

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie  
(Campus Virchow-Klinikum) der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Funktionelle Inhibition des Fibronektinrezeptors  $\alpha_5\beta_1$   
Integrin in humanen neuroendokrinen Tumorzellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Antonios Douros  
aus Patras, Griechenland

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. B. Wiedenmann  
                          2. Prof. Dr. med. R. Tauber  
                          3. Prof. Dr. W. W. Franke

Datum der Promotion: 03.06.2012

***Für meine Julia***

1. EINLEITUNG.....	7
1.1 Neuroendokrine Tumoren.....	7
1.1.1 Klassifikationen.....	8
1.1.2 Epidemiologie.....	9
1.1.3 Ätiologie.....	9
1.1.4 Klinik.....	10
1.1.5 Diagnostik.....	10
1.1.6 Prognose.....	11
1.1.7 Therapie.....	12
1.1.8 Neue Therapieansätze.....	13
1.2 Integrine.....	14
1.2.1 Struktur.....	14
1.2.2 Funktion.....	15
1.2.3 Regulationsmechanismen der Integrinfunktion.....	16
1.2.4 Zelladhäsion, -migration, -invasion und -polarität.....	18
1.2.5 Zellwachstum.....	19
1.2.6 Angiogenese.....	21
1.3. $\alpha_5\beta_1$ Integrin.....	22
1.3.1 Funktion.....	22
1.3.2 Expression.....	22
1.3.3 $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Antagonisten.....	23
1.3.4 Fragestellung: Therapeutische Wirksamkeit einer funktionellen Inhibition des FN-Rezeptors $\alpha_5\beta_1$ Integrin in NETs.....	24
2. MATERIAL UND METHODEN.....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Reagenzien.....	26
2.1.2 Antikörper.....	27
2.1.3 Testsubstanzen.....	27
2.1.4 Zellen.....	28
2.2 Zellpflege, -passage und -synchronisation.....	28
2.3 Quantitative Bestimmung der Integrinexpression mittels Durchflusszytometrie.....	29
2.4 MTT Adhäsionsassay.....	29
2.4.1 Prinzip.....	30
2.4.2 Durchführung mit BON Zellen.....	30
2.4.3 Durchführung mit QGP-1 Zellen.....	31
2.5 Proliferationsassay.....	31
2.5.1 Durchführung mit BON Zellen.....	31
2.5.2 Durchführung mit QGP-1 Zellen.....	32

2.6. JC-1 Assay .....	32
2.6.1 Prinzip .....	32
2.6.2 Durchführung .....	32
2.7 Zellzyklusanalyse .....	33
2.7.1 Prinzip .....	33
2.7.2 Durchführung unter adhärenenten Kulturbedingungen .....	33
2.7.3 Durchführung unter Anoikisbedingungen .....	34
2.8 Western-Blot .....	34
2.8.1 Präparation von Proteinlysaten .....	34
2.8.2 Proteinauftrennung .....	35
2.8.3 Western-Blot .....	35
2.8.4 Western-Blot mit Phospho-Antikörpern .....	36
2.8.5 Strippen .....	36
2.8.6 Puffer und Gele .....	37
2.9 Literaturrecherche .....	38
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
3.1 BON und QGP-1 Zellen exprimieren $\alpha_5\beta_1$ Integrin an ihrer Oberfläche .....	39
3.2 JSM8757 hemmt die Adhäsion und Proliferation von NET Zellen .....	41
3.2.1 JSM8757 hemmt dosisabhängig die Adhäsion in BON Zellen .....	41
3.2.2 JSM8757 hemmt dosisabhängig die Adhäsion in QGP-1 Zellen .....	42
3.2.3 JSM8757 hemmt dosis- und zeitabhängig die Proliferation adhärenter BON Zellen .....	43
3.2.4 JSM8757 hemmt dosis- und zeitabhängig die Proliferation adhärenter QGP-1 Zellen .....	45
3.3 JSM8757 induziert keine Apoptose in adhärenenten NET Zellen .....	47
3.4 JSM8757 bewirkt eine Reduktion von Apoptose in QGP-1 Zellen unter substratfreien Bedingungen .....	49
3.5 Zellzyklusanalyse nicht synchronisierter NET Zellen .....	51

3.6 JSM8757 inhibiert die Zellzyklusprogression in BON Zellen durch Verzögerung der G1/ S-Passage.....	53
3.6.1 JSM8757 verzögert die Zyklin A-Induktion und inhibiert die Zyklin B-Induktion in G1-synchronisierten BON Zellen.....	56
3.6.2 JSM8757 hat keinen Effekt auf die CKI-Expression in G1-synchronisierten BON Zellen.....	59
3.7 JSM8757 inhibiert die Zellzyklusprogression in QGP-1 Zellen durch Verzögerung der G1/ S-Passage.....	61
3.7.1 JSM8757 verringert in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen die Expression von Zyklin A und Zyklin B.....	63
3.7.2 JSM8757 bewirkt eine starke Erhöhung der CKI-Expression In G1-synchronisierten QGP-1 Zellen.....	66
3.7.3 JSM8757 verzögert die pErk-Induktion in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen.....	67
4. DISKUSSION.....	68
4.1 Innovative Therapieansätze bei NETs durch „Targeted Therapies“ .....	68
4.2 Darstellung und Beurteilung der Ergebnisse.....	68
4.2.1 Dualer therapeutischer Ansatz.....	68
4.2.2 Expression des FN-Rezeptors in NET Zelllinien.....	69
4.2.3 Inhibition von Adhäsion und Proliferation in NET Zelllinien durch JSM8757.....	69
4.2.4 Effekt auf Apoptose und Anoikis.....	70
4.2.5 JSM8757 inhibiert die Zellzyklusprogression in BON und QGP-1 Zellen durch Verzögerung der G1/ S-Passage.....	71
4.3 Ausblick.....	73
4.3.1 Untersuchung der $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Expression in weiteren NET Zelllinien.....	73
4.3.2 <i>In vivo</i> Experimente im BON orthotopen Mausmodell.....	74
4.4 Fazit.....	75
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	76
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	77

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Neuroendokrine Tumoren

Neuroendokrine Tumoren (NETs) stellen eine Gruppe von Neoplasien dar, die in jeder Lokalisation im Körper als Folge einer malignen Transformation der disseminiert vorliegenden neuroendokrinen Zellen entstehen können [1]. Mit Abstand am häufigsten entstehen NETs im Gastrointestinaltrakt (GIT) (66,9 %) und im bronchopulmonalen System (24,5 %) [2].

Obwohl die Inzidenz von NETs eher gering ist, ist die Prävalenz hoch, was den generell hohen Differenzierungsgrad, die niedrigen Wachstumsraten und ein im Vergleich zu anderen epithelialen Tumoren eher niedrigeres malignes Potential widerspiegelt [1].

Die NETs des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NETs) stammen hauptsächlich entweder aus den sog. enterochromaffinen (EC) Zellen der GI-Mukosa oder aus endokrinen Zellen des Pankreas [3], wobei die Mechanismen, die dieser Differenzierung zugrunde liegen, bis heute weitgehend unbekannt bleiben [4]. Im ersten Fall können GEP-NETs verschiedene bioaktive Substanzen wie Serotonin, Kallikrein, Tachykinine und Prostaglandine produzieren, während im zweiten Fall eher Peptidhormone wie Insulin, Glukagon, Gastrin, vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Somatostatin gebildet und/ oder sezerniert werden. Gemeinsame Sekretionsprodukte aller NET Zellen sind Chromogranin A (Glykoprotein der sekretorischen Granula), Synaptophysin (Glykoprotein der synaptischen Vesikeln) und neuronenspezifische Enolase (Enzym des Glukosestoffwechsels) [3]. Ein weiteres biologisches Merkmal dieser Tumoren ist die erhöhte Expression von Somatostatinrezeptoren (SSTR), insbesondere von SSTR-2 und SSTR-5 [5]. Somatostatin, ein wichtiges Peptidhormon, das sowohl im Gehirn als auch in Zellen des GITs gebildet wird, hat eine inhibitorische Wirkung auf die Darmmotilität und die Ausschüttung von verschiedenen Hormonen wie Gastrin, VIP, Insulin und Glukagon.

