-75.

¹⁵ Wandinger SK¹, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. J Biol Chem. 2008 Jul 4; 283(27):18473-7

NTD: Aminoterninale Domäne, MD: Mittlere Domäne, CTD: C-terminale Domäne

(Adaptiert nach Gang Niu, Xiaoyuan Chen et al. European Journal of Radiology 70(2009) 294-304.)

3. Funktion

Hitzeschockproteine sichern die Proteinhomöostase intrazellulär. Der Umstand, dass bei Abwesenheit von Stress 1-2% des Gesamtproteingehaltes die Hitzeschockproteine darstellen und, dass es sowohl konstitutive als auch induzierbare Isoformen im Cytosol gibt, zeigt, dass diese molekularen Chaperone unabdingbar für das Überleben der Zellen sind.

Die Aufgaben der Chaperone unterscheiden sich je nachdem, ob die Zellen „gestresst“ sind oder nicht und, ob es sich um gesunde oder maligne entartete Zellen handelt. Stress für Zellen stellt zum Beispiel Zustand der Hypoxie, Azidose oder Nährstoffmangel dar¹⁶. Desweiteren wenn diese unphysiologisch erhöhten Temperaturen oder Schwermetallen ausgesetzt sind.

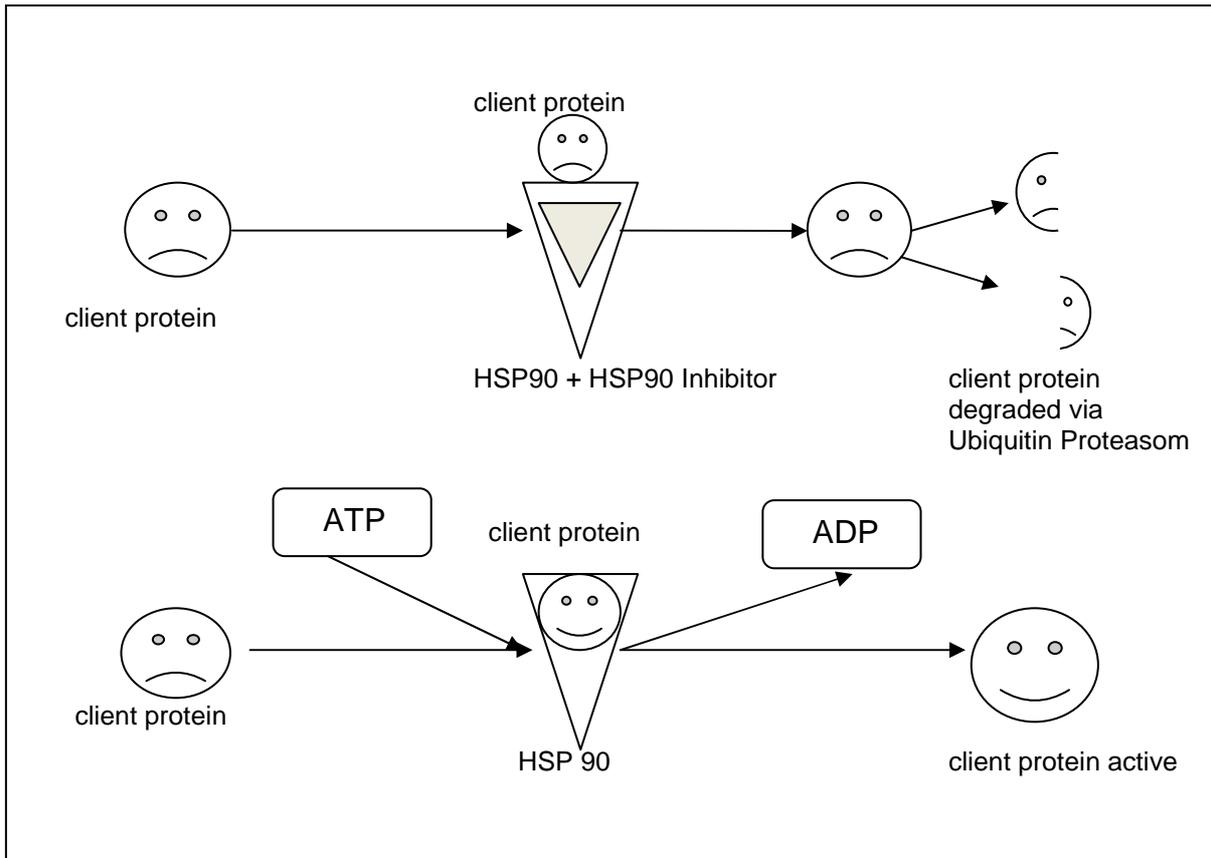
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist HSP90 ubiquitär in allen Eukaryoten vorhanden und sichert das Überleben der Zellen. Zu den zahlreichen regulären Funktionen des HSP90 gehören Prävention von Interaktionen zwischen irregulär oder ungeordnet gefalteten Proteinen, intrazelluläre Disposition, proteolytischer Umsatz, de novo Proteinfaltung während der Synthese von naszierenden Ketten, transmembranöse Translokation von Proteinen und Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Reticulum¹⁷.

Diese Qualitätskontrolle läuft wie nachfolgend skizziert ab: Neu synthetisierte, bezüglich der Konformation noch labile Proteine assoziieren mit dem HSP90-Multichaperone-Komplex. Durch die Assoziation bleibt das Substrat im metastabilen, nicht aggregierten Zustand. Auf diese Weise kann es durch spezifische Stimuli wie weitere Ligandenbindung oder Phosphorylierung aktiviert werden. Bleibt die Aktivierung aufgrund eines Defektes aus, erleichtern die molekularen Chaperone das

¹⁶ Calderwood S.K., M.A. Khaleque, D. B. Sawyer&D.R. Ciocca 2006. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. Trends Biochem. Sci. 31: 164-172.

¹⁷ Bukau B, Horwich AL. The HSP70 and HSP60 chaperone machines. Cell 1998; 92: 351-66.

Entfalten und das Reparieren des „client proteins“. Erweist sich der Schaden als irreparabel, sorgen die Chaperone für dessen Abbau via Ubiquitin-26S-Proteosom Signaltransduktionsweg.



HSP90 Inhibitor führt zu Degradierung der „client proteins“

(Adaptiert nach Rocia Garcia-Carbonero et al., Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic, Lancet Oncology 2013; 14:e358-69)

Als „client proteins“ werden Substrate bezeichnet an denen molekulare Chaperone agieren. Viele davon sind onkogene Proteine, Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Bekannt sind mittlerweile über 200¹⁸ und diese Zahl steigt. Eine vollständige Liste mit den Substratproteinen, die ständig aktualisiert wird, ist im Internet unter <http://www.picard.ch/downloads/HSP90interactors.pdf> einzusehen.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die wichtigsten HSP90 Client Proteine, die an der Karzinogenese beteiligt sind.

Tyrosin-Kinase-Rezeptoren	HER2(ERBB2), mutant EGFR,MAP2K1(MEK),FLT3, VEGFR,IGF1R,EPHA2,c-Abl,DMPK,CDK3, c-KIT
Signaltransduktions-	N-RAS,RAF1, mutant BRAF, BCR-ABL, AKT, NMP-

¹⁸ Falsone SF¹, Gesslbauer B, Tirk F, Piccinini AM, Kungl AJ. A proteomic snapshot of the human heat shock protein 90 interactome. FEBS Lett. 2005 Nov 21;579(28):6350-4. Epub 2005 Oct 24

Proteine	ALK, IKK, SRC
Transkriptionsfaktoren	HIF1a, mutant p53, Östrogen-Rezeptor alpha, Androgen Rezeptor, BBX, TADA 2A, Oct4, HSF-1, IRF3
Zellzyklus-Proteine	CDK4, CDK6, PLK1, WEE1, PMYT1, cyclin D, mutant RB
Anti-Apoptose-Proteine	APAF1, survivin, RIPk1, BCL2

(Adaptiert nach Rocio Garcia-Carbonero et al. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. Lancet Oncology 2013; 14: e358-69)

Zusätzlich erfüllt HSP90 Aufgaben höherer Ordnung wie posttranslationale Regulation der Signalmoleküle, Auf- und Abbau von transkriptionalen Komplexen und Modulation von Proteinen des Immunsystems.

Werden Zellen Stress ausgesetzt, erhöht sich die Syntheserate der Hitzeschockproteine im Rahmen der HSR („heat shock response“). Rasche Induktion der HSPs als Kompensationsmechanismus bei Stress resultiert aus der gut koordinierten Abfolge von genetischen und biochemischen Ereignissen, zusammengefasst als Hitzeschock-Antwort¹⁹. Vermittelt wird diese durch HSF, Hitzeschockfaktoren. Es existieren drei humane Formen von HSFs, HSF1, 2 und 4, wobei HSF1 der Schlüsselfaktor ist²⁰.

Indem HSF1 vom HSP70/90-Komplex dissoziiert, wird es aktiviert. In aktiver Form steigert es die Expression der für die HSPs verantwortlichen Gene. Da die HSP mRNA keine Introns enthält, werden HSPs in der „gestressten“ Mikroumwelt ohne die ATP abhängige posttranslationale Modifikation transkribiert²¹.

Viele Tumoren sind gekennzeichnet durch erhöhte HSP Spiegel. HSPs begünstigen das Überleben, Wachstum und Metastasierung der entarteten Zellen. Wie sehr maligne Zellen auf molekulare Chaperone angewiesen sind, zeigt zum Beispiel der

¹⁹ Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. Nat Rev Cancer 2005; 5:761-72.

²⁰ Prahlad V, Morimoto RI (Dec 2008). “Integrating the stress response: lessons for neurodegenerative diseases from C. elegans”. Trends in Cell Biology 19(2): 52-61.

²¹ Anckar J and Sistonen L. Annual Review of Biochemistry 2011; 80: 1089-1115.

Umstand, dass HSF1 knockout Mäuse eine bedeutend reduzierte Tumorentwicklung aufweisen²².

Ist die Syntheserate von HSP90 in Tumorzellen physiologisch erhöht, reflektiert diese Tatsache die Stressantwort auf die feindliche Mikroumwelt charakterisiert durch Hypoxie, Azidose und Nährstoffmangel. Noch höhere Spiegel an HSP90 ermöglichen den malignen Zellen der Apoptose zu entkommen, weil das Gleichgewicht im apoptotischen Signaltransduktionsweg durch die neoplastische Transformation gestört ist²³.

4. HSP90 als Therapieansatz in der Onkologie

Da die Funktion von cytoplasmatischem HSP90 essentiell für die Zellviabilität und Wachstum von normalen Zellen ist, war die Inhibierung von HSP90 als Therapieansatz in der Onkologie kaum vorstellbar. Dies änderte sich mit den ersten Ergebnissen von Geldanamycin Studien, als gezeigt werden konnte, dass dieser natürlich vorkommende HSP90 Inhibitor effektiv gegen maligne entartete Zellen eingesetzt werden kann²⁴.

Im Folgenden werden die Gründe erläutert, warum die Inhibierung von HSP90 mittlerweile als eine sehr vielversprechende Therapieoption angesehen wird.

Kennzeichnende Merkmale von Tumorzellen sind Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Resistenz gegen „anti-growth“ Signale, unbegrenztes Replikationspotenzial, Metastasierung / Invasion des umgebenden Gewebes, Umgehung der Apoptose und gesteigerte Angiogenese²⁵. Durch das rasche Wachstum sind entartete Zellen widrigen Verhältnissen wie Hypoxie, Azidose und Nährstoffmangel ausgesetzt. Zusätzlich weisen Onkoproteine wie BRAF oder EGFR in Tumorzellen Genmutationen auf²⁶.

²² Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF; Fritz LC et. al. A high affinity conformation of HSP90 confers tumour selectivity on HSP90 inhibitors. *Nature* 2003; 425: 407-10.

²³ Whitesell L¹, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Oct;5(10): 761-72.

²⁴ Li Y¹, Zhang T, Schwartz SJ, Sun D. New developments in Hsp 90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Updat*. 2009 Feb-Apr;12(1-2): 17-27

²⁵ Weinberg et al. *Science* 2011, Yao J et al. *Cancer Res*. 2013 Mar 1; 73(5):1449-53

²⁶ Banerji U. Heat shock protein 90 a a drug target:some like it hot. *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 1;15(1):9-14

Durch diese Faktoren geraten Tumorzellen in komplette Abhängigkeit von den Funktionen des HSP90. Denn die „feindliche“ Mikroumwelt, die typisch für Tumorzellen ist, führt ohne das Eingreifen des Multi-Chaperone-Komplexes zur Destabilisierung von Proteinen. Außerdem sind maligne Zellen angewiesen auf das Hitzeschockprotein 90, weil es in den Reifeprozess und Stabilisierung zahlreicher Onkoproteine wie BCR-ABL, ERB-B2, EGFR, AKT, MET, VEGFR etc. involviert ist. Der Abbau dieser Onkoproteine schadet den Tumorzellen mehr als den normalen Zellen. Wie abhängig entartete Zellen von HSP90 sind und, dass seine Funktionen unabdingbar für ihr Überleben sind, lässt sich an drei Auffälligkeiten darstellen.

Wie bereits am Anfang erwähnt, beträgt der Anteil von HSP90 1-2% am Gesamtproteingehalt in normalen Zellen. In maligne entarteten Zellen ist das Chaperone überexprimiert, 4-6% des Gesamtproteingehaltes sind nachweisbar²⁷. Das Hitzeschockprotein 90 in Tumorzellen zeigt eine 100fach höhere Bindungsaffinität zu 17-AAG, einem Geldanamycinderivat im Vergleich zu normalen Zellen²⁸. Dieser Umstand ermöglicht selektiven Einsatz von HSP90 Inhibitoren und räumt die eingangs bestandenen Zweifel aus, dass die Inhibierung von HSP90 mehr Schaden als Nutzen anrichten würde, aufgrund seiner wichtigen Rolle in der Homöostase der Proteine. Die aktive und funktionstüchtige Form des HSP90 ist das Dimer und stellt in Kombination mit anderen Co-Chaperonen das Multi-Chaperone-Komplex dar. In Tumorzellen liegt das HSP90 stets als Multi-Chaperone-Komplex vor und signalisiert damit seine ständige Einsatzbereitschaft.

Das Hitzeschockprotein 90 weist über 200 Substratproteine auf. Damit rückt das Chaperone noch weiter ins Rampenlicht als Zielscheibe in der Krebstherapie. Mit der Analyse der somatischen SNPs (Single-Nukleotid-Polymorphismen) der NET, war es möglich 197²⁹ protein-verändernde somatische SNPs die die Tumorgene beeinflussen, unter anderem auch HSP90, zu detektieren. Damit konnte gezeigt werden, dass HSP90 einen relevanten Angriffspunkt in der Entwicklung der neuen Therapieansätze der NET darstellt. In vitro Studien mit 17-AAG an NCI-H727 Zellen

²⁷ Chiosis G, Neckers L. Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: The explanation remains elusive. ACS Chem Biol. 2006 Jun 20;1(5):279-84

²⁸ Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. A high affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. Nature. 2003 Sep 25;425(6956):407-10

²⁹ Banck MS et al., The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors, J Clin Invest, 2013 May 15.

zeigten, dass die Inhibition von HSP90 nicht nur zum Einbruch der Zellproliferation, sondern auch zum Verlust von EGFR und IGF1R führen³⁰. Die antiproliferative Wirkung der HSP90 Inhibition korreliert mit der Reduktion des IGF-1-Rezeptors auf der Proteinebene. Da es zu hierbei ebenfalls zu einer Reduktion anderer Proteine des PI3K/AKT/mTOR Signalweges kommt, konnte durch den gleichzeitigen Einsatz sowohl von einem HSP90 Inhibitor als auch von einem mTOR- oder AKT-Inhibitor, der antiproliferative Effekt, der auf Zellzyklusarrest und Apoptose beruht, deutlich verstärkt werden³¹. Dieses Ergebnis kann als Plädoyer für eine Kombinationstherapie der NET angesehen werden.

Viele Therapieansätze scheitern daran, dass beim Inhibieren einer Tyrosinkinase, multiple parallele Signaltransduktionswege als Kompensationsmechanismus aktiviert werden. Dieses Problem kann durch den Einsatz von HSP90 Inhibitoren umgangen werden, weil dadurch simultan zahlreiche Signaltransduktionswege gehemmt werden. Chemotherapie und Strahlentherapie verursachen zellulären Stress. Das erhöht die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber den HSP90 Inhibitoren. Somit lässt sich die Effektivität des Einsatzes von HSP90 Inhibitoren in Kombination mit Chemotherapie und/oder Strahlentherapie steigern.

5. Die Entwicklung von HSP90 Inhibitoren

Die HSP90 Inhibitoren lassen sich nach unterschiedlichen Kriterien unterteilen. Eine Möglichkeit der Klassifizierung ist der Wirkungsmechanismus³². So existieren bereits Substanzen, die die ATP Bindung, welche unabdingbar für die Funktion des Chaperones ist, hemmen oder die Interaktion zwischen dem Hitzeschockprotein und seinen Co-Chaperonen unterbinden. Andere antagonisieren die Assoziierung der „client proteins“ an das HSP90. Eine weitere Substanzklasse greift in die posttranslationale Modifikation von HSP90 ein³³.

³⁰ Gilbert JA et al., Molecular markers for novel therapies in neuroendocrine (carcinoid) tumors, *Endocr Relat Cancer*, 2010 Jun 25; 17(3): 623-36

³¹ Gloesenkamp C et al., Heat shock protein 90 is a promising target for effective growth inhibition of gastrointestinal neuroendocrine tumors, *Int J Oncol*.2012 May; 40(5): 1659-67.

³² Solit D.B. & N. Rosen 2006 Hsp90: a novel target for cancer therapy. *Curr Top. Med. Chem.* 6:1205-1214

³³ Scroggins BT¹, Neckers L. Post-translational modification of heat-shock protein 90: impact on chaperone function. *Expert Opin Drug Discov.* 2007 Oct;2(10):1403-14.

Die folgende Tabelle unterteilt die bekannten HSP90 Inhibitoren nach den Substanzklassen:

Benzoquinon Ansamycine	Geldanamycin 17-AAG 17-DMAG IPI-504(Retaspimycin) IPI-493
Purinanaloga: <ul style="list-style-type: none"> • 8-Benzyl • 8-Phenylsulfanyl • 8-(7' substituiert Benzothiazolothio) • 9-Benzyl 	PU3 PU24FCI PU-H71 CNF2024 MCP-3100 CUDC-305
Resorcinol-Derivate	CCT018159 VER-49009 VER-50589 Ganetespib(STA-9090) NPV-AUY922 AT-13387 KW-2478
Andere	Novobiocin SNX-5422 DS-2248 XL-888

(Adaptiert nach Rocio-Carbonero et al Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. Lancet Oncology 2013;14: e358-69 und Paul Workman et al. Drugging the cancer chaperone HSP90: Combinatorial therapeutic exploration of oncogene addiction and tumor stress, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1113:202-216(2007))

I) Benzoquinone Ansamycine war die erste Gruppe der natürlich vorkommenden HSP90 Inhibitoren, die in den frühen 70-iger Jahren entdeckt wurde. Geldanamycin, ein Vertreter dieser Klasse ist ein Antibiotikum, das aus Streptomyces Hygroscopicus isoliert wird. Geldanamycin hemmt kompetitiv die Bindung von ATP an die Tasche an der aminoterminalen Domäne. Dadurch, dass die ATP Bindung und damit die Energieversorgung ausbleibt, verharrt das Chaperone in der ADP gebundenen Konformation und ist nicht in der Lage sich um das „client protein“ zu legen. Es folgt daraus die Ubiquitinierung und die proteasomale Degradation der Proteine. Obwohl Geldanamycin in präklinischen Studien potente Antitumor-Eigenschaften zeigte, wird der Substanz aufgrund hoher Hepatotoxizität geringe klinische Bedeutung

beigemessen. So wurden Geldanamycin Derivate wie das 17-AAG (17-allylamino-17desmethoxygeldanamycin), das 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17demethoxygeldanamycin) und das IPI-504 (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinon hydrochlorid) synthetisiert. Das 17-AAG wurde 1999 in klinischen Phase I Studien überprüft und es zeigten sich frühe Anzeichen therapeutischer Aktivität in Melanomen, Mamma-Ca, Prostata-Ca und Multiplem Myelom³⁴. Das 17-DMAG ist ein stärker wasserlösliches Analogon von 17-AAG, es erreichte die klinische Phase I und II Studien und zeichnet sich durch höhere orale Verfügbarkeit, niedrigere Toxizität und höhere Stabilität aus³⁵.