### 1.1.1 Klassifikationen

Das hohe Maß an morphologischer und biologischer Heterogenität, das diese Tumorentität aufweist, führte zu unterschiedlichen Versuchen einer Einteilung. Als erster beschrieb Siegfried Oberndorfer 1907 die NETs. Er hatte dafür die Bezeichnung „Karzinoid“ (griechisch: Karzinoma-ähnlich) verwendet [6].

Heutzutage wird für die NETs des gastroenteropankreatischen Systems die Bezeichnung GEP-NETs benutzt. Zu dieser Gruppe gehören Tumorentitäten, die von den neuroendokrinen Zellen der GI-Mukosa und des Pankreas ausgehen: GI-Karzinome, Insulinome, Gastrinome, VIPome, Glukagonome, Somatostatinome und nicht funktionelle endokrine pankreatische Tumoren (EPTs) [3]. Die alte Bezeichnung Karzinoid wird weiter für die Neoplasien angewendet, die aus den EC Zellen stammen.

Die WHO Klassifikation für die GEP-NETs unterscheidet wiederum zwischen gut differenzierten endokrinen Tumoren (benignes Verhalten oder unklares malignes Potential), gut differenzierten endokrinen Karzinomen (low-grade Malignität) und schlecht differenzierten endokrinen Karzinomen (high-grade Malignität). Jede Subgruppe wird weiter anhand des Vorliegens hormoneller Aktivität unterteilt (funktionell bzw. nicht funktionell) [1]. Karzinoid wird ebenfalls im Rahmen dieser Klassifikation benutzt und zwar als Synonym für gut differenzierte Tumoren [6].

Die Tatsache, dass „Karzinoid“ bei mehreren NET Klassifikationen auftaucht, kann natürlich zu Missdeutungen führen. Dies soll im Rahmen dieser Arbeit vermieden werden, indem der Terminus ausschließlich für die aus EC Zellen stammenden NETs verwendet wird.

Eine weitere Klassifikation benutzt als Unterscheidungskriterium die ontogenetische Herkunft und unterteilt die GEP-NETs in foregut Tumoren (Magen, Pankreas, Gallenblase, Duodenum), midgut Tumoren (Jejunum, Ileum, Appendix, rechtes Kolon) und hindgut Tumoren (linkes Kolon, Rektum) [7]. Diese Einteilung findet oft im klinischen Alltag Anwendung. Der Grund dafür ist eine gewisse Ähnlichkeit der Symptomatik und der klinischen Verläufe in den drei o.g. Kategorien.

Auch nach Einführung der WHO Klassifikation besteht eine anhaltende Debatte, inwiefern die gegenwärtig genutzten Klassifikationen eine biologisch, klinisch und prognostisch relevante Stratifizierung der NET Patienten erlauben. So zeichnet sich ab, dass pankreatische und intestinale NETs erhebliche Unterschiede aufweisen [3]. Aktuelle Empfehlungen einer separaten Klassifikation dieser Tumorarten wurden in den

Consensus Conferences der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) formuliert [8;9]. Dort werden basierend auf der o.g. Einteilung in foregut, midgut und hindgut Tumoren für jeden organspezifischen Subtyp ein TNM System und ein Grading vorgeschlagen. Spezifische funktionelle Aktivität, genetischer Hintergrund und Haupttumorzelltyp werden dabei nicht berücksichtigt. Diese neue Klassifikation sollte zu einer Standardisierung der prognostischen Einschätzung von NETs beitragen.

### **1.1.2 Epidemiologie**

Die Seltenheit von NETs war lange Zeit ein schweres Hindernis für die Erfassung epidemiologischer Daten. Laut einer aktuellen Studie, die auf der Swedish Family-Cancer Database basiert, haben NETs insgesamt eine jährliche Prävalenz von 2,4 Fällen pro 100.000 Frauen und von 2 Fällen pro 100.000 Männer [10]. Diese leichte Dominanz bei den Frauen war statistisch signifikant und zum größten Teil Folge der höheren Inzidenz von Appendix-Läsionen, von denen Frauen 2,1mal häufiger als Männer betroffen waren. Das mittlere Erkrankungsalter war höher als 50 Jahre für alle Lokalisationen mit Ausnahme des Appendix, wo es 32 Jahre für Männer und 31 Jahre für Frauen betrug [10]. Im Rahmen einer weiteren Studie wurde die jährliche Inzidenz der EPTs ca. 5 pro 1.000.000 Einwohner berechnet. Bezogen auf die Gesamtgruppe der malignen Erkrankungen stellen wiederum die Karzinoide (sowohl des GITs als auch des bronchopulmonalen Systems) einen Anteil von ca. 0,46 % dar [2]. In den letzten Jahren wurde zwar eine Erhöhung der Inzidenz festgestellt, was aber mit großer Wahrscheinlichkeit eine Folge der dramatischen Verbesserung der Diagnostik ist [11].

### **1.1.3 Ätiologie**

Die meisten NETs werden als sporadische Tumoren, d.h. nicht familiär bedingt, eingestuft. Ihre Ätiologie ist gegenwärtig unbekannt [12-15]. Im Unterschied zu zahlreichen anderen epithelialen Tumoren sind bislang auch keine präneoplastischen Läsionen bekannt. Ein überzeugender Hinweis auf mögliche erbliche Ursachen ist allerdings das Auftreten dieser Tumoren im Rahmen genetischer Syndrome wie multiple endokrine Neoplasie Typ1 (MEN1), von Hippel-Lindau Syndrom oder Neurofibromatose Typ1 [6]. Interessanterweise wurde vor kurzem bei umfangreichen Sequenzierungsarbeiten an pankreatischen NETs eine besondere Häufung somatischer

Mutationen in Genen aufgedeckt, deren Genprodukte am „chromatin remodeling“ beteiligt sind. Diese betrafen in 44 % der Tumoren das MEN1 Gen und unterstreichen somit die angenommene Rolle von MEN1 bei dieser Erkrankung. Darüberhinaus spiegeln sie möglicherweise eine besondere Bedeutung von DNA-Reparaturmechanismen in der Pathogenese der pankreatischen NETs wider [16]. Mutationen des mTOR Signalweges, der angesichts der klinischen Verfügbarkeit von mTOR Inhibitoren von großer therapeutischer Relevanz ist (**s. Kapitel 1.1.8**), fanden sich demgegenüber nur in 14 % der Patienten.

#### **1.1.4 Klinik**

Häufig entwickeln sich NETs über einen langen Zeitraum ohne klinische Symptome. So verursachen foregut Tumoren nur in der Hälfte der Fälle Symptome, z.B. Unterzuckerung bei überschießender Insulinproduktion (Insulinom) oder häufige Magen- und Dünndarmgeschwüre (Zollinger-Ellison-Syndrom) bei vermehrter Gastrinproduktion [7]. Midgut Tumoren lösen zu ca. 40 % das sog. Karzinoid-Syndrom aus, das auf der Ausschüttung biogener Amine beruht und sich durch die klinische Trias von Flush, Diarrhö und Endokardfibrose (meist des rechten Herzens) auszeichnet [17]. Diese Symptomatik ist bereits ein Hinweis auf das Vorliegen von Lebermetastasen, da diese zur Sekretion von vasoaktiven Substanzen wie Serotonin und Tachykinine direkt in den systemischen Kreislauf führen können [11]. Hindgut Tumoren sind dagegen nie funktionell. Symptome treten meist erst spät auf und sind dann unspezifisch (z.B. Stenose) [7].