Radicicol ist ein weiterer natürlich vorkommender HSP90 Inhibitor. Dabei handelt es sich um ein makrocyclisches Antibiotikum, das aus *Monocillium nordinii* und *Monosporium bonorden* isoliert wird und das wie Geldanamycin kompetitiv die Bindung von ATP an der aminoterminalen Domäne inhibiert. Aufgrund der chemischen und metabolischen Instabilität konnte die Antitumor-Aktivität nur in vitro, jedoch nicht in vivo nachgewiesen werden³⁶.

Ein anderer HSP90 Inhibitor ist Novobiocin, ein Coumarin-Antibiotikum, isoliert aus *Streptomyces* Spezies, das an die ATP-Tasche am carboxyterminalen Ende bindet. Allerdings zeigt es nur eine geringe Aktivität³⁷.

II) Da die Inhibierung von HSP90 sich als ein sehr vielversprechender Therapieansatz herausstellte, bemühte man sich, parallel zur Suche nach natürlich vorkommenden HSP90 Inhibitoren, niedermolekulare Inhibitoren zu synthetisieren. Dank der Kristallstrukturanalyse der aminoterminalen Domäne des Chaperones, des Hochdurchsatz-Tests (HTS) und dem auf Struktur basierendem Design gelang die Entwicklung einer Reihe von HSP90 Inhibitoren. Die erste Gruppe beruht auf dem Purin-Gerüst und ahmt das ATP Molekül nach. PU3 stellte das Pioniermolekül dar

³⁴ da Rocha Dias S, Friedlos F, Light Y, Springer C, Workman P, Marais R. Activated B-RAF is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino--17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10686-91

³⁵ Hollingshead M, Alley M, Burger AM, Borgel S, Pacula-Cox C, Fiebig HH, Sausville EA. In vivo antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005 Aug;56(2):115-25. Epub 2005 Mar 25

³⁶ Neckers L. Using natural product inhibitors to validate Hsp90 as a molecular target in cancer. *Curr Top Med Chem.* 2006;6(11):1163-71

³⁷ Marcu MG, Chadli A, Bouhouche I, Catelli M, Neckers LM. The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J Biol Chem.* 2000 Nov 24;275(47):37181-6

und sein Einsatz erzeugte mit Geldanamycin vergleichbare biologische Effekte. Die Derivate dieser Klasse lassen sich in 8-Benzyl, 8-Phenylsilylfanyl, 8-(7'substituiert Benzothiazolothio) und 9-Benzyl Purinderivate einteilen. Insgesamt zeichnen sich die HSP90 Inhibitoren, die auf dem Purin-Gerüst basieren, durch Unempfindlichkeit zu Mehrfacharzneimittelresistenz, Wasserlöslichkeit, orale Verfügbarkeit und metabolische Stabilität aus. Um ein Beispiel dieser Substanzen anzuführen, CNF-2024, ein oral verfügbares 9-Benzyl Purinderivat erreichte die Phase I der klinischen Studien und wurde getestet bei chronisch lymphatischer Leukämie, fortgeschrittenen soliden Tumoren, Lymphomen und Mamma-Ca³⁸. Pyrazole sind eine weitere wichtige Klasse der synthetischen niedermolekularen HSP90 Inhibitoren. Die Tatsache, dass die Pyrazole zum Abbau der „client proteins“ und zum Anstieg des HSP70 Spiegels führen - was als Marker für die erfolgreiche Inhibierung des Hitzeschockproteins 90 gilt- zeugt von relevanter Aktivität dieser Substanzen. Ein wichtiger Vertreter ist NPV-AUY922³⁹, eine der beiden Substanzen, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird und die für die Experimente, auf deren Ergebnis die vorliegende Arbeit beruht, eingesetzt wurde.

- Die Bindung von ATP an die aminoternale Domäne ist die direkteste und naheliegendste Methode um HSP90 zu hemmen, jedoch nicht die einzige. Wie bereits oben beschrieben, kooperiert HSP90 mit zahlreichen Co-Chaperonen um seine Aufgaben erfüllen zu können und ist erst als Komplex funktionsfähig. Eine der Möglichkeiten ist die Unterbindung der Interaktion zwischen HSP90 und cdc37⁴⁰. Cdc37 fungiert als Adaptor zwischen dem HSP90 Komplex und „client proteins“ wie EGFR, Raf-1, Cdk4 und Src. Bleibt die Bindung aus, wird damit der Reifeprozess der Proteine verhindert. Dieser Ansatz ist auch insofern interessant, dass dabei der kompensatorische Anstieg von HSP70, im Gegensatz zu anderen HSP90 Inhibitoren, fehlt. Desweiteren besteht die Möglichkeit die Aha1/HSP90 Interaktion zu hemmen. Aha1 triggert die ATPase Aktivität von HSP90.

Eine Herausforderung stellt die Inhibition der HSP90/„client proteins“ Assoziation dar. Aktuell sind noch viele Details darüber, wie HSP90 und seine

³⁸ Chiosis G, Tao H. Purine-scaffold Hsp90 inhibitors. IDrugs. 2006 Nov;9(11):778-82.

³⁹ Brough PA¹, Aherne W, Barril X, et al. 4,5-diarylisoazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer. J Med Chem. 2008 Jan 24;51(2):196-218. Epub 2007 Nov 20

⁴⁰ Smith JR¹, Workman P. Targeting CDC37: an alternative, kinase-directed strategy for disruption of oncogenic chaperoning. Cell Cycle. 2009 Feb 1;8(3):362-72. Epub 2009 Feb 2

Substratproteine miteinander in Aktion treten unklar, jedoch gilt es diesen Ansatz weiter zu erforschen, denn er bietet einen entscheidenden Vorteil gegenüber den übrigen HSP90 Inhibitoren, die hohe Selektivität.

6. NVP-AUY 922 und NVP-HSP990

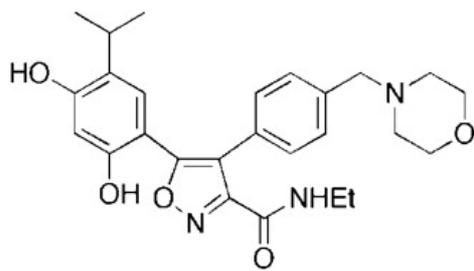
Bei den beiden HSP90 Inhibitoren, NVP-AUY922 und NVP-HSP990, die vom pharmazeutischen Unternehmen Novartis, Basel, zur Verfügung gestellt wurden, handelt es sich um keine Derivate von Geldanamycin. In vitro und in vivo Experimente durchgeführt sowohl an primären Tumorzellen als auch an Tiermodellen für Multiples Myelom, Magenkarzinom, NSCLC, HCC, Sarkome und Mamma-Ca zeigten signifikante antitumorale Aktivität der beiden Substanzen⁴¹.

NVP-AUY922 ist ein 4,5-diaryloxazole HSP90 Inhibitor aus der zweiten Klasse der synthetischen HSP90 Inhibitoren, der Pyrazole Resorcinole. Es bindet an die ATP Bindungstasche an der aminoterminalen Domäne mit einer Affinität von $1,7 \pm 0,5$ nmol/L. Die Bindungsenthalpie beträgt -12,24 kcal/mol. NVP-AUY922 ist effektiv auch unter hypoxischen Bedingungen und ist unabhängig vom NQO1/DT-diaphorase Metabolismus.

Derzeit wird NVP-AUY922 an soliden Tumoren wie Mamma-Ca, Multiples Myelom, Nichtkleinzelliges Bronchial-Ca, Adeno-Ca des Pankreas, GIST und bei hämatoonkologischen Erkrankungen in sieben klinischen Studien Phase I und dreizehn Phase II Studien eingesetzt⁴².

⁴¹ Eccles SA¹, Massey A, Raynaud FI et al. NVP- AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2850-60.

⁴² NIH Clinical Trials.gov



NVP-AUY922
VER-52296

NVP-HSP990 ist ebenfalls ein oral bioverfügbare HSP90 Inhibitor und wird aktuell in zwei Studien Phase I bei Patienten mit soliden Tumoren eingesetzt (NIH Clinical Trials.gov).

Folgende Tabellen geben einen Überblick über die derzeit laufenden Studien zu den beiden HSP90 Inhibitoren (NIH Clinical Trials.gov) – Stand 01/2014:

NVP-AUY922:

Phase II Studien			
Status	Identifier	Studiename	Entität
Completed	NCT01854034	Phase I-II Study to Determine the Maximum Tolerated Dose (MTD) of AUY922 in Advanced Solid Malignancies, and Efficacy in HER2+ or ER+ Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer Patients	Mamma-Ca
Not yet recruiting, active	NCT01484860	HSP90 Inhibitor AUY922 and Erlotinib Hydrochloride in Treating Patients With Stage IIIB-IV Non-Small Cell Lung Cancer	Nichtkleinzelliges Bronchial-Ca
Recruiting	NCT01668173	Study of AUY922 and Cetuximab in Patients With KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer	Metastasiertes Colon-Ca
Not yet recruiting, active	NCT01485536	A Study of the Hsp90 Inhibitor AUY922 Plus Capecitabine for the Treatment of Patients With Advanced Solid Tumors	Solide Tumoren
Completed	NCT01271920	Imaging HSP90 Inhibitor AUY922 on VEGF-89ZR-bevacizumab Positron Emission Tomography (PET)	Mamma-Ca
Recruiting	NCT01646125	Study of AUY 922 in metastatic pancreatic cancer who are resistant to first line chemotherapy	Pankreas-Adeno-Ca
Recruiting	NCT01752400	PI3K Inhibitor BYL719 in combination with the HSP90 Inhibitor AUY922 in patients with advanced or metastatic gastric cancer	Magen-ca
Recruiting	NCT01084330	A study of the HSP90 Inhibitor AUY 922	Lymphom
Recruiting	NCT01404650	Phase Ib study of LDK 378 and AUY 922 in ALK-rearranged Non-small cell lung cancer	Nichtkleinzelliges Bronchial-Ca
Recruiting	NCT01402401	An open-label, randomized phase II study to evaluate the efficacy of AUY 922 vs Pemetrexed or Docetaxel in NSCL patients with EGFR mutations	Nichtkleinzelliges Bronchial-Ca
Recruiting	NCT01389583	Study of Hsp90 Inhibitor AUY 922 for the treatment of patients with refractory gastrointestinal stromal tumor	GIST
Terminated	NCT01922583	Phase II of AUY 922 in second-line gastric cancer in combination with trastuzumab in HER2 positive patients	Magen-Ca
Recruiting	NCT01124864	A study of AUY922 for GIST (gastrointestinal stromal tumor) patients	GIST

Phase I Studien			
Status	Identifier	Studiename	Entität
Terminated	NCT01602627	Hsp90 Inhibitor AUY922 in Treating Older Patients With Advanced Solid Malignancies	Solide Tumoren
Recruiting	NCT01613950	PI3K Inhibitor BYL719 in Combination With the HSP90 Inhibitor AUY922 in Patients With Advanced or Metastatic Gastric Cancer	Magen-Ca
Recruiting	NCT01772797	Phase Ib Study of LDK378 and AUY922 in ALK-rearranged Non-small Cell Lung Cancer	Nichtkleinzelliges Bronchial-Ca
Recruiting	NCT01294826	Study of AUY922 and Cetuximab in Patients With KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer	Metastasiertes Colon-Ca
Completed	NCT01132625	Dose Escalation Study of AUY922 in Advanced Solid Malignancies in Japan	Solide Tumoren
Active, not yet recruiting	NCT01226732	A Study of the Hsp90 Inhibitor AUY922 Plus Capecitabine for the Treatment of Patients With Advanced Solid Tumors	Solide Tumoren
Not yet recruiting	NCT01784640	Pemetrexed Disodium and Hsp90 Inhibitor AUY922 in Treating Patients With Previously Treated Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer	Nichtkleinzelliges Bronchial-Ca

Phase I/II Studien			
Status	Identifier	Studiename	Entität
Completed	NCT01081600	⁸⁹ Zr-trastuzumab PET for Imaging the Effect of HSP90 Inhibition	Mamma-Ca
Completed	NCT00708292	A Phase I-Ib/II Study to Determine the Maximum Tolerated Dose (MTD) of AUY922 Alone and in Combination With Bortezomib, With or Without Dexamethasone, in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma.	Multiples Myelom
Completed	NCT00526045	Phase I-II Study to Determine the Maximum Tolerated Dose (MTD) of AUY922 in Advanced Solid Malignancies, and Efficacy in HER2+ or ER+ Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer Patients	Mamma-Ca
Active, not yet recruiting	NCT01259089	Hsp90 Inhibitor AUY922 and Erlotinib Hydrochloride in Treating Patients With Stage IIIB-IV Non-Small Cell Lung Cancer	Nichtkleinzelliges Brnchial-Ca

Withdrawn	NCT01361945	AUY922 With Lapatinib and Letrozole for ER+ HER2+ Advanced Breast Cancer	Mamma-Ca
Completed	NCT01081613	Imaging HSP90 Inhibitor AUY922 on VEGF-89ZR-bevacizumab Positron Emission Tomography (PET)	Mamma-Ca
Unknown	NCT01024283	Analysis of Pharmacodynamic Changes With AUY922A, an HSP90 Inhibitor	Solide Tumoren

NVP-HSP990:

Phase I Studien			
Status	Identifier	Studiename	Entität
Completed	NCT00879905	A Study of HSP990 Administered by Mouth in Adult Patients With Advanced Solid Tumors	Solide Tumoren
Terminated	NCT01064089	Dose Escalation of HSP990 in Japan/Korea	Solide Tumoren

III. Neuroendokrine Tumoren

1. Definition

Der Begriff „neuroendokrin“ beherbergt zwei wichtige Eigenschaften der Neuroendokrinen Tumorzellen, zum einen die Herkunft aus dem neuroendokrinen System und zum anderen die Fähigkeit, zelltypspezifische Peptidhormone und Generalmarker wie Synaptophysin und Chromogranin A zu produzieren und sezernieren. Chromogranin A ist ein Glykoprotein und eines der Bausteine der Vesikel im neuroendokrinen System, die als Speicher für produzierte Peptidhormone dienen. CgA gilt als etablierter Tumormarker im Serum für neuroendokrine Tumoren. Synaptophysin wird in den vesikulären Granula im Serum normaler und entarteter NET Zellen gespeichert und ist immunhistochemisch in allen NETs nachweisbar. Das neuroendokrine Zellsystem des menschlichen Körpers lässt sich grob in zwei Bestandteile aufteilen: Es sind zum einen Zellansammlungen, welche die Hormondrüsen, wie Hypophyse, Nebenschilddrüsen, Nebenniere bilden und zum anderen das diffuse neuroendokrine System, DNES. Dieses besteht aus 17

unterschiedlichen Zellarten⁴³. Ansässig sind diese Zellen in Organen wie Haut, Thymus, Lunge, Schilddrüse, Pankreas, gastrointestinaler, biliärer und urogenitaler Trakt. Über den Ursprung und die Entwicklung der neuroendokrinen Zellen gab es zahlreiche, teilweise kontroverse Meinungen. In den 60er Jahren vertrat man die Meinung, dass das neuroendokrine Zellsystem durch die Migration aus der Neuralleiste zu entsprechenden Organen entstand⁴⁴. Heutzutage ist am populärsten die sogenannte „Unitarische Theorie“ der intestinalen Cytogenese. Diese besagt, dass alle gastrointestinalen Zellarten aus Stammzell-Vorläuferzellen abstammen, die entweder in der Basis der intestinalen Krypten oder in der vorderen Region der Magendrüsen lokalisiert sind. Allgemein gilt, dass neuroendokrine Zellen ausdifferenziert sind und wie durch die fehlende Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in Chromogranin A exprimierenden Zellen aufgezeigt, nicht in der Lage sind zu proliferieren⁴⁵. Demzufolge sind neuroendokrine Tumoren das Produkt maligner Entartung entweder der ausdifferenzierten neuroendokrinen Zellen oder der Vorläufer- bzw. Stammzellen. Während ein DNA-Schaden bei neuroendokrinen Vorläuferzellen zu wenig differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (NEC) führt, entstehen neuroendokrine Tumoren oder gut differenzierte Karzinome aus bereits teilweise differenzierten Zellen⁴⁶.

Neuroendokrine Zellen vereinen in sich die phänotypische Eigenschaft der Neuronen, indem sie bestimmte Proteine wie Synaptophysin, neuronenspezifische Enolase und Chromogranin A exprimieren und die physiologische Rolle der endokrinen Zellen, zu sezernieren und regulieren.

1867 beschrieb Otto Lurbsch zum ersten Mal einen „neuroendokrinen Tumor“.⁴⁷

⁴³ The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, Langenbecks Arch Surg (2011) 396: 273-298

⁴⁴ Pearse AG (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. J Histochem 17(5): 303-313

⁴⁵ Barrett P, Hobbs RC, Coates PJ, Risdon RA, Wright NA, Hall PA (1995) Endocrine cells of the human gastrointestinal tract have no proliferative capacity. Histochem J 27(6): 482-486

⁴⁶ Helpap B, Kollermann J (2001) Immunohistochemical analysis of the proliferative activity of neuroendocrine tumors from various organs. Are there indications for a neuroendocrine tumor-carcinoma- sequence? Virchows Arch 438(1): 86-91

⁴⁷ Lurbarsch, O. (1867). Über den primären Krebs des Ileum, nebst Bemerkungen über das gleichzeitige Vorkommen von Krebs und Tuberkulose

Siegfried Oberndorfer berichtete 1907 als Erster über Tumore des Dünndarms und prägte in diesem Zusammenhang den Begriff des „Karzinoids“⁴⁸. Initial stufte er sie als „benigne“ ein, 1929 revidierte er seine Meinung⁴⁹.

Obwohl NETs als eine seltene Erkrankung betrachtet worden waren, konnte durch die Erhebung der epidemiologischen Daten gezeigt werden, dass die Inzidenz aktuell, je nach Quelle zwischen 1-2/2,5-5 pro 100.000/Jahr liegt und, dass die Inzidenz in den letzten 30 Jahren steigende Tendenz bei gleichbleibender 5-Jahresüberlebensrate von ca. 60 % aufweist.

Unter dem Begriff „neuroendokrine Tumoren“ werden insgesamt 50 heterogene Entitäten zusammengefasst. Über 95 % treten sporadisch auf⁵⁰. In weniger als 5% der Fälle wird das Auftreten von NETs familiär vererbt oder ist mit einem der folgenden Syndrome assoziiert: MEN 1, Von-Hippel-Lindau-Syndrom, Neurofibromatosis 1, oder Tuberöse Sklerose.

Es existieren zahlreiche Einteilungen und Klassifikationen. Eine klinische Unterteilung erfolgt in „funktionelle“ und „nicht-funktionelle“ NETs bezüglich der Produktion und Sekretion von bioaktiven Peptiden und Aminen, welche im Falle der funktionellen NETs mit einem hypersekretorischen Symptomenkomplex assoziiert sind.

2. Klassifikation

Nach der Klassifikation von Williams & Sandler 1963 wurden die gastroenterologischen-neuroendokrinen Tumoren nach der Embryogenese in Vorderdarm (Lunge, Ösophagus, Magen, Duodenum, Leber, Pankreas), Mitteldarm (Jejunum, Ileum, Appendix, Zöcum) und Hinterdarm (Colon und Rectum) unterteilt⁵¹.

⁴⁸ Oberndorfer and His Successors: From Carcinoid to Neuroendocrine Carcinoma. *Endocr Pathol* (2007) 18:141–144 DOI 10.1007/s12022-007-0021-9)

⁴⁹ Irvin M Modlin et al: Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, *Lancet Oncol* 2008; 9: 61-72

⁵⁰ Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruzniewski P, Sundin A (2008) Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 9(1): 61-72

⁵¹ Williams ED, Sandler M: the classification of carcinoid tumors. *Lancet* 1963; 1(7275): 238-9

Abgelöst wurde die Klassifikation nach Williams & Sandler durch die 2000 erschienene WHO (World Health Organization) Klassifikation, die 2004 und 2010 jeweils aktualisiert wurde. Demnach wird als „neuroendokrine Neoplasie (NEN)“ eine Neoplasie bezeichnet, welche die Expression von neuroendokrinen Markern wie Chromogranin A und / oder Synaptophysin in Tumorzellen aufweist. Desweiteren umfasst der Begriff „neuroendokrine Neoplasie“ niedrig-, mittel- und hochgradige Tumoren. Als neuroendokriner Tumor (NET) werden niedrig- bis mittelgradige Neoplasien bezeichnet. Der Begriff neuroendokrines Karzinom (NEC) ist nur hochgradigen Neoplasien vorbehalten und wird nun anstatt „wenig differenziertes Karzinom“ verwendet⁵². Das Grading der Tumoren in der aktuellen WHO Klassifikation wird durch Proliferationsindex (Ki-67, MIB-1) und die Mitosezahl bestimmt⁵³. MIB-1 ist der monoklonale Antikörper zur immunhistochemischen Anfärbung des Ki-67 Proteins, das zur Markierung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation geeignet ist, weil der Großteil des Proteins während der Mitose an die Oberfläche des Chromosoms verlagert ist.

Die WHO Klassifikation 2010 geht von der Annahme aus, dass alle gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (NEN) potenziell maligne sind, sich jedoch in der Tumorbilogie und dem Wachstumsverhalten unterscheiden. So werden unter neuroendokrinen Tumoren (NET) gut differenzierte neuroendokrine Neoplasien zusammengefasst und gemäß ihrem Grading als G1 (Proliferationsindex Ki-67 < 2 % aller Tumorzellen) und G2 (Proliferationsindex Ki-67 3 – 20 % aller Tumorzellen) Tumoren bezeichnet. Als neuroendokrine Karzinome G3 (Proliferationsindex Ki-67 > 20 %) werden alle wenig differenzierten neuroendokrinen Neoplasien bezeichnet. Zusätzlich werden die NECs in kleinzellige und großzellige Formen unterteilt⁵⁴.

Da weltweit zur Beurteilung von Tumoren das TNM-System (Tumor, Metastase, Lymphknoten) herangezogen wird, wurde auch für neuroendokrine Tumoren eine

⁵² ENETS 2011 Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Tumors: An Update

⁵³ Kloppel G, Perren A, & Heitz, P.U. (2004) The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1014, 13-27

⁵⁴ Rindi G, Arnold R, Bosman FT, et al.: Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. In Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds). *WHO classification of tumors of the digestive system*. Lyon: IARC 2010

TNM-Stadieneinteilung zunächst von der ENETS vorgeschlagen⁵⁵. Diese wurde in weiten Teilen von der UICC (International Union Against Cancer), 7-Auflage 2009 und dem AJCC (American Joint Cancer Committee) übernommen. Unterschiede bei den beiden TNM-Einteilungen finden sich lediglich bei Pankreas und Appendix⁵⁶. Folgende Tabelle zeigt die TNM-Stadieneinteilung für Magen, Dünndarm, Pankreas, Appendix und Kolon, wobei bei Tumoren des Kolons und Rektums zusätzlich zwischen Ia und Ib unterschieden wird⁵⁷.

Stadium	0	Tis	N0	M0
Stadium	I	T1	N0	M0
Stadium	Ila	T2	N0	M0
Stadium	Ilb	T3,T4	N0	M0
Stadium	IIla	T4	N0	M0
Stadium	IIlb	Jedes T	N1	M0
Stadium	IV	Jedes T	Jedes N	Jedes M

Ergänzt wurde die Klassifikation durch das Graduierungssystem für alle GEP-NETs gemeinsam. Es berücksichtigt die proliferative Aktivität, gemessen am Ki-67 Index und an der Mitosezahl:

Grade	Mitosezahl (2mm ²)	MIB-1-Index in %
G1	<2	<2
G2	2-20	3-20
G3	>20	>20

⁵⁵ (2006) TNM staging of foregut neuro(endocrine) tumors: a consensus proposal including a grading system. Virchows Arch 449:395-401/ (Rindi G, Kloppel G, Couvelard A et al (2007) TNM staging of midgut and hindgut (neuro)endocrine tumors a consensus proposal including a grading system. Virchows Arch 451: 757-762

⁵⁶ Günter Klöppel & Guido Rindi & Aurel Perren & Paul Komminoth & David S. Klimstra The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. Virchows Arch (2010) 456:595–597 DOI 10.1007/s00428-010-0924-6. Günter Klöppel Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. SUPPLEMENT PAPER Endocrine-Related Cancer (2011) 18 S1–S16.

⁵⁷ CJ Auernhammer, G Assmann, P Bartenstein, K Becker, P Berberat, B Göke, M Gross, AL Grosu, V Heinemann, T Helmberger, K Herrmann, H Höfler, J Hoffmann, RT Hoffmann, A Perren, G Pöpperl, St. U Pigorsch, K Scheidhauer, C Spitzweg, H Waldner, W Weiß, H Vogelsang: Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes, 2008, MANUAL, by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München

Aufgrund des klinischen Bedarfs nach standardisierten Leitlinien für die Klassifikation, Diagnostik und Therapie der Patienten mit neuroendokrinen Tumoren des GastroEnteroPankreatischen Systems erfolgte im Jahre 2004 die Gründung der ENETS (European Neuroendocrine Tumor Society) und am 21. Februar 2007 die Gründung der NANETS (North American Society of Neuroendocrine Tumors). Folgende Kapitel geben einen Überblick zu Epidemiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie der GEP-NETs. Dabei wurden insbesondere die Leitlinien der ENETS 2012 berücksichtigt.

3. Metastasierungshäufigkeit von NET in Abhängigkeit von der Primariuslokalisation

Da bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung neuroendokrine Neoplasien des GastroEnteroPankreatischen Systems – bei Primariuslokalisation im Jejunum /Ileum oder im Pankreas - häufig synchrone Lebermetastasen aufweisen ⁵⁸, stellen insbesondere NET mit diesen Primariuslokalisationen eine onkologische Herausforderung im klinischen Alltag dar. Andere Primariuslokalisationen wie Appendix, Rektum oder Magen sind dagegen bei Diagnosestellung meist noch in lokalisierten Tumorstadien ohne stattgehabte Metastasierung. Anhand der Fünf-Jahresüberlebensraten der Patienten mit NET ohne Metastasen von 75-99%⁵⁹ und der Patienten mit NET mit Lebermetastasen von 13-54%, sieht man, dass das Vorhanden von Lebermetastasen unabhängig von der Primariuslokalisation, einen entscheidenden prognostischen Faktor darstellt. Die Tatsache, dass 28% der GEP NET im Jejunum/Ileum lokalisiert sind und 45% davon in die Leber metastasieren und dass 16% der GEP NET im Pankreas detektiert werden und 42% von diesen ebenfalls Lebermetastasen aufweisen, erfordert sowohl eine Optimierung der Therapie der Lebermetastasen als auch eine individualisierte Patientenbetreuung. Zu diesem Anlass trafen sich am 12. Dezember 2013 in London sieben nationale und internationale Organisationen zu einer Konferenz, organisiert von E-AHPBA (European-African Hepato-Pancreato-Biliary Association). Unter anderem erging hier

⁵⁸ Pape UF, Berndt U, Muller-Nordhorn J, et al. Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 1083-97.

⁵⁹ Rindi G, D'Adda T, Froio E, Fellegara G, Bordi C. Prognostic factors in gastrointestinal endocrine tumors. *Endocr Pathol* 2007; 18: 145-49.

die Empfehlung zur Detektion von Lebermetastasen und Nachsorgeuntersuchungen mittels des Tumormarkers Chromogranin A, zur Diagnostik resektabler Lebermetasen mit kurativem Ansatz mittels Magnetresonanztomographie und, dass die Resektion der Lebermetastasen das Mittel der Wahl für Patienten mit komplett resezierbaren Lebermetasen Grad 1 und 2 wäre.⁶⁰

4. NET des Pankreas

Bei fortgeschrittenen inoperablen pankreatischen NETs stehen bisher zwei molekular-zielgerichtete Medikamente- Everolimus und Sunitinib - als Option zur Verfügung. Everolimus oder Sunitinib gelten nach der ENETS-Leitlinie als Option nach Therapieversagen einer systemischen palliativen Chemotherapie mit Streptozotocin / 5-FU oder Capecitabin / Temozolomid, wenn gleich eine evidenzbasierte Rationale für eine Therapiesequenz aufgrund des Mangels an randomisierten Vergleichsstudien nicht existent ist.

5. Jejuno-Ileale NETs

Nach pankreatischen NETs bilden jejuno-ileale Neoplasien die größte Gruppe der NETs und ein Drittel bis die Hälfte aller Dünndarmtumoren. Diese wurden früher unter dem Begriff „Karzinoid“, zum ersten Mal 1907 von Oberndorfer, zusammengefasst⁶¹. Die beschriebene Inzidenz variiert je nach Land zwischen 0.32/100,000 in England⁶² und 1.12/100,000 in Schweden⁶³. Die Prognose hängt vom Grading und TNM Staging ab, so beschreibt Jann et al. eine Grading abhängige Fünfjahres-Überlebensrate für G1 von 93,8%, für G2 von 83,0% und für G3 50,0%⁶⁴. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 60.-65. Lebensjahr. Ist der Tumor funktionell inaktiv, so können unspezifische Symptome wie abdomineller Schmerz, Gewichtsverlust, Fatigue oder unklares Fieber die Vorstellung des Patienten beim Arzt veranlassen. 20-30% der Patienten mit metastasiertem NET des Dünndarms

⁶⁰ Frilling A et al. Recommendations for management of patients with neuroendocrine liver metastases. *Lancet Oncology* 2014; 15: e8-21.

⁶¹ Oberndorfer S: Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol* 1907; 1:426-423.

⁶² Ellis L, Shale MJ, Coeman MP: Carcinoid tumors of the gastrointestinal tract: trends in incidence in England since 1971. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2563-2569.

⁶³ Landerholm K, Falkmer s, Järhult J: Epidemiology of small bowel carcinoids in a defined population. *World J Surg* 2010; 34: 1500-1505.

⁶⁴ Jann H, Roll S, Couvelard A et al: Neuroendocrine tumors of midgut and hindgut origin: tumor-node-metastasis classification determines clinical outcome. *Cancer* 2011; 117: 3332-3341.

leiden an dem sogenannten „Karzinoid-Syndrom“, das sich typischerweise durch Flushs und sekretorischer Diarrhoe, sowie in einem Teil der Fälle durch Endokardfibrose des rechten Herzen, „Hedinger Syndrom“ oder Bronchoobstruktion äußert. Ausgelöst wird das Syndrom durch die Hypersekretion von Serotonin. Da Serotonin bei Lebermetastasen durch die Umgehung des portalvenösen Kreislaufes nicht in der Leber abgebaut wird, weisen 95% der Patienten mit Lebermetastasen die Symptome des Karzinoid-Syndroms auf⁶⁵.

Bei jedem Patienten mit einem neuroendokrinen Dünndarmtumor sollte in einer interdisziplinären Sitzung die Möglichkeit der chirurgischen Resektion evaluiert werden. Eine segmentale Resektion mit Lymphadenektomie verbessert das Überleben deutlich. Die Durchführung einer neoadjuvanten oder adjuvanten Chemotherapie bietet nach aktueller Studienlage keinen Vorteil bezüglich der Überlebensrate. Auch wenn durch die chirurgische Resektion kein kurativer therapeutischer Ansatz möglich ist, profitieren die Patienten mit metastasiertem jeuno-ilealen NET von der palliativen Chirurgie. Das gilt vor allem für Patienten mit dem Karzinoid-Syndrom oder wenn der Tumor durch seine Lage oder Größe eine Dünndarmobstruktion verursachen könnte. Wichtige palliative Therapieoptionen sind neben lokal-ablativen Verfahren bei Lebermetastasierung, die Biotherapie mit den Somatostatinanaloga Octreotid oder Lanreotid, die Radiorezeptortherapie mit ¹⁷⁷Lu-DOTATATE, oder Everolimus off label⁶⁶.

6. Molekular zielgerichtete medikamentöse Therapie der NET

Unter dem Begriff neuroendokrine Neoplasien (NEN) werden circa 40 Tumorentitäten zusammengefasst. Aufgrund der Heterogenität war und ist es sehr schwierig eine effektive Therapie anzubieten.

Während sich mit der Zytostatikatherapie jeweils initiale Remissionsraten von 40-60%⁶⁷ bei schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (NEC) und bei pankreatischen neuroendokrinen Tumoren (NET) erreichen lassen, weist die Zytostatikatherapie nur eine sehr begrenzte Effektivität bei gastrointestinalen

⁶⁵ Ahmed A, Turner G, King B, et al: Midgut neuroendocrine tumours with liver metastases: results of the UKINETS study. *Endocr relat cancer* 2009; 16: 885-894.

⁶⁶ Pavel et al. *Lancet* 2011 Radiant-2 Studie; ESMO Leitlinie 2012, ENETS Leitlinie 2012

⁶⁷ Vilar E, Salazar R, Perez-Garcia J, et al: Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:221-232.

neuroendokrinen Tumoren (NET) auf. Alle anderen uns derzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen ermöglichen keinen kurativen Ansatz und weisen zudem eine zeitlich limitierte Effektivität auf⁶⁸. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren und wird viel auf dem Gebiet der molekular zielgerichteten Therapie, mit dem Ziel die Remissions- und Überlebensraten zu erhöhen, geforscht.

Die Tatsache, dass NET in 80-95% der Fälle Somatostatinrezeptoren (SSTR) auf der Tumorzelloberfläche exprimieren, führte dazu, dass seit Mitte der 1980er Jahre Somatostatinanaloga und Interferon-alpha zur Symptomkontrolle und Hemmung der hormonellen Hypersekretion eingesetzt werden. Dieses Ziel wird in 60-75% der Fälle erreicht⁶⁹. Somatostatin ist ein endogenes Peptid, das über G-Protein gekoppelte transmembranäre Rezeptoren mit fünf Subtypen⁷⁰ agiert. Hemmung der Ausschüttung des Wachstums- und anderer Hormone wie Insulin, Glucagon und Gastrin sowie Hemmung der Angiogenese zählen zu den indirekten Effekten der Somatostatinrezeptor-Aktivierung. Als direkte Effekte sind Hemmung des Zellzyklus und Auslösen der Apoptose bekannt. Damit lässt sich, der von einzelnen Studien berichtete antiproliferative Effekt der Somatostatinanaloga, vor allem bei langsam wachsenden metastasierten NET mit limitiertem Befall der Leber⁷¹, erklären. Octreotid und Lanreotid sind derzeit zugelassene Somatostatinanaloga.

Die zweite der aktuell drei vorhandenen Säulen in der Therapie der NET ist die Hemmung der Angiogenese. Da die Hypervaskularisation eine der Voraussetzungen für den Tumorprogress ist, rücken hiermit der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 und *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) als Angriffspunkte in der Therapie in den Vordergrund. An dieser Stelle sind vor allem zwei Substanzen, Bevacizumab und Sunitinib, von großer Bedeutung. Bevacizumab (Avastin) ist ein monoklonaler Antikörper, der den zirkulierenden VEGF bindet. In einer Phase II Studie mit 44 Patienten mit fortgeschrittenen Karzinoidtumoren konnte durch die Kombination von Bevacizumab

⁶⁸ Pavel et al., Translation of molecular pathways into Clinical Trials of Neuroendocrine Tumors, *Neuroendocrinology*, April 11, 2012

⁶⁹ Auernhammer CJ, Spitzweg C, Heinemann V, Göke B: Medicinal therapy of metastasized neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system, *Internist (Berl)*. 2012 Feb 2.

⁷⁰ Patel YC: Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest* 1997;20:348-367.

⁷¹ Boussaha T, Rougier P, Taieb J, Lepere C: Digestive neuroendocrine tumors (DNET): The era of targeted therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013 Apr;37(2):134-41.

mit Octreotid LAR bei 18% der Patienten eine partielle Remission erreicht werden⁷². Sunitinib (Sutent) ist ein oraler klein-molekularer Tyrosinkinase-Inhibitor, der VEGF und PDGF-Rezeptoren hemmt. Die anti-Tumoraktivität von Sunitinib wurde in einer international angelegten, randomisierten Phase III Studie mit 171 Patienten mit pankreatischen NET belegt. Hier konnte ein deutlicher Vorteil von Sunitinib gegenüber Placebo anhand des Progress-freien Überlebens 11,4 versus 5,5 Monaten erreicht werden⁷³. Weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren, die noch in Phase II Studien untersucht werden sind Sorafenib, Pazopanib, Vatalanib und Axitinib.

Die dritte Säule in der Therapie der NET ist der PI3K/AKT/mTOR Signaltransduktionsweg, der eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation, Zellüberleben, Induktion der Apoptose und Angiogenese einnimmt. Temsirolimus und Everolimus sind zwei Vertreter der Rapamycin-Derivate, die die Aktivität von mTOR hemmen. Der orale mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001) führte in 60-73% bei Patienten mit pankreatischen NET und in 80-84% bei Patienten mit Karzinoidtumoren zu einer Tumorstabilisation⁷⁴. In RADIANT-3, einer prospektiven, randomisierten, Phase III Studie konnte gezeigt werden, dass Everolimus das Progress-freie Überleben der Patienten mit fortgeschrittenen pankreatischen NETs verlängerte.⁷⁵ Eine weitere Placebo kontrollierte, randomisierte, Phase 3 Studie, RADIANT-2 ergab, dass die Therapie mit Everolimus kombiniert mit Octreotid LAR das Progress-freie Überleben der Patienten mit fortgeschrittenen NETs assoziiert mit einem Karzinoidsyndrom verbessert.⁷⁶

⁷² Yao YC, Phan A, Hoff PM, et al: Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment phase II study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon-alpha2ab. J Clin Oncol 2008;26:1316-1323.

⁷³ Raymond E, Dahan L; Raoul J-L, et al: Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. N Eng J Med 2011; 364:501-513.

⁷⁴ Pavel et al., Translation of molecular pathways into Clinical Trials of Neuroendocrine Tumors, Neuroendocrinology, April 11, 2012

⁷⁵ Yao JC et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med.2011 Feb 10;364(6):514-23

⁷⁶ Pavel ME et al. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet 2011 Dec 10; 378(9808):2005-12.