#### **1.1.5 Diagnostik**

Klinische Symptome sollten zu einer Abklärung der Diagnose mittels biochemischer Marker und bildgebender Diagnostik führen [6]. Bei der Labordiagnostik der GI-Karzinoide gibt es zwei Goldstandards: die Bestimmung von 5-Hydroxyindolessigsäure (Abbauprodukt von Serotonin) im 24 h-Urin und von Chromogranin A im Serum. Bei den EPTs wird Chromogranin A im Serum gemessen, sowie das jeweilige Nüchternhormon im Fall von funktionellen Tumoren [11].

Die optimale bildgebende Diagnostik hängt davon ab, ob eine Verdachtsdiagnose bei einem Patienten gesichert werden muss, oder ob die Ausdehnung der Krankheit bei einem schon bekannten Fall ermittelt werden sollte. Um den Primarius zu detektieren, wird ein multimodales Vorgehen mit CT, MRT, Somatostatinrezeptorzintigraphie (SSRS), endoskopischer Sonographie und Endoskopie ausgewählt. Bei der Suche nach Metastasen hat sich hingegen SSRS als diagnostische Methode der ersten Wahl etabliert [11].

Trotz der Verfügbarkeit spezifischer Tumormarker bleibt die endgültige Diagnose sehr häufig eine Aufgabe des Pathologen, da eine negative Serumdiagnostik einen NET nicht ausschließen kann. Die typische Histologie von gut differenzierten Tumoren zeichnet sich durch eine trabekuläre Struktur, glanduläre oder solide Bereiche und einen niedrigen mitotischen und proliferativen Index aus, während die von schlecht differenzierten Tumoren eine solide Struktur mit häufigen Nekrosen und einer hohen mitotischen und proliferativen Aktivität als Hauptmerkmale besitzt [5]. Insgesamt weist die Diagnosestellung bei fehlender oder unspezifischer Symptomatik erhebliche Schwierigkeiten auf, was sich zum Beispiel im Fall von NETs des Dünndarms in einer durchschnittlichen Dauer von 7 Jahren vom Einsetzen der ersten Symptome bis zur endgültigen Diagnose widerspiegelt [18].

### **1.1.6 Prognose**

Die Prognose von NETs weist im Einzelfall große Unterschiede auf und ist anhand der gegenwärtig verfügbaren Parameter häufig nicht sicher abzuschätzen. Sie ist aber insgesamt vergleichsweise günstig, sofern Magen-, kolorektales- und Pankreaskarzinom als Vergleich herangezogen werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Karzinoide beträgt 67,2 % [2], während die für die EPTs von 97 % (benigne Insulinome) bis 30 % (nicht funktionelle EPTs) variiert [19]. Als positive prognostische Faktoren gelten gute Differenzierung, niedriger Proliferationsindex (Ki67<2 %), niedrige Mitoserate, Fehlen von hepatischen- oder Lymphknotenmetastasen und Tumorgröße kleiner als 3 cm [11].

### 1.1.7 Therapie

Die Behandlung von NETs stellt eine große Herausforderung dar, da der Spontanverlauf dieser Tumoren nicht gut charakterisiert ist. Neben langen Krankheitsverläufen mit oder ohne Hypersekretionssymptomatik, gibt es leider auch hoch aggressive Tumoren, die zu einem frühen Tod führen [1]. Die Zielsetzung der Therapie besteht in der Kontrolle des Tumorwachstums sowie des Hypersekretionssyndroms.

Bei Patienten mit EPTs hat sich die systemische Chemotherapie mit der Kombination von Streptozotocin und 5-Fluoruracil oder Doxorubicin als sinnvoll ergeben, da sie eine Überlebensverlängerung bewirkt [20]. Hingegen ist Chemotherapie bei gut differenzierten metastasierten midgut Tumoren generell nicht indiziert. Am höchsten ist die Wirksamkeit der systemischen Chemotherapie in schnell wachsenden oder schlecht differenzierten Tumoren, wie es mit der Kombination von Cisplatin und Etoposid gezeigt wurde [20]. Insgesamt sind die bisherigen Chemotherapieprotokolle jedoch noch unbefriedigend, da die Ansprechraten bei keinem der Behandlungspläne über 15 % lagen, wenn als Kriterium die 50 %ige Reduktion eines zweidimensional messbaren Tumors genommen wird [6].

Der erste große Durchbruch bei der systemischen Behandlung von NETs kam mit der Einführung von Somatostatinanaloga (Octreotid, Lanreotid). Die erhöhte Expression von SSTR an der Oberfläche von NET Zellen [5] gewährleistet dieser Substanzklasse bis heutzutage eine grundlegende Rolle bei der Palliation von NET assoziierten hormonellen Syndromen wie z.B. dem o.g. Karzinoid-Syndrom, dem Glukagonom-Syndrom und dem Verner-Morrison-Syndrom (mit VIPomen assoziiert) [21]. Eine weitere Entwicklung auf dem Gebiet der NET Behandlung stellt die sog. Radio-Rezeptorthherapie dar. Dabei handelt es sich um radioaktiv markierte Somatostatinanaloga, die nach ihrer Bindung an die SSTR eine dauerhafte Bestrahlung der Tumoren mit Radionukliden wie <sup>90</sup>Yttrium oder <sup>177</sup>Lutetium ermöglichen [4]. Diese Behandlung ist aber bisher wenigen Zentren vorbehalten, sodass weiterhin dringender Bedarf für eine systemische Therapie besteht, die eine signifikante Verlängerung der Lebenserwartung anbietet. Studien mit humanem Leukozyten-Interferon (IFN), IFN- $\alpha$  und - $\beta$  demonstrierten keinen großen therapeutischen Effekt [22-26]. Des Weiteren stellten Nebenwirkungen wie Fieber, Erschöpfung, Anorexie, Gewichtsabnahme, Alopezie und Myelosuppression Nachteile dar [26;27]. Interessante Ergebnisse lieferte

jedoch eine kleine klinische Studie mit pegyliertem (PEG-)IFN- $\alpha$ . Hier zeigte die Applikation dieses modifizierten Interferons bei Patienten mit gut differenzierten neuroendokrinen Karzinomen eine mit dem konventionellen IFN- $\alpha$  vergleichbare Wirksamkeit bei stark verminderten Nebenwirkungen [28].

Angesichts der aktuellen systemischen Therapien bleibt die Operation immer noch die einzige kurative Option und sogar eine der besten Optionen im palliativen Sinn, da allein eine operative Resektion von Lymphknoten- und/ oder Lebermetastasen zu einer Linderung der Symptomatik und einem verlängerten Überleben führen kann [29;30].

### **1.1.8 Neue Therapieansätze**

Aufgrund der nach wie vor unzureichenden palliativen Kontrolle des Tumorwachstums ergibt sich ein dringender Bedarf für eine effiziente, systemische Therapie mit einer akzeptablen Toxizität.