IV. Material und Methoden

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
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
EDTA (Titriplex III) [Ethyldiamintetraessigsäure]	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hepes [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure]	Boehringer Mannheim Chemicals, Deutschland
Isopropanol	C.Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NVP-AUY922 HSP90 Inhibitor	Novartis Pharma (Basel, Schweiz)
NVP-HSP990 HSP90 Inhibitor	Novartis Pharma (Basel, Schweiz)
PBS [Phosphat-gepufferte Salzlösung]	Apotheke Klinikum München, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standard Dual Colors	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, 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
Trizol Reagenz	GIBCO BRL/Life Technologies, MD, USA
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

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
Labornetzgerät TNG 30	Voltcraft, Deutschland
Medingen Wasserbad W-22	Funke Medingen, Deutschland
Mikroskop-CK2	Olympus, Japan
Mikrozentrifuge MC13	Millipore, MA, USA
Netzgerät LKB-EPS 500/400	Pharmacia, Österreich
Neubauer Zählkammer 0,100 mm Tiefe	
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, Männedorf, 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

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
Präzisionspipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
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

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% Sodiumcitrat, 0,1% Triton X-100 und 50µg/ml Propidiumjodid
- Waschpuffer: TRIZMA®base, Sigma-Aldrich, MO, USA

2. Methoden

Zellkultur

Versuche wurden an den folgenden drei humanen NET Zelllinien durchgeführt:

BON1, humane neuroendokrine Tumorzellen des Pankreas, wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Rüdiger Göke, MD (University Hospital Marburg und Gießen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen im DMEM/F12 (1:1)

Medium mit Zusatz von 10%FKS, 1%Penicillin-Streptomycin und 0,2% Amphotericin B.

GOT1, humane neuroendokrine Tumorzellen des Midgut wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Ola Nilsson, MD (Sahlgrenska University Hospital Goteborg, Schweden) bereitgestellt.

NCI-H727, humane Karzinoidzellen bronchopulmonalen Ursprungs wurden von ATTC kommerziell erworben. GOT1 und NCI-H727 Zellen wurden jeweils im RPMI Medium mit Zusatz von 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,4 % Amphotericin B kultiviert. Das Zellkulturmedium für die GOT1 Zellen enthielt zusätzlich 0,135 IU/ml Insulin und 5mg/dl APO-Transferrin.

Zellviabilitätsassay

Die Zellen wurden auf 96-well Platten in jeweils unterschiedlichen Mengen ausgesät - BON1 3000 Zellen / well, GOT1 50.000 Zellen / well und NCI-H727 4000 Zellen / well um unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten auf allen Zellplatten vergleichbare Zelldichten zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C unter 5 % CO₂ Atmosphäre in Vollmedium mit 10% FKS für 24 Stunden inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und durch ein Vollmedium mit 10% FKS und ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen HSP90 Inhibitoren AUY 922 und HSP990 (0,1, 0,5, 1,5,10,50,100 nM) ersetzt. Nach dieser Prozedur wurden die Zellen für 24, 72 und 144 Stunden erneut inkubiert. Die metabolische Aktivität als Ausdruck der Zellproliferationsrate wurde mittels des Cell Titer 96 Kit entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Dafür wurde jedes well mit 2 µl des Cell Titer 96 One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison WI, USA) versetzt und die Platten wurden für drei Stunden damit inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 492nm im Photometer Sunrise RC Remonte Control gemessen.

Protein Extraktion

Die Zellen wurden auf 6-well Platten in jeweils unterschiedlichen Mengen ausgesät - BON 1 250.000 Zellen / well, NCI-H727 400.000 Zellen / well und GOT 1 1.000.000 Zellen/well, um unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten auf allen Zellplatten vergleichbare Zelldichten zu

erreichen. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium durch ein Vollmedium mit 10% FKS und ansteigenden Konzentrationen (1, 5, 10, 50, 100 nM) von AUY922 und HSP990 ersetzt. Anschließend erfolgte erneut die Inkubation für 2, 8 und 24 Stunden. Im nächsten Schritt wurde das Medium in Eppendorfgefäße umgefüllt und für 10 Minuten bei 4000g zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Zellpellet mit PBS gereinigt und wiederholt zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 50µl Lysispuffer benetzt. Beim verwendeten Lysispuffer handelte es sich um M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent von Thermo Scientific, Rockland, USA. Die 6-well Platten wurden mit PBS gereinigt und mit jeweils 150µl Lysispuffer pro well bedeckt. Sowohl die Zellpellets in den Eppendorfgefäßen als auch die 6-well Platten wurden über Nacht bei -40°C gelagert. Nachdem am nächsten Tag die Zellen mit Zellschabern von den Platten gekratzt und die in jeweiligen Eppendorfgefäße überführt worden waren, wurden die Zelllysate bei 13,000g für 10 Minuten zentrifugiert und mit den Überständen erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe der Proteinbestimmung mit Rotiquant Universal (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und ein Proteinkonzentrations-Ausgleich mittels Lysispuffer.

Western Blot

Die aus der Proteinextraktion gewonnenen Proben wurden mit einem denaturierenden SDS-Probenpuffer, im Verhältnis 1:2 verdünnt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Im nächsten Schritt wurde das Protein-Puffer-Gemisch mit 50-70µl in die Taschen eines Polyacrylamid-Gels (10-15%) pipettiert und bei einer Stromstärke von 2 mA/cm vom relativen Molekulargewicht abhängig aufgetrennt. Das Proteinstandard bildete der Precision Plus ProteinTM Standard Dual Colors. Danach wurden die aufgetrennten Proteine innerhalb von 60 Minuten auf PVDF-Membranen (Immobilone; Millipore, Eschborn, Deutschland) über semi-dry Western blot Technik elektrotransferiert. Nachdem die Membranen für 30 Minuten in einem 2%-Milchpulver-TBS-T-Puffer geblockt worden waren, erfolgte die Reinigung mit dem Waschpuffer und im Anschluss die Inkubation mit geeigneten Verdünnungen folgender Antikörper über Nacht pAkt (Ser 473) (1:20.000), Akt (1:5.000), pErk ½ (1:10.000), Erk ½ (1:20.000), PARP (1:1.000) (die genannten Antikörper stammen von Cell Signaling, Danvers, MA), HSP70 (1:10.000) (Biomol Stressgen, Hamburg),

HSP90 (1:5.000), EGFR (1:1.000), Erb B2 (1:500), ErbB3 (1:1.000), STAT3 (1:10.000) (von Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland), IGFR (1:5.000), p70S6K (1:1.000), pp70S6K (1:2.000), 4EBP1 (1:2.000), p4EBP1 (1:1.000) (von Cell Signaling Technology Inc., MA, USA). Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen dreimal je 10 Minuten lang auf einem Rotationsschüttler mit PBS gereinigt und anschließend für zwei Stunden mit einem peroxidase konjugierten Zweitantikörper (1:25.000) inkubiert. Danach wurden die Membranen erneut gründlich gespült und in das Super-Signal-West-Dura-Chemolumineszenz-Substrat für 30 Minuten getaucht. Im letzten Schritt wurden die Membranen XOMAT-AR Film (Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA) ausgesetzt. Um die PVDF Membranen mit anderen Antikörpern zu inkubieren, wurden diese mit dem RestoreTM Plus Western Blot Stripping Buffer „gestrippt“. Damit lösten sich die Antikörper von den Membranen.

FACS Analyse

Die Zellen wurden auf 12-well Platten, BON1 50.000 Zellen/well, NCI H727 80.000 Zellen/well und GOT 1 150.000 Zellen/well ausgesät und in Vollmedium plus 10% FKS 24 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch das Serumreiche Medium mit ansteigenden AUY922 und HSP990 Konzentrationen ersetzt und die Platten erneut 24 Stunden inkubiert. Hinterher wurden die Zellen mit Zellschabern von den Platten abgetragen, mit PBS gewaschen und mit dem sogenannten Nicoletti Puffer (0,1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100 (Sigma) und 50µg/ml Propidium iodid über Nacht behandelt. Die Analyse der sub-G1 Ereignisse und anderer Zellzyklusanteile erfolgte mittels Durchflusszytometrie am FACSCalibur Gerät (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Zellkerne, die links des „G1-peaks“ lagen und hypodiploide DNA aufwiesen, wurden als apoptotisch eingestuft.

Statistische Auswertung

Zellzyklusphasen wurden mit der Cell Quest Software (Becton Dickinson) analysiert. Statistische Signifikanz wurde angesetzt bei $p < 0,05$.

V. Ergebnisse

1. HSP90 Überexpression in NET-Zellen und gesteigerte HSP70 Expression als Biomarker für die HSP90 Inhibition

Einer der Gründe, warum HSP90 als ein vielversprechender Angriffspunkt in der Krebstherapie erscheint, ist, dass verschiedene Karzinome wie Mamma-Carcinom⁷⁷, Bronchial-Carcinom⁷⁸, Colon-Carcinom oder auch neuroendokrine Tumoren⁷⁹ erhöhte HSP90 Expression aufweisen. Deswegen wurde auch in den Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, zunächst mittels Western Blot die hohe Expression von Hitzeschockprotein 90 nachgewiesen (Abb.1). Der HSP90 Komplex besteht aus Chaperone HSP70 und ihr Co-Chaperone HSP40, das Adapterprotein Hop/p60, Protein p23 und anderen⁸⁰. In MR Jensen et al.⁸¹, konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von HSP90 eine gesteigerte Expression von HSP70 herbeiführt, sodass der Anstieg des Spiegels von HSP70 mittlerweile als Biomarker für die HSP90 Inhibition erachtet werden kann. Dass AUY922 und HSP990 potente HSP90 Inhibitoren sind, konnte demnach durch die gesteigerte HSP70 Expression, in den vorher mit den beiden Substanzen in ansteigender Konzentration behandelten BON1 und NCI-H727 Zellen, bestätigt werden (Abb.1).

⁷⁷ Maloney A, Workman P: HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther.* 2002 Jan;2(1):3-24. Review

⁷⁸ Sreedhar AS, Soti C, Csermely P: Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 11;1697(1-2):233-42. Review

⁷⁹ Gilbert JA et al. *Endocr Relat Cancer* 2010 Jun 25;17(3):623-36.

⁸⁰ Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB: Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal.* 2004 Aug;16(8):857-72. Review

⁸¹ Michael Rugaard Jensen, Joseph Schoepfer, Thomas Radimerski, Andrew Massey, Chantale T Guy, Josef Brueggen, Cornelia Quadt, Alan Buckler, Robert Cozens, Martin J Drysdale, Carlos García- Echeverria, Patrick Chene: *Breast Cancer Research* 2008,10:R 33

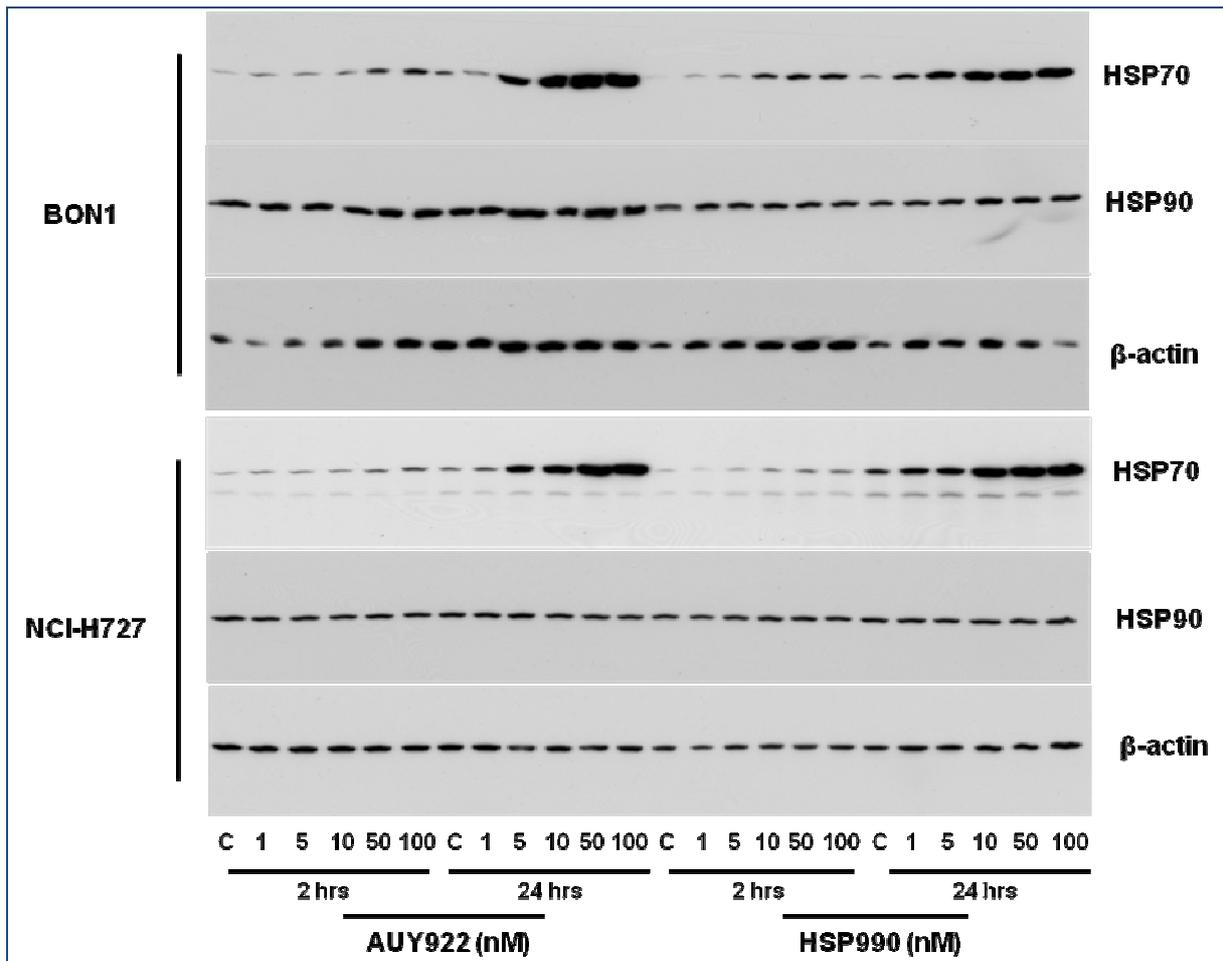


Abb.1 Induktion der HSP70 Expression durch die HSP90 Inhibition in Zellen der NETs
 Humane pankreatische BON1 und humane bronchopulmonale NCI-H727 neuroendokrine Tumorzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen (1-100nM) der HSP90 Inhibitoren AUY922 und HSP990 für 2 und 24 Stunden behandelt. Die Abbildung zeigt die Expression von HSP90 und HSP70, nachgewiesen mittels Western Blot. Anschließend wurden die Membranen gestrippt und mit dem β -Actin Antikörper geblottet. Die gezeigte Abbildung entspricht einem repräsentativen Ergebnis von drei unabhängig voneinander wiederholten Experimenten.

2. Beeinträchtigung der neuroendokrinen Zellviabilität durch die HSP90 Inhibition

Behandelt man humane pankreatische BON1 Tumorzellen mit dem HSP90 Inhibitor AUY922, so zeigt sich eine Dosis-abhängige Hemmung der Zellviabilität. Signifikante Effekte traten zu jedem der drei getesteten Zeitpunkte 24, 72 und 144 Stunden ein. Bereits bei einer Konzentration von 5nM ging die Zellzahl nach 24 Stunden auf 89%, nach 72 Stunden auf 42% und nach 144 Stunden auf 36%, im Vergleich zu unbehandelten Zellen ($p < 0.001$), zurück. Die am höchsten verwendete Konzentration von 100nM verursachte einen noch höheren Rückgang der Zellzahl:

auf 75% nach 24 Stunden, auf 17% nach 72 Stunden und auf 1% nach 144 Stunden ($p < 0.001$) (Abb.2A).

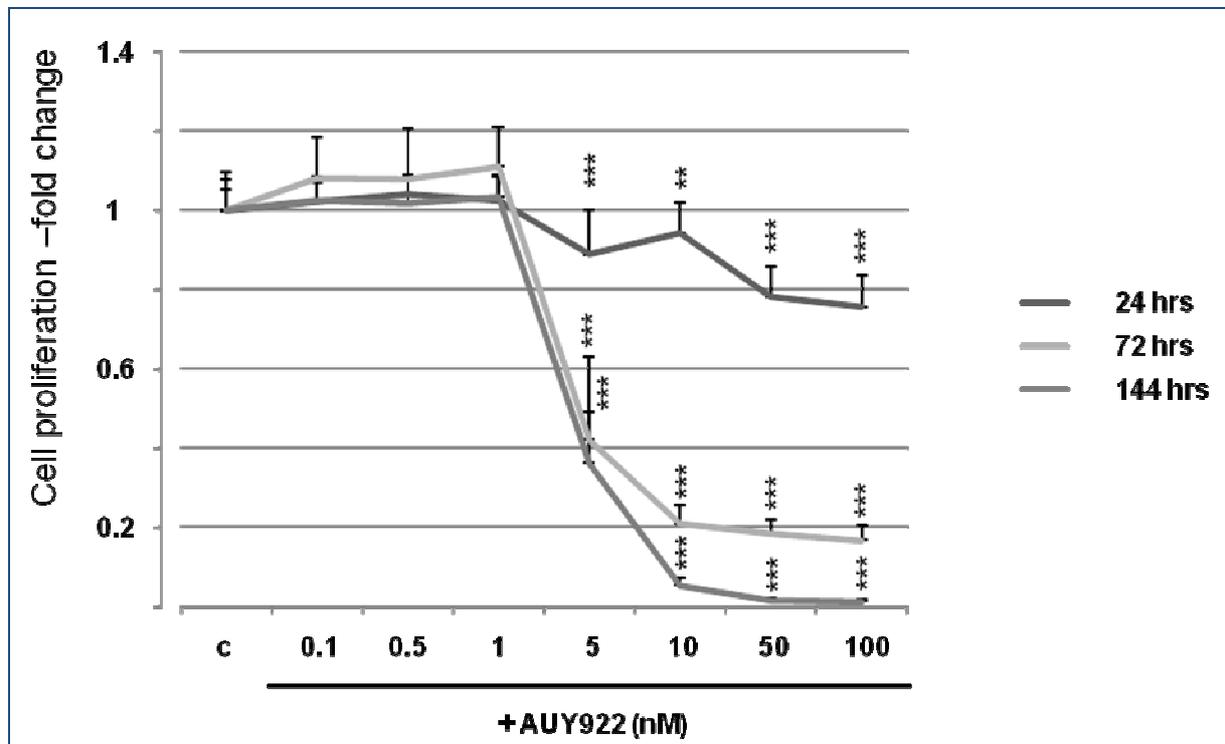
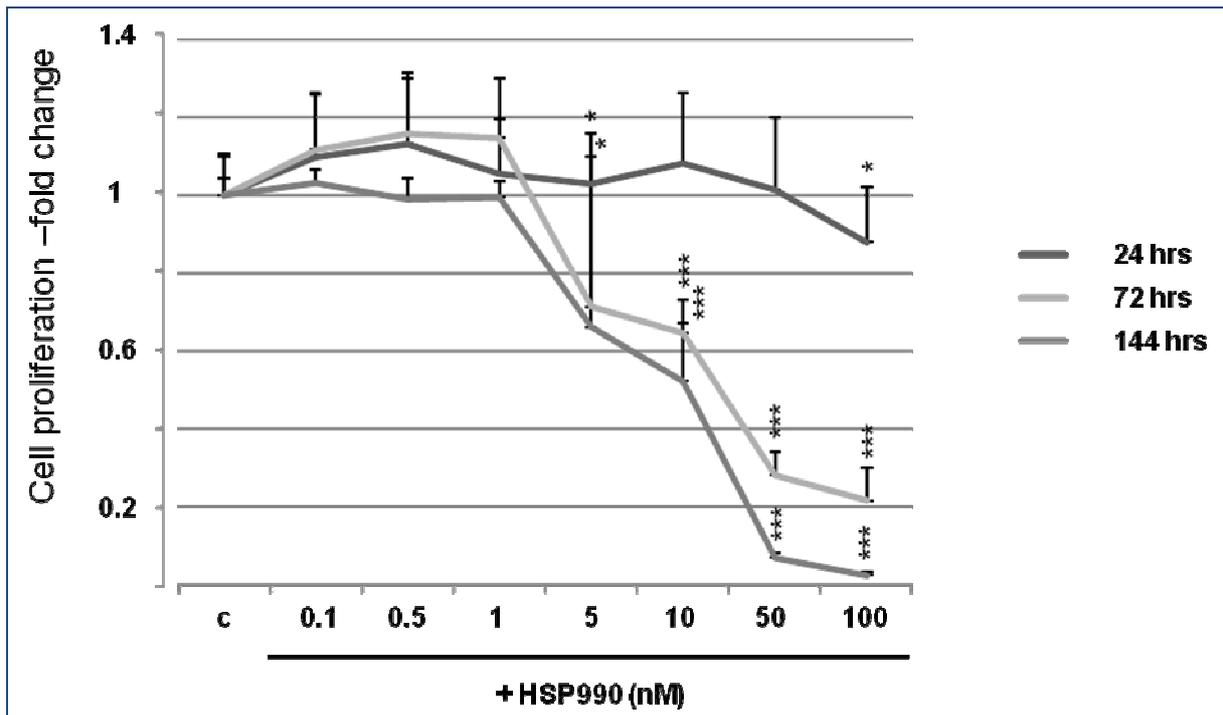