GEP-NETs sind meist gut vaskularisierte Tumoren. Diese Beobachtung wurde in den vergangenen Jahren durch den Nachweis einer hohen Expression von verschiedenen Mitgliedern der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Rezeptor-Familie ergänzt [1]. Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene klinische Studien initiiert, die sich momentan in der Phase II bzw. III befinden, welche die Wirksamkeit von in die VEGF-Signalkaskade eingreifenden Substanzen bei fortgeschrittenen oder metastasierten NETs untersuchen [1]. Diese Substanzen sind entweder monoklonale Antikörper, die gegen VEGF gerichtet sind (z.B. Bevacizumab) oder sog. „Small Molecule Inhibitors“ (SMIs) der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne des VEGF-Rezeptors (z.B. Sunitinib) [21]. Aktuell wurden die Ergebnisse der Phase III Studie mit Sunitinib vorgestellt, die eine Zunahme der progressionsfreien Überlebenszeit sowie eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit zeigten [31].

Ebenfalls erfolgreich wurde soeben eine Phase III Studie mit dem mTOR Inhibitor Everolimus abgeschlossen [32]. Diese Substanz zeichnet sich durch ein Wirkprofil aus, das eine direkte Wachstumshemmung an den Tumorzellen mit einer Inhibition der Angiogenese kombiniert. Möglicherweise erweisen sich solche Therapieansätze mit einem kombinierten Wirkmechanismus bei den biologisch sehr heterogenen NETs als besonders erfolgversprechend [33].

## 1.2 Integrine

### 1.2.1 Struktur

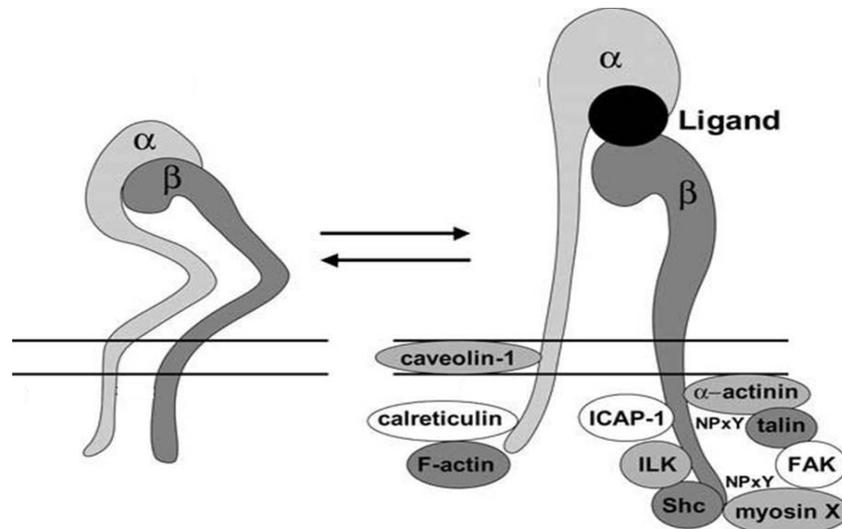
Der Begriff Integrin wurde 1986 von Hynes et al. eingeführt, um eine damals neu entdeckte Familie von transmembranären Proteinen zu beschreiben, die als fundamentale Komponente eines „integral membran complex“ fungieren, welcher das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix (EZM) verbindet [34].

Seither hat sich unser Verständnis dieser Proteinfamilie dramatisch erweitert. Heutzutage wissen wir, dass Integrine transmembranäre Heterodimere sind, die in nahezu jeder Zelle multizellulärer Tiere exprimiert werden und aus nicht kovalent gebundenen  $\alpha$  und  $\beta$  Glykoproteinuntereinheiten bestehen [35]. Insgesamt sind 18  $\alpha$  und 8  $\beta$  Untereinheiten identifiziert worden, welche sich in unterschiedlichen Kombinationen zu 24 verschiedenen Integrinheterodimeren zusammenschließen können [36]. Jedes Heterodimer wird aus einer einzelnen  $\alpha$  und einer einzelnen  $\beta$  Kette gebildet. Beide Untereinheiten sind an der Ligandenerkennung und -bindung beteiligt (**s. Abbildung 1.1**), die notwendig für das sog. „integrin clustering“ sind (**s. Kapitel 1.2.3**). Die Tatsache, dass viele Heterodimere mehr als einen Liganden erkennen und wiederum einige Liganden von mehr als einem Integrin erkannt werden, spricht für eine gewisse Redundanz bei diesen verschiedenen Integrinkombinationen [37].

Die extrazelluläre Domäne jeder Untereinheit besteht aus mehr als 700 Aminosäuren, während die zytoplasmatischen Domänen (mit Ausnahme des  $\alpha_6\beta_4$  Integrins) relativ klein sind und zwischen 13 und 70 Aminosäuren pro Untereinheit enthalten [38]. Die extrazelluläre, Metallion-abhängige ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) Ligandenbindungsstelle befindet sich am distalen Ende. Proximal folgen die sog. „leg regions“, jeweils eine von der  $\alpha$  und eine von der  $\beta$  Untereinheit, die in die Plasmamembran eindringen [35].

$\beta_1$  Integrine sind Rezeptoren für Proteine der EZM wie Kollagen, Fibronectin, Vitronectin und Laminin (z.B.  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$  binden Kollagen, während  $\alpha_5\beta_1$  Fibronectin bindet).  $\beta_2$  Integrine sind in Leukozyten enthalten und beteiligen sich an immunologischen Zell-Zell-Kontakten.  $\beta_3$  Integrine dienen entweder als Fibrinogen-Rezeptoren ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) und spielen daher eine grundlegende Rolle bei der Thrombozyten-vermittelten Blutgerinnung oder als Vitronectin-Rezeptoren ( $\alpha_v\beta_3$ ) [39-45]. Einige Integrine können sogar Viren und Bakterien binden [46]. In einigen Fällen ist die Bindung wesentlich durch die kurze Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) innerhalb einer

schleifenähnlichen Struktur des Liganden bestimmt, so beispielsweise bei  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v$  Integrinen [47;48].



**Abbildung 1.1: Struktur eines Integrinmoleküls**

Schematische Darstellung der  $\alpha$  und  $\beta$  Integrinuntereinheiten, die zusätzlich NPxY-Domänen und integrinbindende Proteine ausweist (aus: Gilcrease MZ. Integrin signaling in epithelial cells. Cancer Lett 2007; 247(1):1-25).

## 1.2.2 Funktion

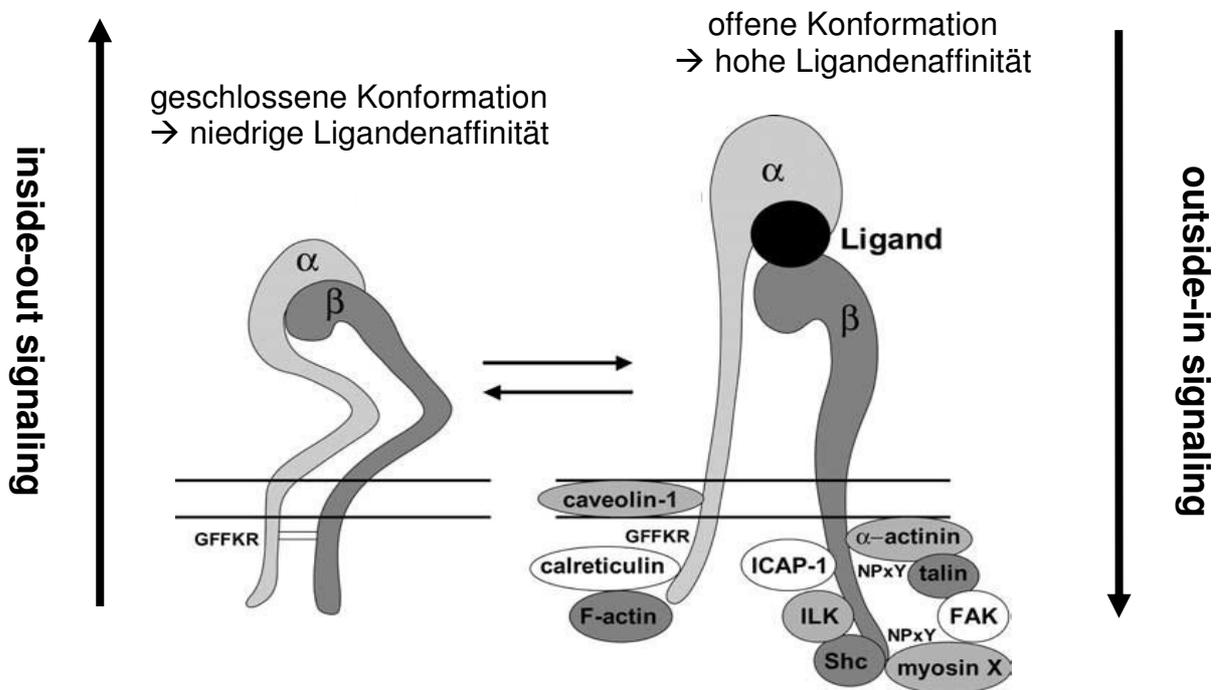
Integrine sind ein zentraler Bestandteil der Kommunikation von Zellen mit dem umgebenden Mikromilieu und übertragen eine Reihe sowohl mechanischer als auch chemischer Signale. Integrine selbst weisen keine katalytische Aktivität auf, sondern kontrollieren die Aktivität intrazellulärer Effektoren durch Assoziation mit intrazellulären Signalmolekülen, deren Aktivität auf diese Weise modifiziert wird [49]. So ergeben sich nach Ligandbindung von Integrinen komplexe Netzwerke aktiver Signaltransduktionketten mit der Folge der Reorganisation des Zytoskeletts und zahlreicher anderer Effektoren [49]. Zu den Proteinen, die unseres Wissens nach direkt an die intrazellulären Domänen von Integrinen binden, gehören: (1) Proteine des Zytoskeletts (z.B. Aktin-bindende Proteine wie Talin,  $\alpha$ -Aktinin, und Filamin), (2) Signalmoleküle wie Focal Adhesion Kinase (FAK) und Integrin Linked Kinase (ILK) und (3) Adaptormoleküle wie Shc und Grb2 [34].

Üblicherweise interagieren die meisten dieser Proteine mit der  $\beta$  Untereinheit der zytoplasmatischen Integrindomäne und zwar im Bereich der sog. NPxY-Sequenz (**s. Abbildung 1.1**). Eine Ausnahme stellt Caveolin-1 dar, welches den transmembranären Teil der  $\alpha$  Untereinheit bindet (**s. Abbildung 1.1**) und sich somit an der Clathrin-unabhängigen Integrininternalisierung beteiligt [50].

### 1.2.3 Regulationsmechanismen der Integrinfunktion

Es gibt zwei Hauptmechanismen der Regulation der Integrinfunktion. Der erste Mechanismus beruht auf einer Konformationsänderung des Heterodimers an der Zelloberfläche. Liganden binden an Erkennungsstellen in beiden Untereinheiten, öffnen dabei eine Tasche und trennen Teile der Integrinketten voneinander, welche sich in der Nähe der Amino-terminalen Enden befinden (**s. Abbildung 1.2**). Diese Veränderung der Konformation wird entlang des Integrins in Richtung Plasmamembran fortgeleitet und bewirkt eine Konformationsänderung der intrazellulären Region („outside-in signaling“). Dabei wird die Ionenbindung zwischen der sog. GFFKR-Sequenz der  $\alpha$  Untereinheit und der korrespondierenden Region der  $\beta$  Untereinheit gelöst (**s. Abbildung 1.2**) [51-53]. Einige regulatorische Proteine (**s. Kapitel 1.2.2**) können ihren Einfluss jedoch in umgekehrter Richtung ausüben, indem sie an die zytoplasmatische Domäne binden. Dadurch wird ein Konformationswandel in Richtung Amino-terminales Ende weitergeleitet und somit die Ligandenerkennung modifiziert („inside-out signaling“) [54].

Der zweite Regulationsmechanismus ist das bereits erwähnte Clustering. Dabei werden Integrine in fokalen Bereichen an der Zelloberfläche durch laterale Migration angesammelt [55]. Eine erhöhte Signalaktivität, die mit einem Rezeptorclustering assoziiert ist, beschränkt sich allerdings nicht auf die Integrine [56;57]. Auf diese Art und Weise kann z.B. auch die Antwort des Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptors gegenüber EGF verstärkt werden [58].



**Abbildung 1.2: Regulation der Integrinfunktion durch inside-out und outside-in signaling**

Schematische Darstellung der offenen sowie der geschlossenen Konformation eines Integrinmoleküls, die zusätzlich NPxY-Domänen und integrinbindende Proteine zeigt.

**Inside-out signaling:** Die Bindung regulatorischer Proteine an die zytosomatische Domäne vermittelt eine konformative Veränderung in Richtung Ligandenbindungsstelle und modifiziert die Ligandenerkennung.

**Outside-in signaling:** Nach der Ligandenbindung an das Integrin öffnet sich eine Tasche und trennt Teile der beiden Untereinheiten voneinander. Diese Konformationsänderung wird in Richtung Membran fortgeleitet mit der Folge einer Konformationsänderung der intrazellulären Region.

Basierend auf: Gilcrease MZ. Integrin signaling in epithelial cells. Cancer Lett 2007; 247(1):1-25

#### **1.2.4 Zelladhäsion, -migration, -invasion und -polarität**

Wie bereits erwähnt, nehmen Integrine an der Organisation und beim „Remodeling“ des Zytoskeletts teil, was ihnen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zellpolarität und bei zellulären Vorgängen wie Adhäsion, Migration und Invasion verleiht [59].

Der erste Schritt der Zelladhäsion ist die Zell-Matrix-Bindung, gefolgt vom sog. „cell spreading“ und der Formation fokaler Adhäsionen und Stressfasern. Zunächst beteiligen sich zweiwertige Kationen wie Kalzium-, Magnesium- und Manganionen an der Zusammensetzung ternärer Komplexe aus Integrin, Ligand und Kation [54]. Beim cell spreading aktivieren Integrine die ILK mit nachfolgender Aktivierung der Mitglieder der Rho-Familie, die aus den Ras-ähnlichen, kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 besteht, welche wichtige Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts in den meisten eukaryotischen Zellen sind. Während des gesamten Vorgangs bleiben Integrine an ihren Liganden gebunden, was zusammen mit dem integrin clustering notwendig ist, um die zur Bildung fokaler Adhäsionskomplexe benötigten Komponenten zu rekrutieren [34]. Die letzten Schritte der Zelladhäsion sind dann durch die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe und Stressfasern charakterisiert. Stressfasern sind dicht organisierte Fasern aus Aktinfilamenten, die sich durch das Zytoplasma ausdehnen und mit der Plasmamembran an fokalen Adhäsionen verbunden sind [60].

Die Rho-GTPasen sowie die Signalmoleküle ILK und FAK spielen auch bei der Migration eine grundlegende Rolle für die Entfaltung der Integrinfunktion [61]. Die Rho-GTPase Rac scheint außerdem von zentraler Bedeutung bei der Vermittlung der Zellpolarität zu sein [62].