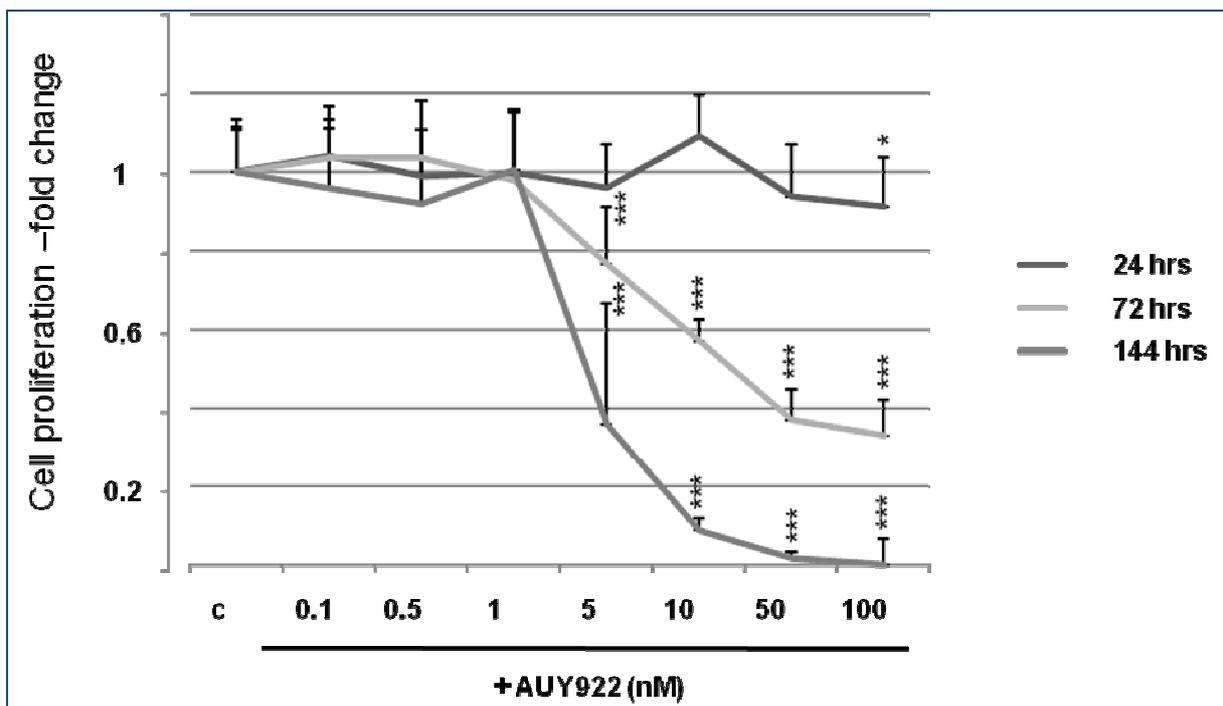
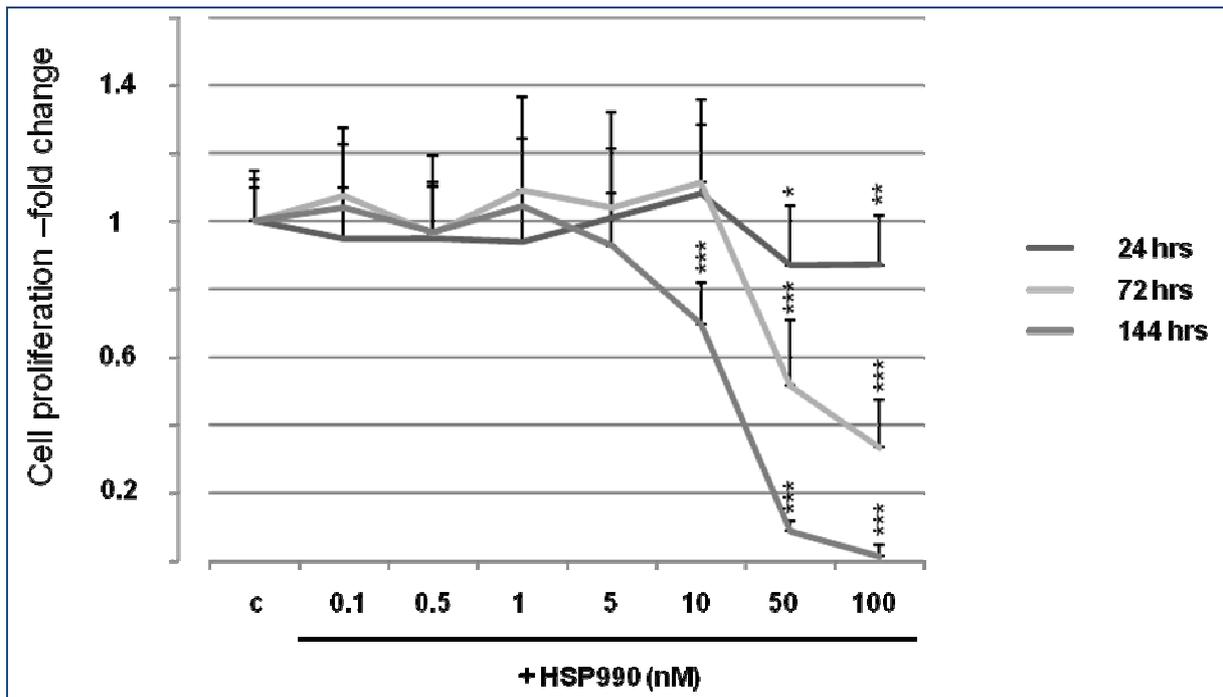
Abb.2A. Zeit- und Dosis-abhängiger Einfluss auf die Zellviabilität durch HSP90 Inhibition. Humane BON1 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen (0.1 bis 100nM) des HSP90 Inhibitors AUY922 behandelt. Die Zellviabilität der Kontrollgruppe C wurde mit 100% angesetzt. Die relativen Zellviabilitätsangaben sind der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss des HSP90 Inhibitors HSP990 auf die Zellviabilität überprüft. Nach 24 Stunden konnten signifikante Effekte erst bei der höchsten Konzentration von 100nM beobachtet werden. Hier überlebten 75% der Zellen ($p < 0.05$). Nach 72 Stunden genügte bereits die Konzentration von 5nM um den Zellbestand auf 71% zu reduzieren ($p < 0.001$). Nach 144 Stunden überlebten 66% ($p < 0.05$) der Zellen die Behandlung mit der gleichen Konzentration. Die Anwendung der höchsten Dosis von 100nM für 144 Stunden dezimierte den Zellbestand auf 3% ($p < 0.001$). Dieses veranschaulicht die Abbildung 2B.



2.B. Zeit- und Dosis-abhängiger Einfluss auf die Zellviabilität durch HSP90 Inhibition
 Humane BON1 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen (0.1 bis 100nM) des HSP90 Inhibitors HSP990 behandelt. Die Zellviabilität der Kontrollgruppe C wurde mit 100% angesetzt. Die relativen Zellviabilitätsangaben sind der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

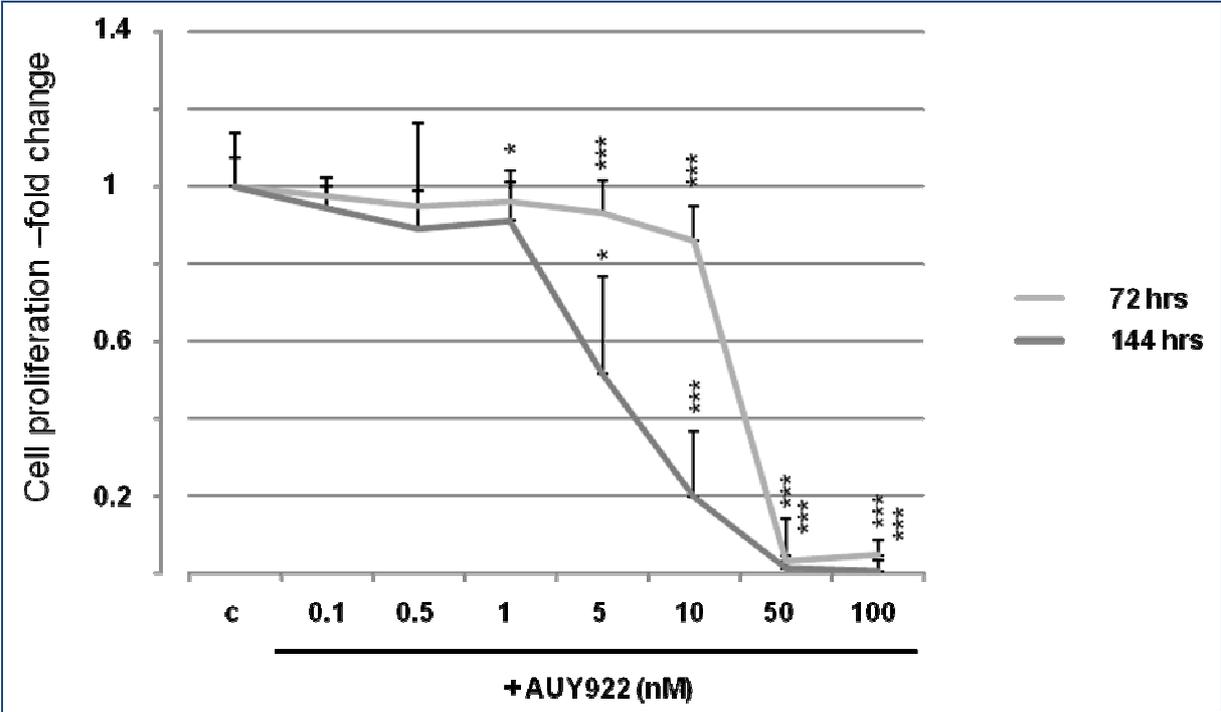
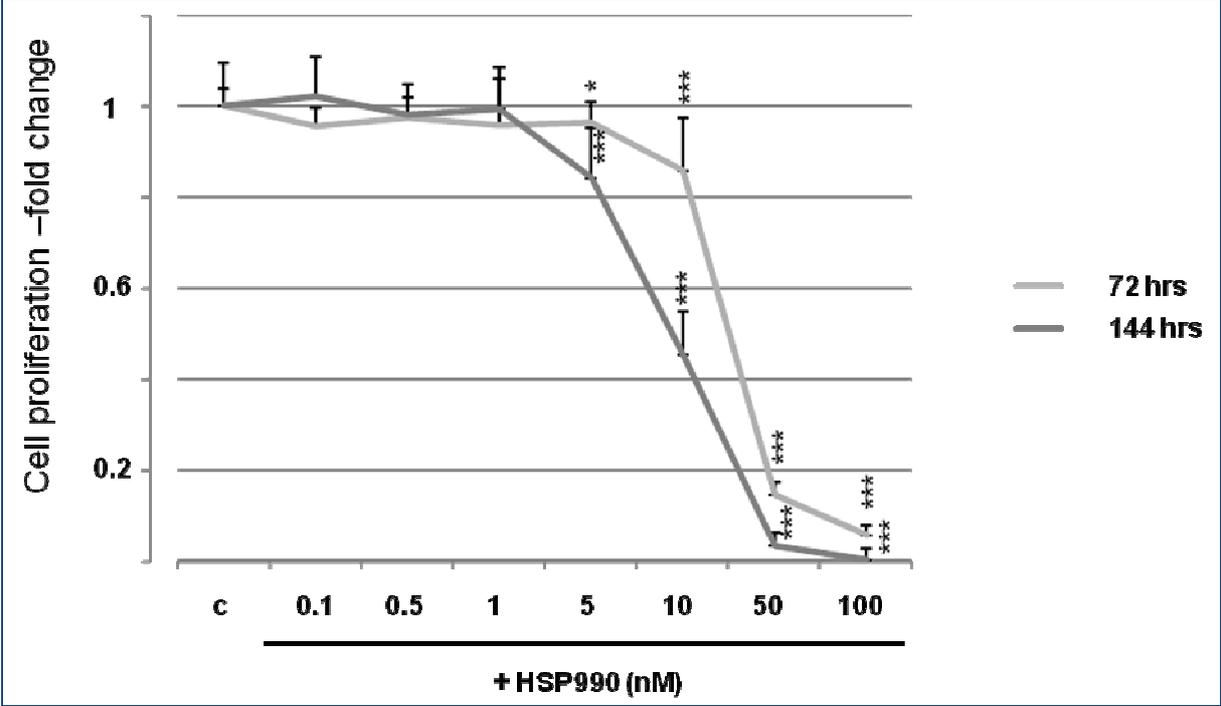
Die Abbildungen 2.C und 2.D geben einen Überblick über die Effekte der HSP90 Inhibition durch AUY922 und HSP990 an humanen bronchopulmonalen neuroendokrinen NCI-H727 Tumorzellen. Auch hier ist das Ausmaß der Hemmung der Zellviabilität zeit- und dosisabhängig. Signifikante Effekte zeigten sich bei allen drei getesteten Zeitpunkten bereits ab einer Konzentration von 10nM.



2.C./D. Zeit- und Dosis-abhängiger Einfluss auf die Zellviabilität durch HSP90 Inhibition. Humane NCI-H727 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen (0.1 bis 100nM) des HSP90 Inhibitors AUY922/HSP990 behandelt. Die Zellviabilität der Kontrollgruppe C wurde mit 100% angesetzt. Die relativen Zellviabilitätsangaben sind der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Aufgrund der niedrigen Wachstumsgeschwindigkeit der humanen neuroendokrinen GOT1 Zellen des Midgut, wurde der Einfluss auf die Zellviabilität von GOT1 Zellen durch die HSP90 Inhibition nur zu den zwei Zeitpunkten 72 und 144 Stunden

getestet. Beide HSP90 Inhibitoren AUY922 (Abb. 2.E) und HSP990 (Abb. 2.F) zeigten ähnliche Effekte. Signifikante Effekte wurden ab einer Konzentration von 10nM beobachtet.



2.E./F. Zeit-und Dosis-abhängiger Einfluss auf die Zellviabilität durch HSP90 Inhibition. Humane GOT 1 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen (0.1 bis 100nM) des HSP90 Inhibitors AUY922/HSP990 behandelt. Die Zellviabilität der Kontrollgruppe C wurde mit 100% angesetzt. Die relativen Zellviabilitätsangaben sind der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, *p <0.005, **p<0.01, ***p< 0.001.

3. Auswirkung der HSP90 Inhibition auf die Verteilung der NET Zellen im Zellzyklus

Um das Prinzip der beobachteten Beeinträchtigung der Zellviabilität durch die HSP90 Inhibition zu erkunden, erfolgte die Zellzyklusanalyse. Dafür wurden alle drei Zelllinien für 24 Stunden mit AUY922 und HSP990 behandelt und anschließend mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Beide Substanzen führten bei BON1 Zellen zu einer signifikanten Reduktion des Zellanteils in der S-Phase, von ursprünglich 10% auf 5% und zum Anstieg der Zellzahl in der G2-Phase bei einer Konzentration von 50 und 100nM (p<0.001). (Abb. 3.A. und 3.B). Die Beobachtung, dass die Behandlung der Zellen mit dem HSP90 Inhibitor AUY922 einen Zellarrest in der G2-Phase induziert, deckt sich mit der Erfahrung von Kaiser et al⁸².