Zellinvasion stellt einen weiteren Aspekt der Integrinfunktion dar. Grundsätzlich werden in epithelialen Tumorzellen zwei Formen dieses Vorgangs unterschieden. Bei der amöboiden Invasion adhären die Zellen wenig an die umgebende Matrix und wandern durch das Bindegewebe in einer Leukozyten-ähnlichen Art, die durch einen propulsiven Bewegungstyp sowie eine hohe Verformbarkeit gekennzeichnet ist [60]. Tumorzellen einiger außerordentlich aggressiver Karzinome benutzen hingegen einen an mesenchymale Zellen erinnernden Mechanismus. Solche Zellen zeigen eine gestreckte Morphologie, was ein erhöhtes Maß integrinvermittelter, adhäsiver Interaktionen mit der umgebenden Matrix widerspiegelt. Sie sind somit in der Lage ständig neue Fokaladhäsionen zu formen, Stressfasern zu benutzen und dadurch Zugkraft zu generieren [60]. Dieser Prozess wird bei Karzinomzellen als „Epithelial

Mesenchymal Transition“ (EMT) bezeichnet [63]. Integrine fördern die EMT durch ILK-vermitteltes Signaling [64]. ILK ist darüber hinaus an der Induktion der Expression von Matrix-Metalloproteinase 9 beteiligt, welche die Zellinvasion durch EZM-Degradation begünstigt [65].

### 1.2.5 Zellwachstum

Die Signalmoleküle FAK, ILK und Rho-GTPasen, deren Aktivität und Lokalisation durch integrinvermittelte Zelladhäsion reguliert werden, sind ihrerseits proximale Komponenten von Signaltransduktionskaskaden, die wesentlich an der Kontrolle von zellulärem Überleben und Proliferation beteiligt sind [34].

Integrinvermitteltes Zellüberleben in adhären Epithelzellen wird über die Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K)/ Akt-Kaskade gefördert. Bei der Endstrecke dieser Kaskade kommt es zur Phosphorylierung und Sequestering von BAD, einem proapoptotischen Protein der Bcl-2-Familie [66]. Außerdem wird die subzelluläre Verteilung von Bax, ebenfalls ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, reguliert. Ablösung der Epithelzellen von der EZM leitet eine Bax-Translokation vom Zytoplasma zu den Mitochondrien ein, wo es Apoptose induziert. Integrinvermitteltes Signaling durch die PI3K/ Akt-Kaskade resultiert in eine Bax-Phosphorylierung, die wiederum die Translokation zu den Mitochondrien verhindert [67].

Die Lösung einzelner Zellen aus dem epithelialen Zellverband und von der Basalmembran führt zu einem modifizierten Integrin-Signaling, wobei sowohl protektive Signale entfallen als auch aktiv proapoptotische Signale ausgelöst werden. Im Ergebnis wird in den abgelösten Zellen Apoptose induziert, was in diesem Kontext als „Anoikis“ (griechisch: „heimatlos“) bezeichnet wird [68]. Apoptose kann auch dann induziert werden, wenn die Zellen zwar Kontakt zur Matrix haben, die Zusammensetzung der Matrix aber nicht zum Spektrum der an der Zelloberfläche exprimierten Integrine passt. In diesem Fall können einige ungebundene Integrine (hauptsächlich  $\beta_1$  Integrine) Apoptose induzieren, die hier als „Integrin Mediated Death“ (IMD) bezeichnet wird [69]. Beide Formen integrinvermittelter Apoptose weisen eine Ähnlichkeit mit der Apoptoseinduktion durch die Gruppe der sog. „Todesrezeptoren“ auf, insbesondere hinsichtlich der initialen Rekrutierung und Aktivierung von Kaspase 8 zur Plasmamembran.

Obwohl epitheliale Zellablösung normalerweise entweder zu Anoikis oder IMD führt, besitzen transformierte epitheliale Tumorzellen typischerweise die Eigenschaft, auch unabhängig von Adhäsion überleben zu können, was wichtig bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen sein kann. Das Laminin 5-bindende  $\alpha_6\beta_4$  Integrin fördert beispielsweise adhäsionsunabhängiges Wachstum in malignen Mamma-Epithelzellen, indem es eine Rac-vermittelte Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) stimuliert. NF- $\kappa$ B kann wiederum zur transkriptionellen Aktivierung einer Reihe antiapoptotischer Gene führen [70].

Unter physiologischen Bedingungen ist die integrinvermittelte Adhäsion auch für die Effizienz der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren von zentraler Bedeutung. Diese Regulation bietet einen Mechanismus, der optimale Proliferation an ein bestimmtes Matrixmilieu koppelt. Ein solches kooperatives Signaling zwischen Integrinen und Rezeptoren von Wachstumsfaktoren wurde unter anderem für EGF-Rezeptor, c-erbB-2 und c-MET bewiesen [71;72].

Bei der Regulation der Zellproliferation durch Integrine nehmen die mitogen aktivierten Kinasen (Map-Kinasen) „Extracellular Signal Regulated Kinase 1 und 2“ (Erk1/2) besondere Bedeutung als intrazelluläre Effektoren ein. Integrine können Erk1/2 sowohl FAK-abhängig als auch FAK-unabhängig aktivieren [73;74]. Nach Aktivierung translozieren die Erks in den Nukleus, wo sie eine Erhöhung der Zyklin D1-Transkription bewirken [75]. Zyklin D1 bindet und aktiviert die Cyclin Dependent Kinases CDK4 und CDK6. Gleichzeitig können integrinvermittelte Signale die Degradation der CDK-Inhibitoren p21 und p27 induzieren, wodurch diese dann nicht mehr für die Inhibition von Zyklin E/ CDK2-Komplexen verfügbar sind, und damit eine Aktivierung dieser CDK-Komplexe resultiert. Aktive Zyklin D1/ CDK4/6- und Zyklin E/ CDK2-Komplexe phosphorylieren das Retinoblastoma Protein Rb, wodurch die Repressorwirkung von Rb auf den Transkriptionsfaktor E2F aufgehoben wird [76]. E2F fördert die Zyklin A-Transkription und Zyklin A bildet einen Komplex mit CDK2, der für den Eintritt in die S-Phase erforderlich ist.

Wie oben bereits beschrieben, unterstützt die Aktivierung und nukleäre Translokation von Erk in adhären Epithelzellen die Zellzyklusprogression. Integrine können aber auch Erk-unabhängig eine Zyklin D1-Expression einleiten und somit Zellzyklusprogression bewirken. Das geschieht entweder durch Aktivierung der PI3K/ILK- oder der Rac/ p21 Activated Kinase (PAK)/ Jun Amino Terminal Kinase (JNK)-Kaskade [34]. So kann der von Wachstumsfaktoren induzierte Signalfuss in zahlreichen

Signalkaskaden durch Integrine wesentlich modifiziert werden.

### **1.2.6 Angiogenese**

In den letzten Jahren fand eine weitere Eigenschaft der Integrine, und zwar ihre Beteiligung an der Angiogenese, zunehmendes Interesse. Ab einer Größe von ca. 1-2 mm benötigen Tumoren für kontinuierliches Wachstum eine vaskuläre Verbindung mit dem Wirt. Dieser als „angiogenic switch“ bezeichnete Vorgang beginnt mit dem sog. „angiogenic sprouting“ [77]. Zunächst werden dabei die Wirtsgefäße, die sich am nächsten zum Tumor befinden, durch verschiedene Proteasen destabilisiert und dedifferenziert. Während der anschließenden „invasiven“ Phase migrieren und proliferieren spezifische aktivierte Endothelzellen zu der Tumor-EZM. Bei der letzten „Reifungsphase“ werden die Endothelzellen ruhend und organisieren sich zu funktionellen Gefäßen. Für den „angiogenic switch“ wird neben Hypoxie eine erhöhte Produktion von proangiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen bzw. eine verminderte Bildung antiangiogener Faktoren von den Tumor- oder Stromazellen verantwortlich gemacht [77].

Integrine sind funktionelle Interaktionspartner für beide Gruppen von Faktoren, allerdings ist der genaue Mechanismus, wodurch sie ihre Funktion entfalten, gegenwärtig nicht bekannt [78]. Gesichert ist, dass integrinvermittelte Adhäsion essentiell für das Überleben, die Proliferation und die Motilität von Endothelzellen ist [79]. Weiterhin ist eine Modulation des angiogenen Signalings angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF und Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) beschrieben [80].

## 1.3 $\alpha_5\beta_1$ Integrin

$\alpha_5\beta_1$  Integrin ist ein Mitglied der Integrinfamilie, das als Fibronektin (FN)-Rezeptor fungiert [81]. FN ist ein Heterodimer aus zwei Polypeptidketten, die nahe am C-terminalen Ende durch Disulfidbrücken zusammen gehalten werden. In der Leber wird das für die Wundheilung essentielle lösliche Plasma-FN gebildet, während die Fibroblasten (und Tumorzellen) das unlösliche FN synthetisieren, was in die EZM in Form von Fibrillen eingelagert wird und als Adhäsionsmolekül wirkt [82].

### 1.3.1 Funktion

Sehr gut ist bis heute die Rolle des  $\alpha_5\beta_1$  Integrins bei der Angiogenese untersucht worden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine genetische Ablation der FN/ $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Interaktionen zu schweren vaskulären Missbildungen und embryonaler Letalität führt [83-85]. Auch im adulten Organismus kann durch  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Antagonisten Angiogenese *in vivo* gehemmt werden [86-88]. Diese Befunde belegen die enorme Wichtigkeit dieses Moleküls und seiner Interaktionen mit FN bei der Gefäßbildung hin. Unligiertes  $\alpha_5\beta_1$  Integrin induziert an Endothelzellen Apoptose mittels Rekrutierung von Kaspase 8 mit anschließendem IMD (**s. Kapitel 1.2.5**) und besitzt somit antiangiogene Wirksamkeit.  $\alpha_5\beta_1$  Integrin ist auch für die Lymphangiogenese von Tumoren bedeutsam. Es wurde gezeigt, dass die  $\alpha_5\beta_1$  Integrin/ FN-Interaktion erforderlich für eine optimale Signaltransduktion durch den VEGF-Rezeptors 3 ist [89]. Neben seiner Funktion an Endothelzellen konnte für dieses Integrin auch eine direkte Funktion an Tumorzellen belegt werden. So kann unligiertes  $\alpha_5\beta_1$  Integrin auch in Tumorzellen die Aktivierung der IMD-Signalkaskade induzieren, während das an FN gebundene Molekül zum Tumorzellwachstum beiträgt [88;90].

### 1.3.2 Expression

Im Epithel wird  $\alpha_5\beta_1$  Integrin normalerweise nur schwach exprimiert, allerdings wird seine Expression nach Verletzungen, bei Entzündung und generell während Perioden aktiver Proliferation erhöht [34].  $\alpha_5\beta_1$  wird ferner in verschiedenen Tumoren oder Tumorzelllinien beobachtet, wie z.B. im Kolon-, Harnblasen-, Prostata- und nicht kleinzelligen Lungenkarzinom, sowie im Melanom, Glioblastom und Astrozytom [91-95].

Allerdings wird in Tumorzellen auch eine veränderte Glykosylierung und Funktionalität von  $\alpha_5\beta_1$  beschrieben [96].

Interessanterweise kommt es in Tumorgefäßen zu einer hochsignifikant vermehrten Expression. Immunhistochemische Untersuchungen detektierten  $\alpha_5\beta_1$  in vielen kleineren und einigen größeren Gefäßen bei Plattenepithel-, Kolon-, Ovarial-, nicht kleinzelligen Lungen-, Harnblasen- und Mammakarzinomen sowie bei Glioblastomen und Melanomen, während vergleichsweise wenig  $\alpha_5\beta_1$  in den Gefäßen normalen Gewebes vorhanden war [91]. Diese Beobachtung in Kombination mit der bereits oben erwähnten Rolle bei der Angiogenese ist ein sehr starkes Indiz für eine grundlegende Funktion von  $\alpha_5\beta_1$  auch im Rahmen der Tumorneoangiogenese.

### 1.3.3 $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Antagonisten

Das Profil seiner biologischen Funktion macht  $\alpha_5\beta_1$  Integrin zu einem attraktiven therapeutischen Target und gab den Anstoß zur präklinischen Entwicklung verschiedener  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Antagonisten.

Eine Gruppe von Antagonisten nutzt die physiologische Interaktion von  $\alpha_5\beta_1$  mit Metargidin, einem Mitglied der Adamalysinfamilie von Metalloproteinasen. Metargidin verfügt über eine sog. Disintegrindomäne, die das RGD-Motiv erhält, welches wiederum die Interaktion mit Integrinen erlaubt (**s. Kapitel 1.2.1**) [97]. Da Metargidin in sehr hohen Mengen in aktivierten Endothelzellen exprimiert wird, wurde eine Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen mit einer wichtigen Rolle bei der Angiogenese vermutet. Eine rekombinante Disintegrindomäne (RDD), welche diese Wechselwirkung behindern kann, konnte in der Tat erfolgreich die Angiogenese *in vitro* hemmen. Der Erfolg beruhte auf einer Kombination von Effekten auf die Endothelzellen-Migration, -Proliferation und -Apoptose [98]. Mittlerweile sind auch weitere RGD-Peptide aus Disintegrinen entwickelt worden, die selektiv  $\alpha_5\beta_1$  Integrin inhibieren können [99;100].

Eine Behinderung der FN/  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Interaktionen ist ferner die Erklärung für die antiangiogenen Wirkungen von Mature Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (mEMAP II). mEMAP II ist ein Peptid, das in einer RGD-unabhängigen Art direkt an  $\alpha_5\beta_1$  Integrin bindet. Seine Applikation führte in mehreren präklinischen Versuchen zu einer Hemmung des Tumorwachstums durch Apoptoseinduktion an Endothelzellen [101;102]. Der Small Molecule Inhibitor JSM6427 bewirkte eine Regression der choroidalen Neovaskularisation im Mausmodell. Die choroidale Neovaskularisation findet z.B.

während der altersbedingten Makuladegeneration statt, welche die häufigste Ursache für schwere Verluste des Sehvermögens bei Menschen über 60 Jahren in den entwickelten Ländern darstellt [103]. Dieselbe Substanz induzierte Apoptose von Endothelzellen in vitro. Die Hemmung der Erk-Phosphorylierung könnte den proapoptotischen Effekt in diesem Modell erklären [103].

Der peptidische  $\alpha_5\beta_1$  Integrininhibitor ATN-161 wurde als Kombination mit Chemotherapie (kontinuierliche 5-Fluoruracil-Infusion) gegen Lebermetastasen von kolorektalem Karzinom in einem Mausmodell verwendet [80]. Das Rational war die gleichzeitige Bekämpfung zweier Tumorkomponenten, nämlich der Gefäße (durch die antiangiogenen Effekte von ATN-161) und der Tumorzellen selbst (durch das Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil). Die Studie zeigte eine Verminderung der Entstehung von Lebermetastasen und eine Verbesserung des Überlebens [80]. Die Wirkung von ATN-161 wurde ebenfalls RGD-unabhängig vermittelt.

Schließlich inhibierte der SMI SJ749 die Zelladhäsion sowie die Klonogenität in Astrozytoma-Zelllinien, was zeigte, dass  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Antagonisten imstande sind auch direkte Effekte an Zellen hervorzurufen [95].