⁸² Martin Kaiser, Britta Lamottke, Maren Mieth, Michael R. Jensen, Cornelia Quadt, Carlos García-Echeverría, Peter Atadja, Ulrike Heider, Ivana von Metzler, Seval Türkmen, Orhan Sezer: Synergistic action of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 with histone deacetylase inhibitors, melphalan, or doxorubicin in multiple myeloma, *European Journal of Haematology* 84(337-344), 2010

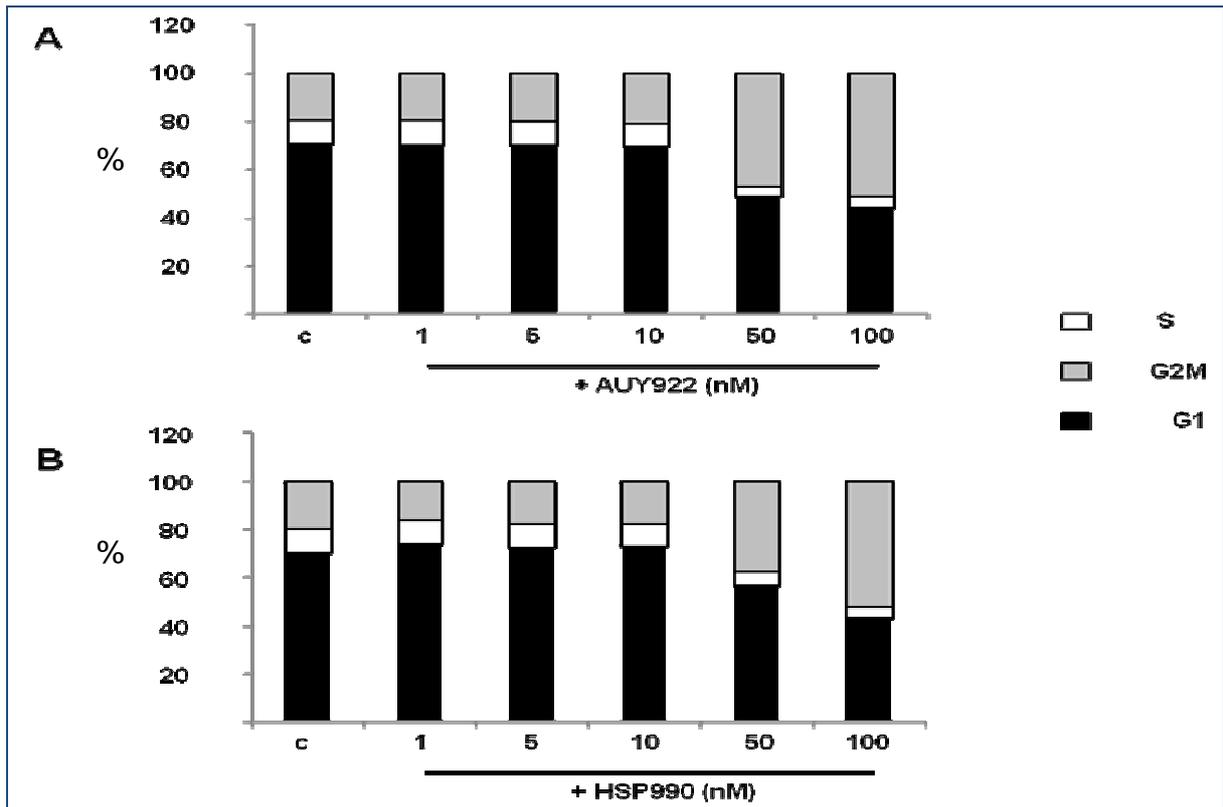


Abb.3.A/B. Einfluss der HSP90 Inhibition auf die Verteilung der NET Zellen im Zellzyklus. Humane pankreatische BON 1 Zellen wurden im Nährmedium herangezüchtet und über Nacht mit den beiden HSP90 Inhibitoren AUY922 und HSP990 in ansteigenden Konzentrationen behandelt. Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1/0-Phase wird durch schwarze Balken, der S-Phase in weißen Balken und der G2/M-Phase in grauen Balken repräsentiert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Die HSP90 Inhibition hatte dagegen keinen Einfluss auf die Verteilung des Zellbestandes auf die einzelnen Zellzyklusphasen bei GOT 1 und NCI-H727 Zellen, so wie es die folgenden Abbildungen zeigen:

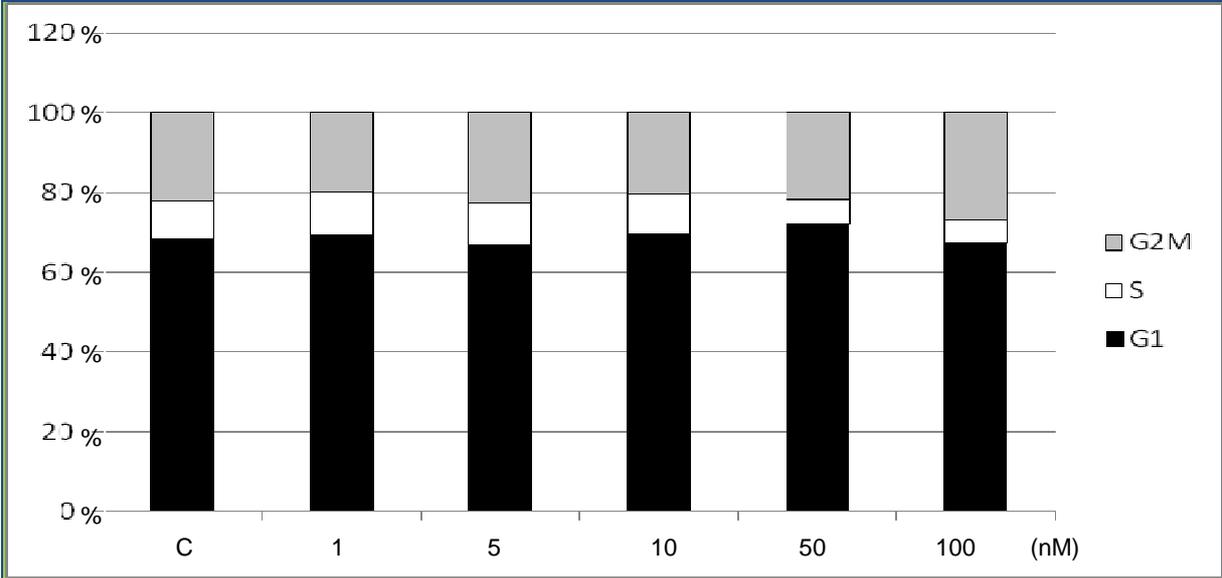


Abb.4.A. Einfluss der HSP90 Inhibition auf die Verteilung der NET Zellen im Zellzyklus. NCI-H727 Zellen wurden im Nährmedium herangezüchtet und über Nacht mit dem HSP90 Inhibitor AUUY922 in ansteigenden Konzentrationen behandelt. Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1/0-Phase wird durch schwarze Balken, der S-Phase in weißen Balken und der G2/M-Phase in grauen Balken repräsentiert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

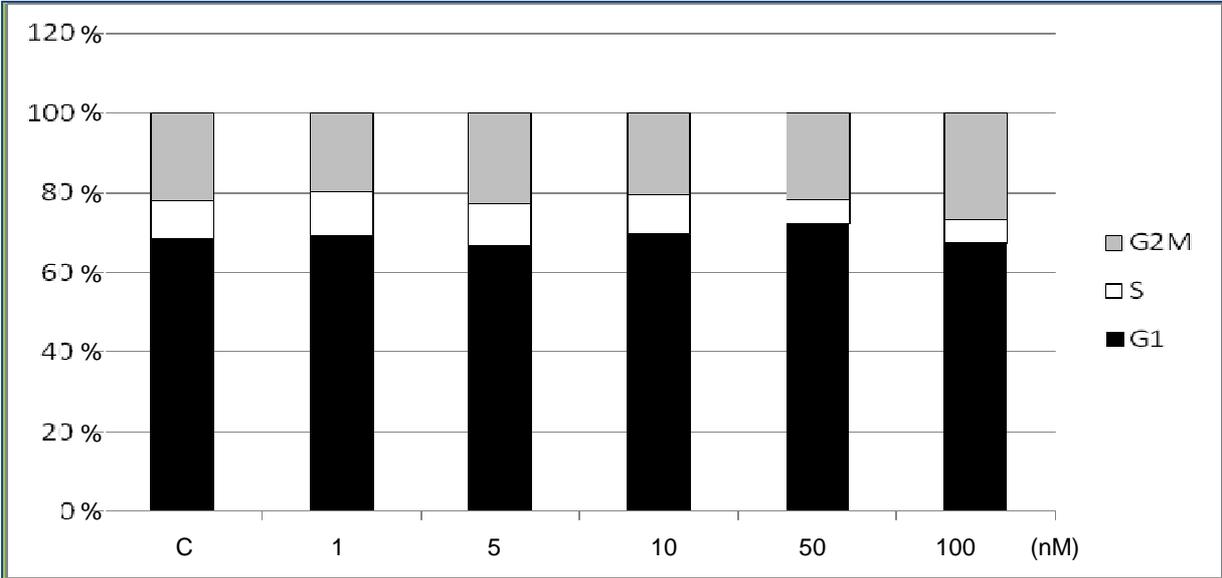


Abb.4.B. Einfluss der HSP90 Inhibition auf die Verteilung der NET Zellen im Zellzyklus. NCI-H727 Zellen wurden im Nährmedium herangezüchtet und über Nacht mit dem HSP90 Inhibitor HSP990 in ansteigenden Konzentrationen behandelt. Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1/0-Phase wird durch schwarze Balken, der S-Phase in weißen Balken und der G2/M-Phase in grauen Balken repräsentiert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

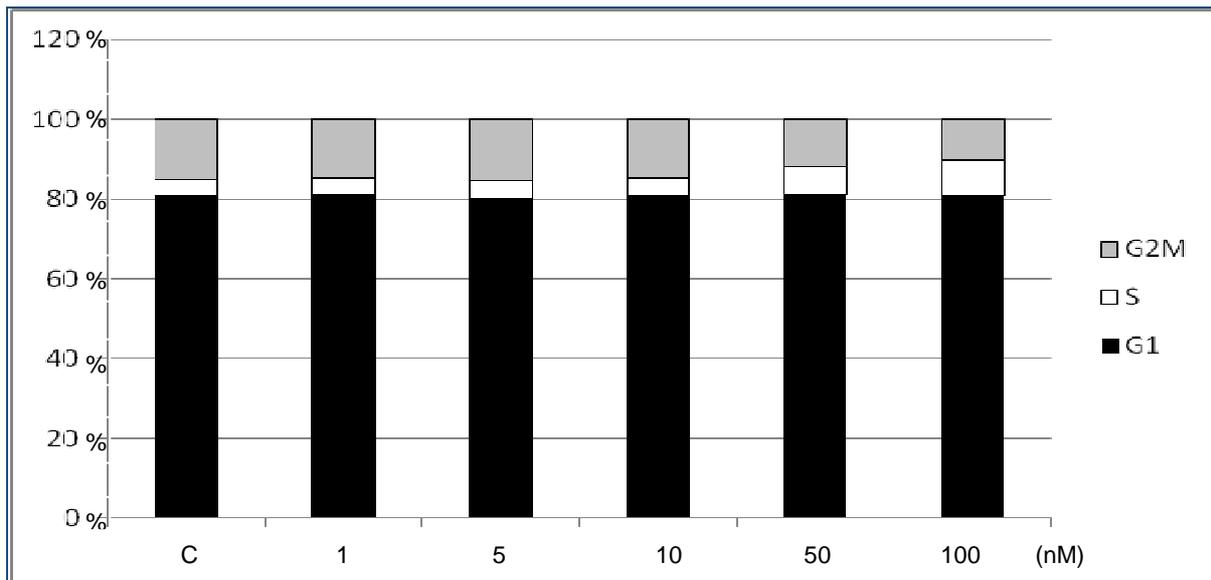


Abb.5.A. Einfluss der HSP90 Inhibition auf die Verteilung der NET Zellen im Zellzyklus. GOT 1 Zellen wurden im Nährmedium herangezüchtet und über Nacht mit dem HSP90 Inhibitor AUY922 in ansteigenden Konzentrationen behandelt. Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1/0-Phase wird durch schwarze Balken, der S-Phase in weißen Balken und der G2/M-Phase in grauen Balken repräsentiert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

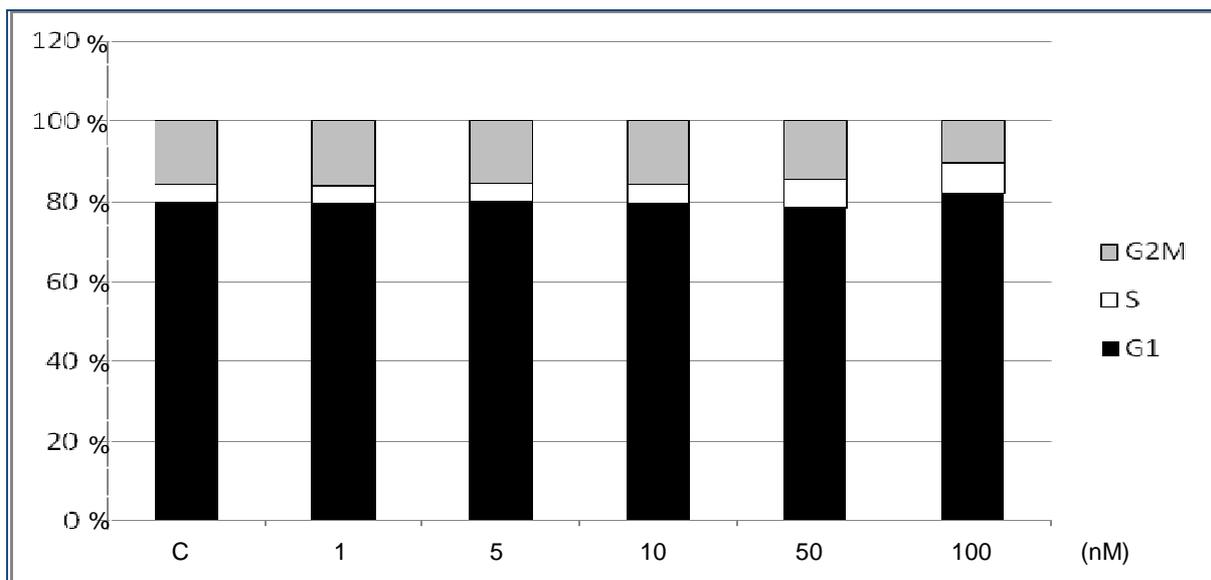


Abb.5.B. Einfluss der HSP90 Inhibition auf die Verteilung der NET Zellen im Zellzyklus. GOT 1 Zellen wurden im Nährmedium herangezüchtet und über Nacht mit dem HSP90 Inhibitor HSP990 in ansteigenden Konzentrationen behandelt. Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1/0-Phase wird durch schwarze Balken, der S-Phase in weißen Balken und der G2/M-Phase in grauen Balken repräsentiert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

4. HSP90 Inhibition führt zu Apoptose in NET Zellen

Hinweise für Apoptose liefert der Nachweis eines sub-G0/1-Gipfels in einer FACS Untersuchung. Die BON1 Zellen wurden 24 Stunden mit dem HSP90 Inhibitor AUY922 behandelt und damit konnte der Anteil der Zellen in der Sub-G1/0-Phase bei einer Konzentration von 100nM um das 1,7-fache gesteigert werden ($p < 0,05$) (Abb. 7A.). Durch die Anwendung von HSP990 konnte ein 1,4-facher Anstieg des Zellanteils in der Sub-G1/0-Phase erzielt werden ($p < 0.05$) (Abb.6.). Die NCI-H727 Zellen reagierten mit 1,6-fachem Anstieg der Sub-G1/0-Ereignisse auf die Behandlung mit AUY922 mit einer Konzentration von 100nM ($p < 0.01$) und bei HSP990, ebenfalls 100nM mit 1,3-fachem Anstieg ($p < 0.05$) (Abb.7B.) Bei GOT 1 Zellen konnte der Zellanteil in der Sub-G1/0-Phase um das 2,5-fache gesteigert werden ($p < 0.001$) (Abb.7C.).

Eine weitere, etablierte Methode um die Induktion der Apoptose zu beweisen, ist der Nachweis von gespaltenem PARP mittels Western Blot. Das Enzym **poly (ADP-ribose) polymerase** war das erste Protein, das als Substrat für Caspasen identifiziert wurde und dessen Expression durch DNA Strangbrüche ausgelöst wird. PARP ist beteiligt an der DNA-Schaden-Reparatur. In apoptotischen Zellen, wird PARP, das normalerweise eine Länge von 116kD aufweist, durch Caspase-3 in zwei Peptide von 89 kD und 24 kD gespalten. Dieser Prozess findet im Zuge der Degradation der zellulären DNA statt und verhindert die Reparatur der DNA⁸³.

Nach der Behandlung der BON1 und NCI-H727 Zellen mit den HSP90 Inhibitoren AUY922 und HSP990 über 24 Stunden, konnten mittels Western Blot PARP Spaltprodukte nachgewiesen werden. Damit konnte bestätigt werden, dass AUY922 und HSP990 Dosis-abhängig Apoptose induzieren (Abb.6.).

⁸³ Peter Mullen: PARP Cleavage as a Means of Assessing Apoptosis from Methods in Molecular medicine, vol.88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Edited by S.P. Langdon Humana Press Inc., Totowa, NJ

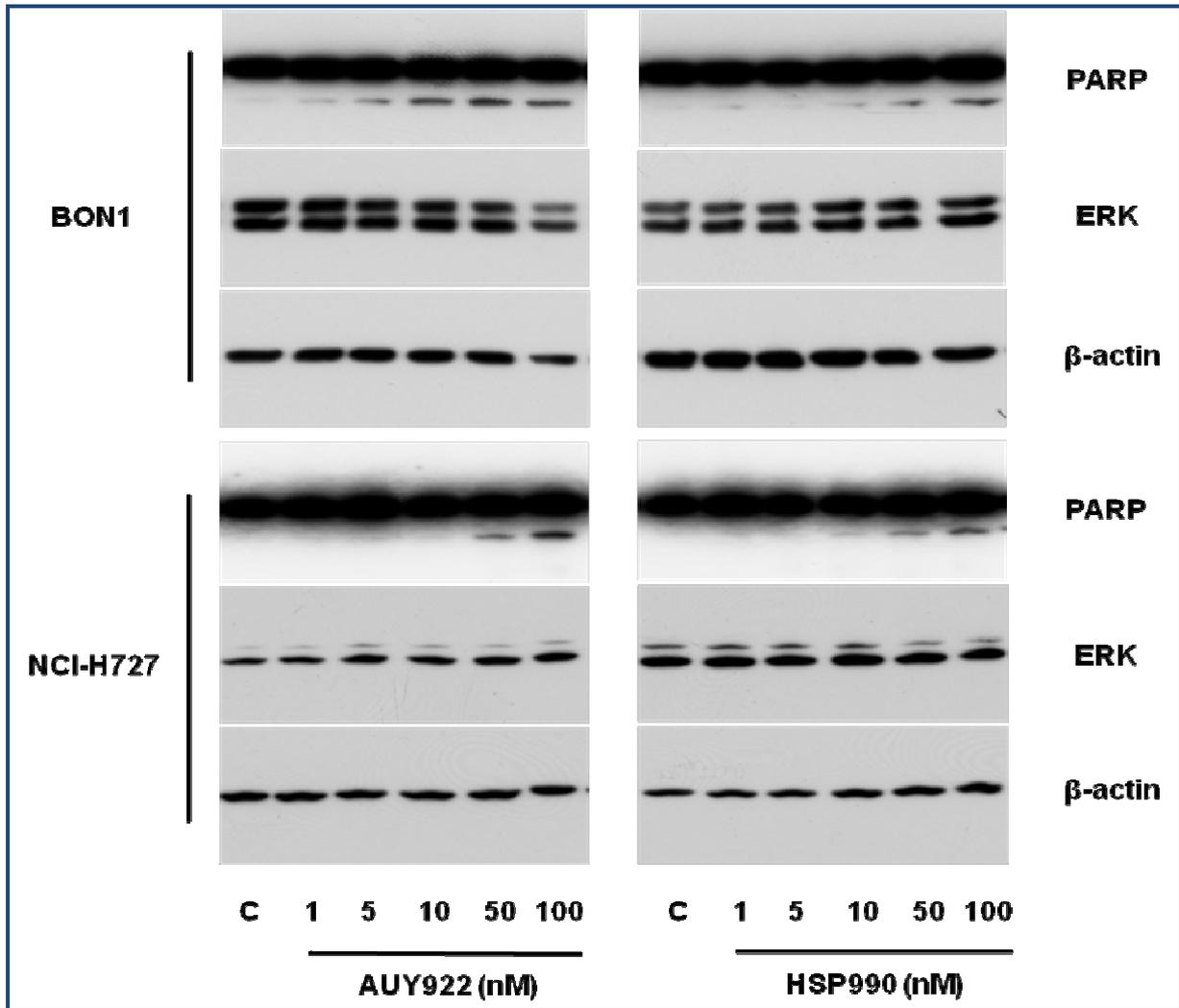
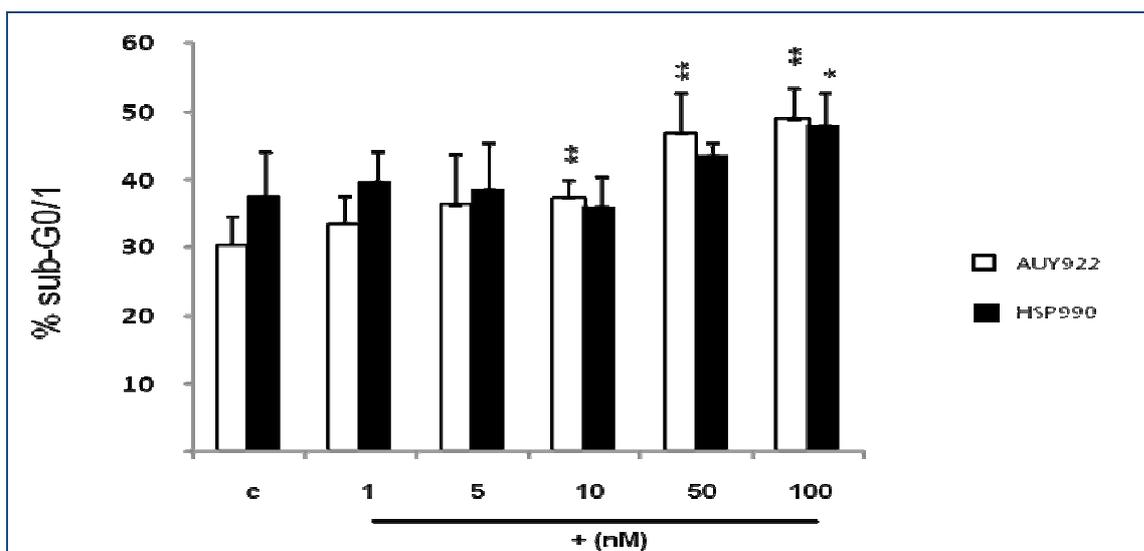


Abb.6. Induktion der Apoptose durch die HSP90 Inhibition in NET Zellen BON1 und NCI-H727-Zellen wurden 24 Stunden lang mit ansteigenden Konzentrationen von AUY922 und HSP990 behandelt. B-Actin dient als Kontrolle.



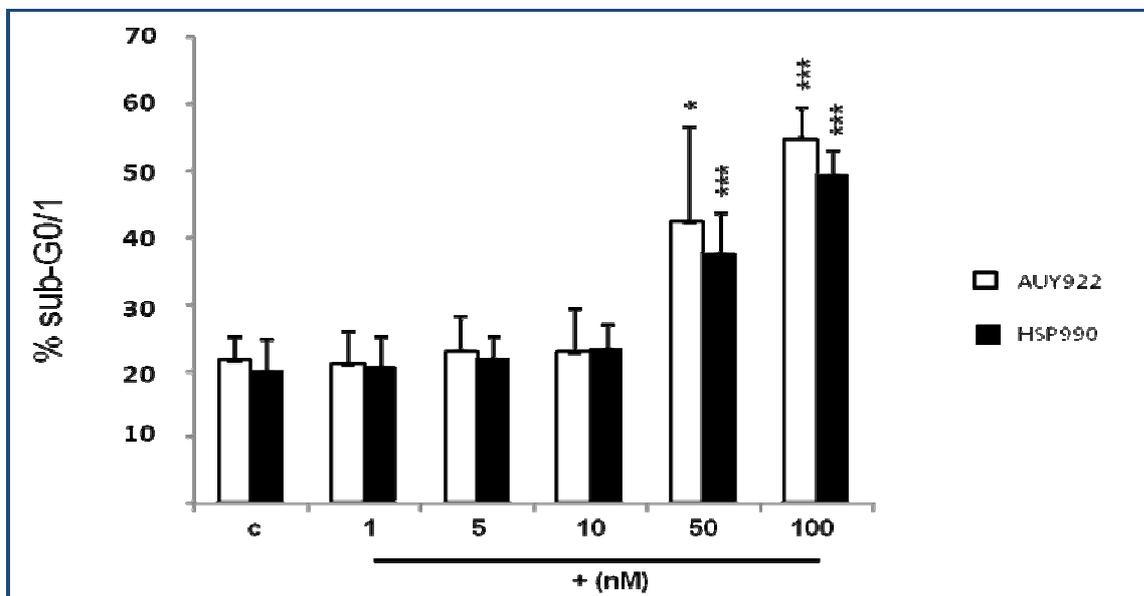
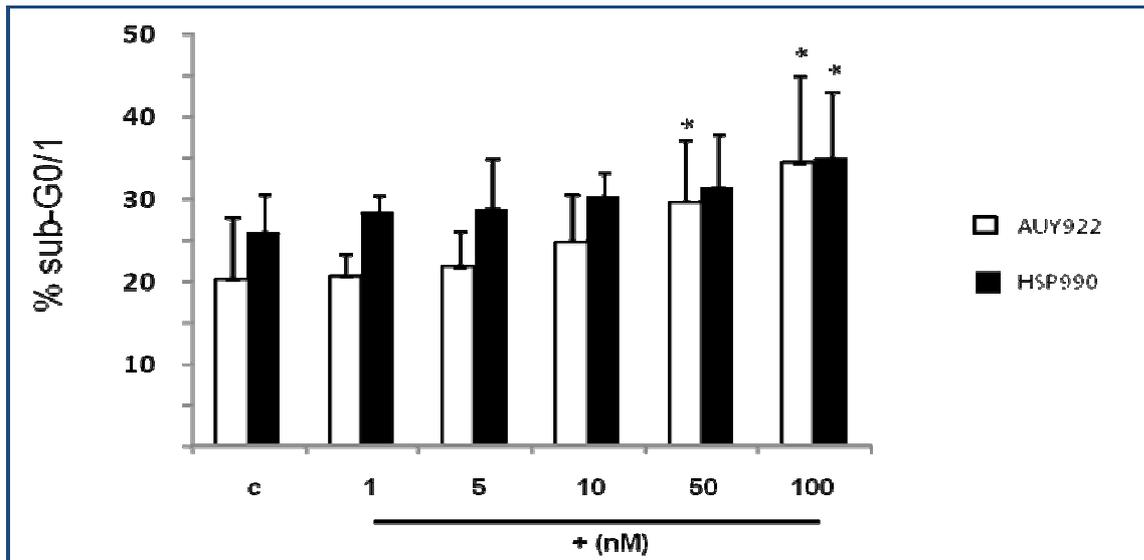


Abb.7A/B/C.

HSP90 Inhibition induziert den Anstieg der Sub-G1/0-Zellpopulation

Humane BON1(7A), NCI-H727(7B) und GOT1(7C) Zellen wurden über 24 Stunden den HSP90 Inhibitoren AUY922 und HSP990 in ansteigenden Konzentrationen ausgesetzt. Die Prozentangaben, visualisiert durch das Balkendiagramm ist der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (*p < 0.005, **p < 0.01, ***p < 0.001)

5. Prinzip der HSP90 Inhibition in NET Zellen: Effekte auf Signaltransduktionswege

NETs weisen eine hohe Aktivität der RAS-RAF-MEK-ERK1/2 und PI3K-Akt/PKB Signaltransduktionswege auf⁸⁴. In der hier vorgelegten Arbeit zeigten unbehandelte, im Kompletmedium herangezüchtete BON 1 und NCI-H727 Zellen ebenfalls jeweils eine mittels Western Blot Analyse gut detektierbare Aktivität von PI3K-Akt/PKB und RAS-RAF-MEK-ERK1/2 Signaltransduktionswegen (Abb.8/9.). Beide Signalwege regeln das Überleben und die Proliferation von Zellen. Das Hitzeschockprotein 90 nimmt eine wichtige Rolle in den beiden Signaltransduktionswegen ein.

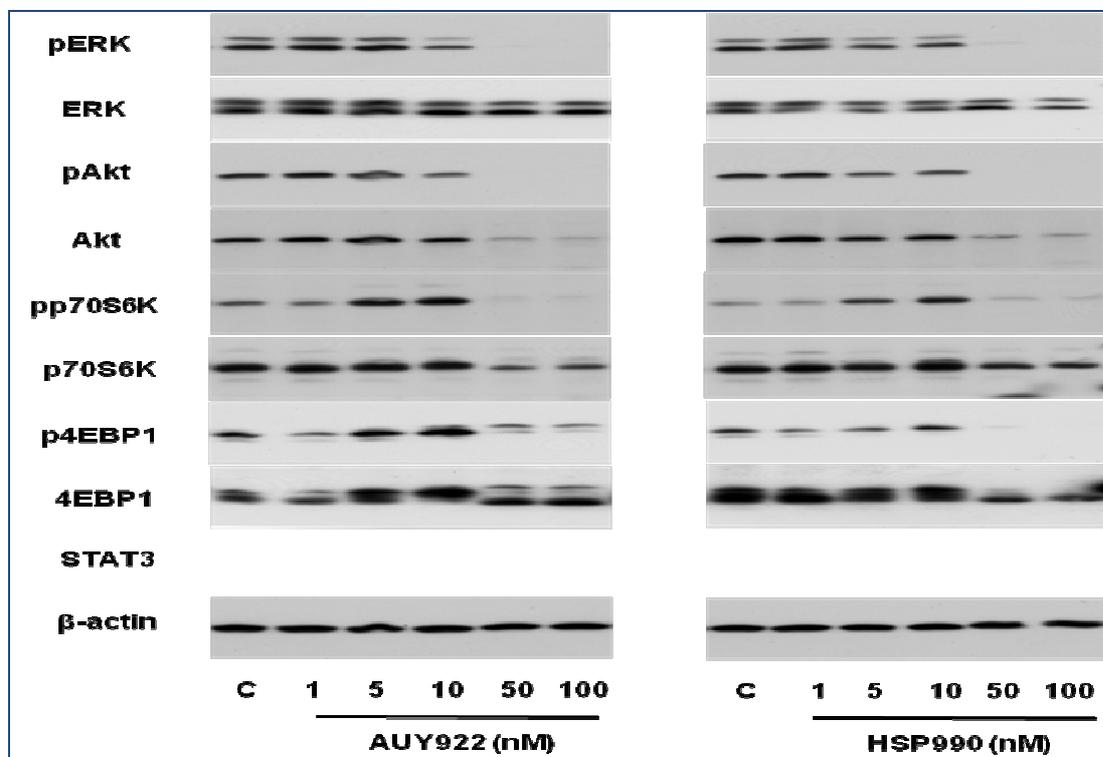


Abb.8. Auswirkung der HSP90 Inhibition auf die Aktivität der Signalwege in BON 1 Zellen
 BON 1 Zellen wurden 24 Stunden lang mit AU922 (linke Spalte) und HSP990 (rechte Spalte) behandelt. Phosphoryliertes ERK 1/2, Komplet ERK 1/2, Phosphoryliertes Akt, Komplet Akt, Phosphoryliertes p70S6K, Komplet p70S6K, Phosphoryliertes 4EBP1, Komplet 4EBP1, Komplet STAT3 und β -Actin als Kontrolle wurden nach der Protein Extraktion mittels Western Blot nachgewiesen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

⁸⁴ Zitzmann K. et al. Compensatory activation of Act in response to mTOR and Raf inhibitors- a rational for dual targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. Cancer Lett. 2010 Sep 1;295(1):100-9

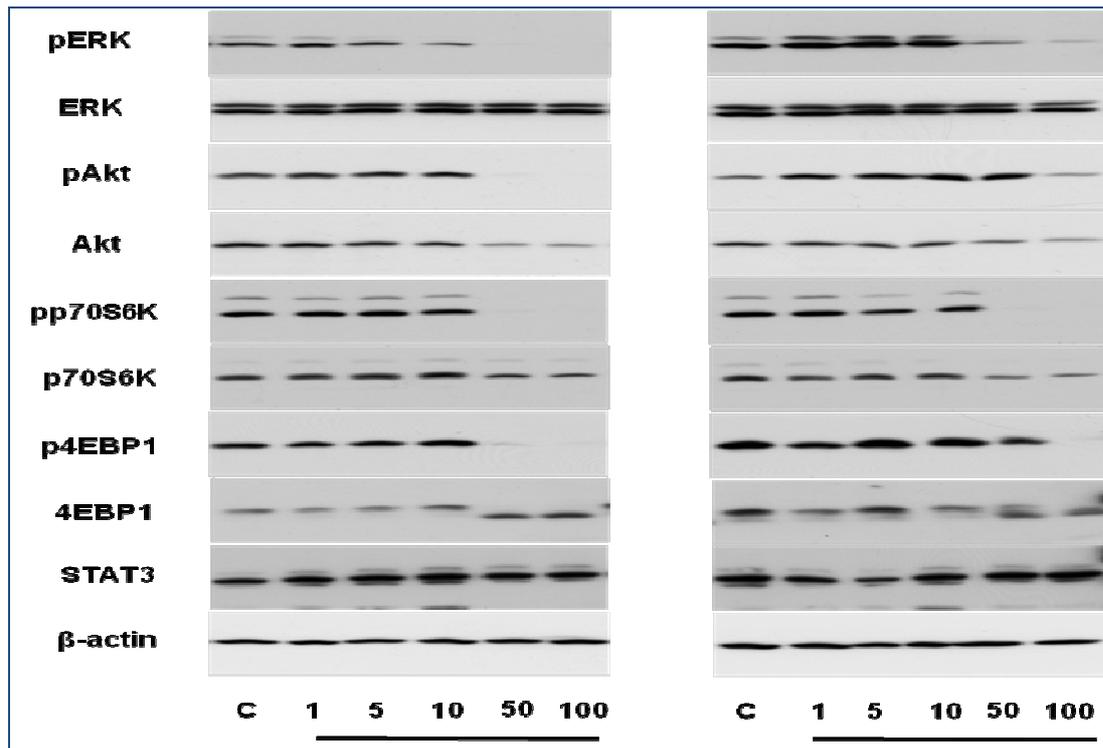


Abb.9. Auswirkung der HSP90 Inhibition auf die Aktivität der Signalwege in NCI-H727 Zellen
 NCI-H727 Zellen wurden 24 Stunden lang mit AU922 (linke Spalte) und HSP990 (rechte Spalte) behandelt. Phosphoryliertes ERK $\frac{1}{2}$, Komplette ERK $\frac{1}{2}$, Phosphoryliertes Akt, Komplette Akt, Phosphoryliertes p70S6K, Komplette p70S6K, Phosphoryliertes 4EBP1, Komplette 4EBP1, Komplette STAT3 und β -Actin als Kontrolle wurden nach der Protein Extraktion mittels Western Blot nachgewiesen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Durch die Behandlung der BON1 und NCI-H727 mit AU922 und HSP990 konnte gezeigt werden, dass die HSP90 Inhibition zu einer geminderten Phosphorylierung von ERK, Akt, p70S6K und 4EBP1 führt. Die Tatsache, dass sowohl die Expression als auch die Phosphorylierung von Akt und p70S6K unterdrückt wurde (Abb.5 und 6), bestätigt, dass die HSP90 Inhibition den PI3K/Akt Signaltransduktionsweg hemmt. Die Expression der ERK, STAT3 und β -Actin Proteine blieb bei allen getesteten Konzentrationen unverändert.

Cakir and Grossman⁸⁵ berichteten, dass 17-AAG, ein HSP90 Inhibitor die Expression von EGFR und IGF1R in der NCI-H727 Zelllinie reduziert. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei BON1 und NCI-H727 Zellen nach einer Behandlung der Zellen mit AU922 und HSP990 beobachtet werden. Wurden BON1 24 Stunden lang den beiden HSP90 Inhibitoren ausgesetzt, so reduzierte sich die Expression der EGFR

⁸⁵ Cakir M&Grossman A, The molecular pathogenesis and management of bronchial carcinoids. Expert Opin Ther Targets 15:457-491

und ErbB2 Rezeptoren bereits bei einer Konzentration von 5 bis 10nM (Abb.10.). Auf die ErbB3 Expression trifft diese Beobachtung nicht zu. Im Falle der NCI-H727 Zellen wurde die Expression von ErbB2 und IGF-I Rezeptoren durch die Inhibition von HSP90 komplett inhibiert, während die Expression der EGFR und ErbB3 Rezeptoren gehemmt wurde (Abb.11).

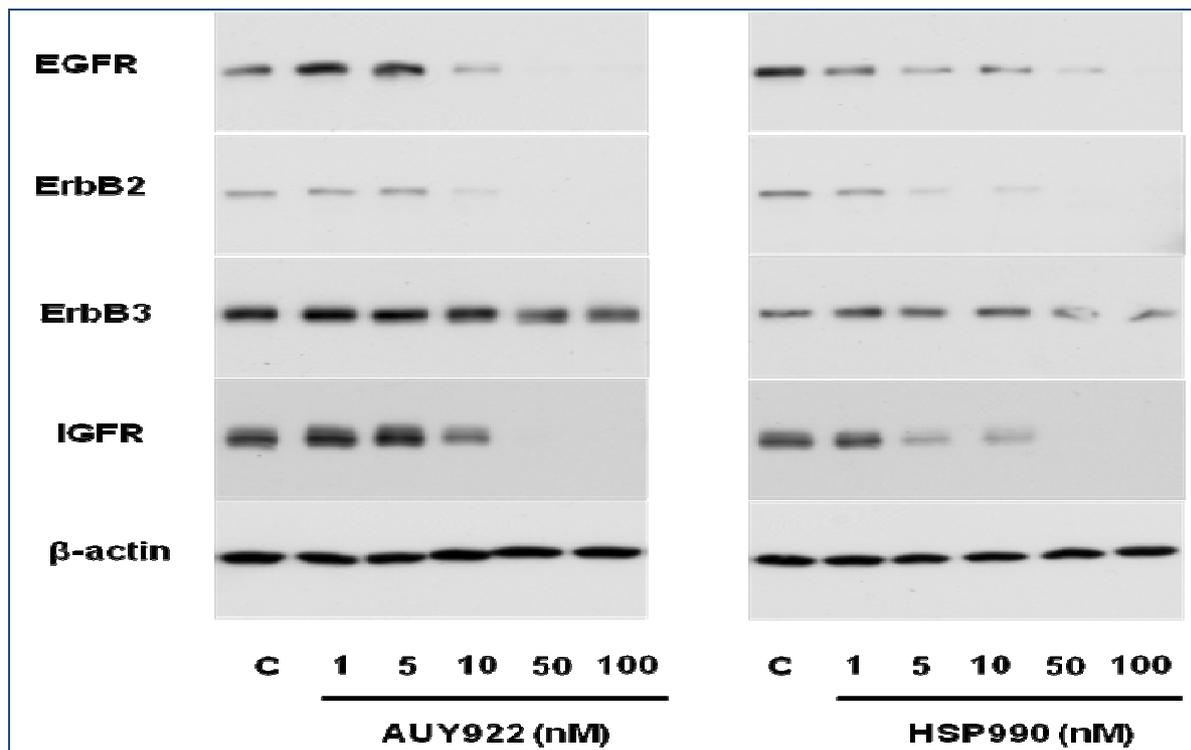


Abb.10. Auswirkung der HSP90 Inhibition auf die Expression der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in BON 1 Zellen
 BON 1 Zellen wurden 24 Stunden lang mit AUY922 (linke Spalte) und HSP990 (rechte Spalte) in ansteigenden Konzentrationen behandelt. Die Expression der EGFR, ErbB2, ErbB3 and IGF1 Rezeptoren als auch der Kontrolle mit β -actin ist gezeigt. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

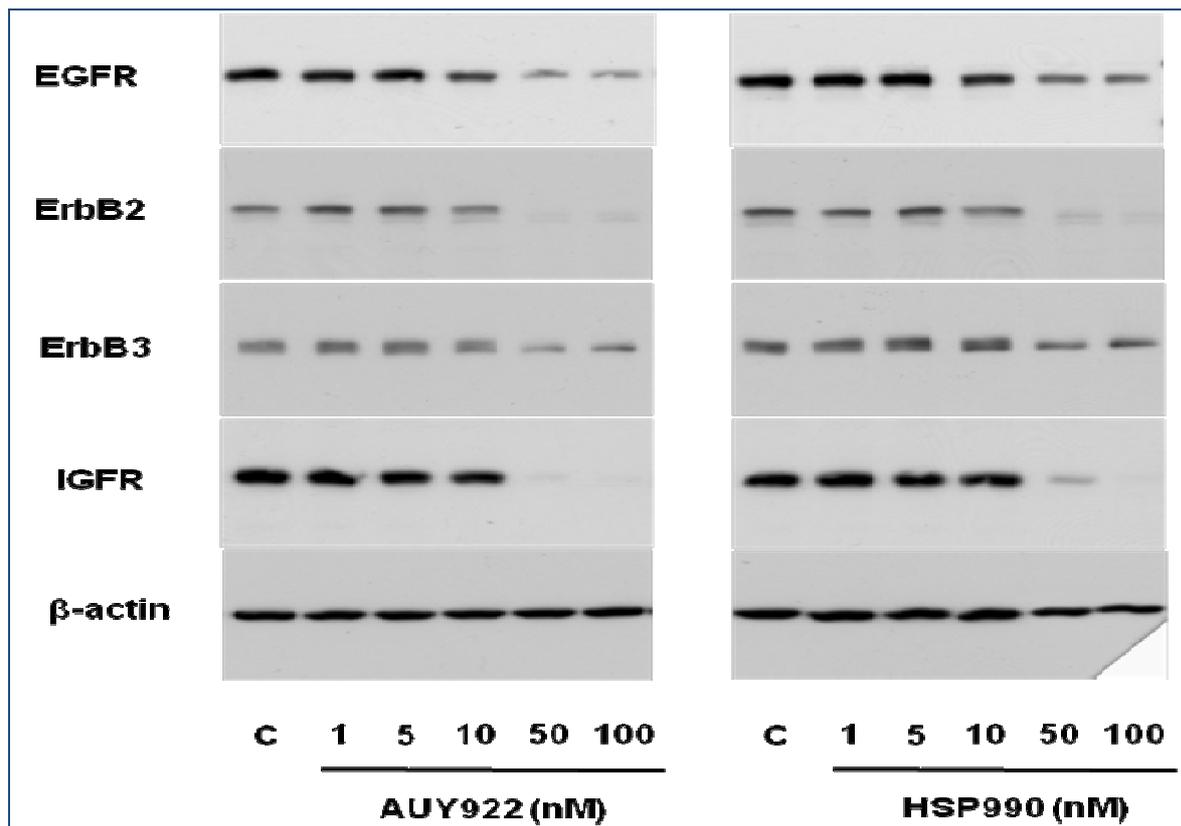


Abb.11. Auswirkung der HSP90 Inhibition auf die Expression der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in NCI-H727 Zellen

NCI-H727 Zellen wurden 24 Stunden lang mit AU922 (linke Spalte) und HSP990 (rechte Spalte) in ansteigenden Konzentrationen behandelt. Die Expression der EGFR, ErbB2, ErbB3 and IGF1 Rezeptoren als auch der Kontrolle mit β -actin ist gezeigt. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

VI. Diskussion

Die bisher verwendeten medikamentösen Therapieoptionen bei GEP-NET sind rein palliative Therapieansätze zur Tumorkontrolle und / oder Symptomkontrolle. Der Einsatz neuer molekular zielgerichteter Therapieansätze bei NET wie Everolimus und Sunitinib hat zwar zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens geführt, jedoch erscheint die Effizienz dieser Substanzen insgesamt limitiert. Deshalb ist man bestrebt, weitere effektive Therapieoptionen zu finden, welche eine verbesserte Tumorkontrolle im Sinne einer partiellen tumorresponse oder stable disease ermöglichen, oder eventuell auch die Chance einer kompletten Tumorresponse bieten.

Tumoren zeichnen sich durch schnelles, infiltrierendes Wachstum aus und das dank ihrer Fähigkeit, die Aktivität der Signaltransduktionswege, die die Proliferation

steuern zu steigern und Kontrollpunkten wie zum Beispiel zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen zu entgehen⁸⁶.

So konnte Shah et al.⁸⁷ zeigen, dass NET eine hohe Aktivität von Akt und ERK aufweisen. Dieser Nachweis wurde auch in den Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen erbracht (Abb. 8./9.). Zitzmann et al.⁸⁸ gelang der Nachweis, dass im Rahmen eines Kompensationsmechanismus Akt hochreguliert wird, wenn mTOR und Raf Inhibitoren eingesetzt werden. Die Tatsache, dass viele der bekannten Signaltransduktionswege untereinander verknüpft und aufeinander subtil eingestellt sind, legt die Vermutung nahe, dass gleichzeitiges Blockieren der zahlreichen neuroendokrinen Signalkaskaden ein vielversprechendes Konzept bieten könnte.

Da das Hitzeschockprotein 90 in zahlreichen soliden Tumoren⁸⁹, hämatoonkologischen Erkrankungen⁹⁰ und gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren⁹¹ verstärkt exprimiert wird und das Überleben der entarteten Zellen sichert, wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der Inhibierung des Hitzeschockproteins 90 auf die neuroendokrine Zellproliferation und Signalkaskaden getestet.

HSP90 Inhibitoren sind ein vielversprechender Angriffspunkt in der Onkologie, weil HSP90 durch seine Funktion als Stabilisator und Kontrolleur von über 100 Proteinen, wovon viele Oncoproteine sind, in die Angiogenese, Metastasierung, Zellteilung eingreift⁹². HSP90 Inhibition löst simultane Degradierung dieser Oncoproteine durch den Ubiquitin-abhängigen Proteasom-Signaltransduktionsweg⁹³ aus.

⁸⁶ Yao J et al. Clin Cancer Res 2013

⁸⁷ Shah T, Hochhauser D, Frow R, Quaglia A, Dhillon AP & Caplin ME 2006, Epidermal growth factor receptor expression and activation in neuroendocrine tumours. J Neuroendocrinol 18: 355-360.

⁸⁸ 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; 295: 100-109.

⁸⁹ Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al: A high-affinity conformation of HSP90 confers tumour selectivity on HSP90 inhibitors, Nature 2003;425:407-10

⁹⁰ Martin Kaiser, Britta Lamottke et al.: Synergistic action of the novel HSP90 Inhibitor NVP-AUY922 with histone deacetylase inhibitors, melphalan or doxorubicin in multiple myeloma. European Journal of Haematology 84 (337-344)

⁹¹ Gilbert JA et al. Endocr Relat Cancer 2010 Jun 25;17(3):623-36

⁹² Trepel J, Mollapour M, Giaccone G & Neckers L, Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. Nat Rev Cancer 10: 537-539.

⁹³ British Journal of Cancer, 2009, 100(10), 1523-1529

Den gesteigerten HSP90 Expressionsraten verdanken Tumorzellen ihr Überleben im widrigen azidotischen und hypoxischen Milieu. Aus diesem Grund reagieren Tumorzellen auch hypersensibel auf den Einsatz von HSP90 Inhibitoren⁹⁴.

In der vorliegenden Arbeit wurden - im Rahmen eines Teilprojekts des vom BMBF-geförderten Münchener Biotech Cluster m4-Projekts - von der Firma Novartis die zwei HSP90 Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-HSP990 zur Verfügung gestellt. Diese nicht von Geldanamycin abgeleitete HSP90 Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-HSP990 wurden auf ihre Wirkung auf die Zellviabilität bei NET, vertreten durch BON1 (metastatic human carcinoid tumor of the pancreas), NCI-H727 (human lung non-small cell carcinoma) und GOT1 (human midgut carcinoid tumor) untersucht. Initial wurde die Expression von HSP90 in allen drei Zelllinien bestätigt (Abb.1). Man nimmt an, dass diese Substanzen aufgrund der Unabhängigkeit vom NAD(P)H:quinone Oxidoreduktase 1 (NQO1) Stoffwechsel, der P Glykoprotein Expression der günstigen Wasserlöslichkeit, Vorteile gegenüber Ansamycin Benzoquinone HSP90 Inhibitoren wie das 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) bieten.

Die Behandlung der BON1 und NCI-H727 Zellen mit den beiden HSP90 Inhibitoren AUY922 und HSP990 führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Abnahme der Zellviabilität (Abb. 2A-D). In der Literatur findet man Hinweise, dass 17-AAG in einer Konzentration von 70,4nM die Zellviabilität der NCI-H727 Zellen um 50% reduziert.. In der vorliegenden Studie sah man eine signifikante Beeinträchtigung der Zellviabilität bereits ab einer Konzentration von 5nM nach 24-72 Stunden. Behandelt man BON1 Zellen mit AUY922, vermerkt man bei einer Konzentration von 5nM einen Zellviabilitätseinbruch auf 20% nach einer 144 Stunden Inkubation, bei HSP990 hingegen nur 65% nach 144 Stunden. Auffällig ist, dass bei beiden Substanzen bei einer Konzentration bis 1nM die Zellviabilität nicht beeinträchtigt ist. Bei NCI-H727 sinkt die Zellviabilität nach der Behandlung mit HSP990 ab einer Konzentration von 10nM. Aufgrund des langsamen Zellwachstums von GOT1 Zellen, wurden diese mit den beiden HSP90 Inhibitoren 72 und 144 Stunden behandelt (Abb.2. E/F). Erwähnenswert hier ist, dass sich die Wachstumskurve bei HSP990 sowohl nach 72

⁹⁴ Kamal A¹, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ.: A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. Nature. 2003 Sep 25;425(6956):407-10

Stunden als auch nach 144 Stunden bis zu einer Konzentration von 5nM plateauartig hält um dann auf Werte unter 10% zu fallen. Dass sich bei allen drei Zelllinien die Zellviabilität bis zu einer Konzentration von 1nM plateauartig hält, ist vermutlich auf die Hochregulierung von HSP70 zurückzuführen. Die kompensatorische Hochregulierung von HSP 70 scheint eine Toleranzgrenze bis 1nM aufzuzeigen.

Die durchgeführte FACS Analyse und Proteinnachweis mittels Western blot zeigen, dass der antiproliferative Effekt der beiden HSP90 Inhibitoren bei den drei untersuchten Zelllinien auf Apoptose zurückzuführen ist. In den Durchflusszytometrie Versuchen zeigte sich ein Zuwachs an Zellen in der Sub-G0/1-Phase (Abb.4A-C) und es konnte eine Spaltung des PARP nachgewiesen werden (Abb.5). Gleiche Ergebnisse gelang es bei Zelllinien des Multiplen Myeloms⁹⁵ und bei Zelllinien des Glioblastoms⁹⁶ zu erzielen.

HSP90 Inhibition erweist sich als ein vielversprechender Angriffspunkt in der Therapie der NET nicht nur, weil es bei BON1 die Apoptose auslöst, sondern auch den Zellzyklusvorgang behindert. Dieser Umstand ist ersichtlich aus der Reduktion des Zellanteils, der in die S-Phase eintritt und des Zellzyklusarrestes in der G2-Phase (Abb.3.A/B). Dieser Effekt blieb bei den NCI-H727 und GOT1 Zellen aus. Ein stärkerer Einbruch der Zellviabilität bei BON1 Zellen im Vergleich zu NCI-H727 Zellen, könnte auf der Inhibierung des Zellzyklus zusätzlich zur Induktion der Apoptose beruhen. Unterschiedliche Wachstumsraten der getesteten Zelllinien könnten ebenfalls eine Auswirkung auf die Zellzyklusanalyse haben.

Eine Alternative zum Hitzeschockprotein 90 als Target in der Therapie könnten auch die Mitglieder der ErbB Rezeptorfamilie wie EGFR und ErbB2 als auch IGFI-R, die ebenfalls in NET stark exprimiert werden⁹⁷, darstellen. In der vorliegenden Arbeit gelang auch der Nachweis einer AUY922 und HSP990 vermittelten Inhibierung der

⁹⁵ Stühmer T, Zöllinger A, Siegmund D, Chatterjee M, Grella E, Knop S, Kortüm M, Unzicker C, Jensen MR, Quadt C, Chène P, Schoepfer J, García-Echeverría C, Einsele H, Wajant H, Bargou RC. Signalling profile and antitumour activity of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008 Aug;22(8):1604-12.

⁹⁶ Gaspar N, Sharp SY, Eccles SA, Gowan S, Popov S, Jones C, Pearson A, Vassal G, Workman P. Mechanistic evaluation of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in adult and pediatric glioblastoma. *Mol Cancer Ther*. 2010 May;9(5):1219-33. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0683.

⁹⁷ Gilbert JA, Adhikari LJ, Llyod RV, Rubin J, Haluska P, Garbini JM, Gottardis MM & Ames MM, Molecular markers for novel therapies in neuroendocrine (carcinoid) tumors. *Endocr Relat Cancer* 17: 623-636.

ErbB Rezeptoren (EGFR, ErbB2 und ErbB3). Ebenso konnte die Expression der IGFI Reptoren in BON1 und NCI-H727 Zellen nachgewiesen werden. Neuroendokrine Tumoren sind charakterisiert durch eine hohe Aktivität der PI3K-Akt/PKB und Ras-Raf-MEK-Erk ½ Signalkaskaden. Die drei untersuchten Zelllinien weisen eine hohe basale Akt-, ERK-, p70S6K -und 4EBP1-Phosphorylierungsrate auf. Durch die HSP90 Inhibition konnte die Aktivität in den beiden Signaltransduktionswegen gehemmt werden. Dieses gelang zum Teil möglicherweise durch die Blockade der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Interessant ist, dass durch die Inhibition von HSP90 nicht nur die Phosphorylierung von Akt an Serin473 beeinflusst wird, sondern bei BON1 sich auch Akt ab einer Konzentration von 50nM im Western Blot nicht mehr nachweisen lässt. Dafür, dass die HSP90 Inhibition kein toxischer Effekt war, spricht, dass die Expression von ERK, STAT und β-Actin unverändert blieb. Außerdem wurde die Inhibierung des Hitzeschockproteins 90 durch einen kompensatorischen Anstieg des HSP70, was als Biomarker der HSP90 Inhibition gilt, begleitet (Abb. 1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AUY922 und HSP990 antiproliferative Wirkung erzeugen, indem sie in die komplexen P(3)K-Akt-mTOR und Ras-Raf-MEK-Erk1/2 Signaltransduktionswege eingreifen.

AUY922 und HSP990 lösen Apoptose in allen drei untersuchten Zelllinien und bei BON1 Zellen Zellzyklusarrest in der G2-Phase aus.

Obwohl HSP90 ubiquitär vorkommt, zeigt die erste Phase I Studie an Patienten mit soliden Tumoren mit dem neuen HSP90 Inhibitor Ganetespib, dass das Nebenwirkungsprofil tolerabel⁹⁸ ist. In der Studie erhielten die Patienten einmal wöchentlich Ganetespib in unterschiedlichen Dosierungen intravenös und zwar dreimal in einem vier Wochen Zyklus. Die am meisten aufgetretenen Nebenwirkungen waren Diarrhöe, Fatigue, Übelkeit und Erbrechen. Anhand der in der Phase I Studie erhobenen Daten, wurde die Dosis von 200mg/m²⁹⁹ für die Phase II Studie empfohlen.

⁹⁸ Goldman JW et al: A first in human, safety, pharmacokinetics, and clinical activity phase I study of once weekly administration of the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) in patients with solid malignancies. BMC Cancer.2013 Mar 25;13:152

⁹⁹ Goldman JW et al: A first in human, safety, pharmacokinetics, and clinical activity phase I study of once weekly administration of the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) in patients with solid malignancies. BMC Cancer.2013 Mar 25;13:152

Wenn man die Komplexität der neuroendokrinen Tumoren beachtet, so ist anzunehmen, dass wenn man lediglich eine Signalkaskade durch die Inhibierung der Aktivität einer Komponente anstrebt, so ist auf lange Dauer gesehen nicht mit einer effektiven Therapie zu rechnen, weil sich Resistenzen entwickeln und Kompensationsmechanismen aktiviert werden¹⁰⁰. Deshalb wäre eine Kombinationstherapie mit anderen derzeit verwendeten Substanzen vermutlich anzustreben.

In den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, konnte gezeigt werden, dass durch die HSP 90 Inhibition gleichzeitig zwei wichtige neuroendokrine Signalkaskaden unterdrückt werden und es dadurch zu Induktion der Apoptose und Einbruch der Zellviabilität kommt. Aufgrund der hohen Expression von HSP 90 in neuroendokrinen Tumoren, eignet sich die Inhibierung des Hitzeschockproteins 90, auch in Kombination mit anderen molekularen Targets für die Therapie aggressiver NET, vor allem der Tumoren, die resistent gegenüber konventionellen Therapieoptionen sind.

¹⁰⁰ 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*; 295: 100-109.

VII. Literaturverzeichnis

- ACS Chemical Biology, Jahrgang 2006, ACS Publications
- American Journal of Gastroenterology, Jahrgang 2010, Nature publishing Group
- Annals of the New York Academy of Sciences, Jahrgang 2004
- Biochemical and Biophysical Research Communications, Jahrgang 2001, Elsevier
- Biochimica et Biophysica Acta, Jahrgang 2004, Elsevier
- Breast Cancer Research, Jahrgang 2008, BioMed Central Ltd
- Cancer Chemotherapy and Pharmacology, Jahrgang 2005, Springer
- Cancer Letter, Jahrgang 2010, Elsevier
- Cancer Research, Jahrgang 2008/2013, AACR
- Cell Cycle, Jahrgang 2009, Taylor& Francis Group
- Cell, Jahrgang 1998, Elsevier
- Cellular Signalling, Jahrgang 2004, Elsevier
- Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, Jahrgang 2013, Elsevier
- Clinical cancer research, Jahrgang 2009/2013, American Association for Cancer Research
- Current Topics in Medicinal Chemistry, Jahrgang 2006, Bentham Science
- Drug Resistance Updates, Jahrgang 2009, Elsevier
- Endocrine Pathology, Jahrgang 2007/2008/2011, Springer

- ENETS 2011 Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Tumors
- Experimental biology and medicine, Jahrgang 2003, SAGE publications
- Expert Opinion on Biological Therapy, Jahrgang 2002, Informa healthcare
- FEBS Letters, Jahrgang 2005/2007, Elsevier
- International Journal of Oncology, Jahrgang 2012, Spandidos Publications
- Internist, Jahrgang 2012, Springer
- Japanese Cancer Association, 2011
- Journal of Endocrinological Investigation, Jahrgang 1997, Springer
- Journal of Histochemistry & Cytochemistry, Jahrgang 1969/1995, SAGE Group
- Journal of Medicinal Chemistry, Jahrgang 2008, ACS
- Lancet Oncology, Jahrgang 2008/2013/2014, Elsevier
- Lancet, Jahrgang 1963/2011, Elsevier
- Langenbeck's Archives of Surgery, Jahrgang 2011, Springer
- Molecular Cancer Therapeutics, Jahrgang 2010, AACR
- Molecular cell, Jahrgang 2003, Cell press
- Neuroendocrinology, Jahrgang 2006/ 2012, Karger
- Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes, 2008, MANUAL, by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München
- New England Journal of Medicine, Jahrgang 2011, Massachusetts Medical Society

- NIH Clinical Trials.gov
- The investigational drugs journal , Jahrgang 2006, Research Gate
- The Journal of Clinical Investigation, Jahrgang 2013, American Society of Clinical Investigation
- Trends in Biochemical Sciences, Jahrgang 2006, Cell Press
- Virchows Archiv, Jahrgang 2001/2006/2010, Springer
- World Journal of Surgery, Jahrgang 2010, Springer

Eidesstattliche Versicherung

Ailer-Märzluft, Galina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„In vitro Untersuchungen zur Rolle der HSP90 Inhibitoren als neuer therapeutischer Ansatz in der Therapie der neuroendokrinen Tumoren“

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

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

Ulm, 19.01.2015

Ort, Datum

Unterschrift DoktorandIn/Doktorand

Danksagung

Besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Christoph Auernhammer für seine zahlreichen Anregungen und seine geduldige Unterstützung. Weiter gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Kathrin Zitzmann und Herrn Gerald Spöttl für Ihre fachkundige Anleitung bei der Vorbereitung der Experimente.