#### **1.3.4 Fragestellung: Therapeutische Wirksamkeit einer funktionellen Inhibition des FN-Rezeptors $\alpha_5\beta_1$ Integrin in NETs**

Der FN-Rezeptor stellt wegen seiner proangiogenen Eigenschaften ein vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt in der Tumorthherapie dar. Die Beobachtung, dass neben Tumorgefäßen auch Tumoren und Tumorzelllinien  $\alpha_5\beta_1$  Integrin exprimieren [91;92;94], wirft die Frage auf, ob die  $\alpha_5\beta_1$  Expression der Tumorzellen einen zweiten Angriffsort darstellt, sodass  $\alpha_5\beta_1$  Inhibition einen dualen Wirkmechanismus an Tumor- und Stromazellen bieten könnte. NETs bieten wegen ihrer guten Vaskularisierung ein solides Rational für antiangiogene Therapieansätze. Ein zusätzlicher Nachweis direkter Effekte einer Inhibition von  $\alpha_5\beta_1$  an NET Tumorzellen würde für diese Tumorentität einen dualen Wirkmechanismus unterstützen.

Vor diesem Hintergrund charakterisiert die vorgelegte Arbeit die biologischen Effekte des kleinmolekularen  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitors **JSM8757** in NET Zellen. Frühere Experimente belegten bereits die Expression von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin in den humanen NET Zelllinien BON und QGP-1. Diese Zelllinien konnten daher hier als repräsentative Modelle eingesetzt werden, um die Effekte von JSM8757 auf verschiedene Aspekte

des zellulären Wachstums zu ermitteln und die beteiligten molekularen Wirkmechanismen zu charakterisieren.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

DMEM	Invitrogen Corporation
RPMI	Invitrogen Corporation
McCoy's 5a medium	PromoCell
FCS	Biochrom AG
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG
L-Glutamin	Biochrom AG
PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom AG
Trypsin/ EDTA-Lösung (in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom AG
MTT	Sigma
JC-1 Lösung	Molecular probes
PJ Stammlösung	Sigma
5xMBL Puffer	Merck
NaF	Sigma
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
Aproteinin	Sigma
Leupeptin	Sigma
NaVO <sub>3</sub>	Sigma
SDS	Sigma
Tris-Base	Merck
Bromphenolblau	Schmidt GmbH
Glycerol	Merck
Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth
APS	Merck
TEMED	Roth

Butanol  
Glycin  
Magermilchpulver  
TWEEN  
BSA  
ECL  
2-Mercaptoethanol

Merck  
Serva  
Bio-Rad  
Serva  
Serva  
PerkinElmer  
Sigma

### **2.1.2 Antikörper**

Zyklin D  
Zyklin E  
Zyklin A  
pCDK2  
CDK2  
Zyklin B  
CDC2  
p21  
p27  
Rb  
pErk1/2  
Erk1/2  
β-Aktin  
GAM-POD  
GAR-POD

Becton Dickinson  
Becton Dickinson  
Upstate Biotechnology Inc  
Cell Signaling Technology  
Santa Cruz Biotechnology  
Santa Cruz Biotechnology  
Santa Cruz Biotechnology  
Oncogen Science  
Trans Lab  
Becton Dickinson  
Cell Signaling Technology  
Cell Signaling Technology  
Sigma  
Dianova  
Dianova

### **2.1.3 Testsubstanzen**

JSM8757  
ZK304709

Jerini AG  
Bayer Schering Pharma AG

### 2.1.4 Zellen

Die aus einem neuroendokrinen Karzinom des Pankreas etablierte permanente Zelllinie BON [104;105] wurde dem Labor liebenswürdigerweise von Professor JC Thompson (University of Texas School of Medicine) überlassen. Die neuroendokrine Karzinomzelllinie QGP-1 entstammt ebenfalls dem Pankreas [106] und wurde von der Japan Health Sciences Foundation Health Science Research Resources Bank erworben. Die humane Kolon-Adenokarzinomzelllinie HT29 [107], die  $\alpha_5\beta_1$  Integrindefizient ist und daher als negative Kontrolle bei einigen Experimenten angewendet wurde (**s. Kapitel 2.6.2, Kapitel 2.7.2**), wurde von der American Type Culture Collection bezogen.

## 2.2 Zellpflege, -passage und -synchronisation

Im Rahmen der Experimente wurden adhärente, subkonfluente Kulturen verwendet. Eine 1:5 Passage fand alle drei Tage statt, wobei die dazu benötigte Lösung der Zellen aus dem Boden der Kulturflaschen durch Trypsinbehandlung erfolgte. Als high-glucose Nährmedien wurden für BON Zellen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), für QGP-1 Zellen Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) und für HT29 McCoy's 5a medium benutzt. Ihr FCS-Anteil lag bei 10 %, außerdem waren 1% Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin als Zusätze enthalten.

Die für die Zeitverlaufsanalysen erforderliche Synchronisation der Kulturen in der G1-Phase des Zellzyklus (**s. Kapitel 2.7.2**) wurde durch Austausch des jeweiligen Nährmediums gegen FCS-freies Medium erreicht. Die Dauer des FCS-Entzugs betrug bei BON Zellen 48 Stunden und bei QGP-1 Zellen 36 Stunden. Durch diese Vorgehensweise wurde eine hinreichende Synchronisation erzielt, bessere Ergebnisse wurden auch mit kürzeren bzw. längeren Phasen eines Serumentzugs nicht erreicht. Das Ergebnis der Synchronisation ist in der **Abbildung 2.1** dargestellt.

NET Zelllinie	Mittelwert (in %)	SEM (in %)
BON (N=6)	74,67	± 5,44
QGP-1 (N=2)	77,5	± 0,5

**Abbildung 2.1: Erfolgreiche G1-Synchronisation beider NET Zelllinien**

*Dargestellt sind die Mittelwerte der sich jeweils in der G1-Phase befindenden Zellen (als Prozentzahl der Gesamtzellen) sowie die SEM Werte.*

## 2.3 Quantitative Bestimmung der Integrinexpression mittels Durchflusszytometrie

Die in Vorarbeiten bereits beschriebene Expression des Fibronectinrezeptors in BON und QGP-1 Zellen wurde zunächst an den aktuellen Zellkulturen bestätigt. Dies erfolgte mittels Durchflusszytometrie an nativen nicht fixierten Zellen, die mit direkt konjugierten Antikörpern gegen die beiden Fibronectinrezeptor-Untereinheiten gefärbt wurden. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS mit den Antikörpern gegen  $\alpha_5$  (Verdünnung 1:50) oder gegen  $\beta_1$  (Verdünnung 1:50) resuspendiert und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Abwaschen der nicht gebundenen Antikörper wurden die Zellen dann an einem FACSCalibur™ vermessen und mit Hilfe der CellQuest Software™ die Fluoreszenzen ausgewertet.

## 2.4 Adhäsionsassay

Der Adhäsionsassay prüft, welcher Teil einer Zellsuspension innerhalb eines Zeitraums von 1 bzw. mehreren Stunden an das angebotene Substrat adhärert. Zur einfachen Auswertung wurden die Zellen mit MTT [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl Tetrazolium Bromid] markiert, sodass die Zellmenge durch eine colorimetrische Messung quantifiziert werden konnte. Geprüft wurde, ob durch die Gabe von JSM8757 die Adhäsion von BON und QGP-1 Zellen verändert wurde.

### **2.4.1 Prinzip**

Der MTT Assay, eine seit ca. 25 Jahren etablierte Untersuchung [108], ist eine quantitative, kolorimetrische Messung der Stoffwechselaktivität lebender Zellen. In vitalen, stoffwechselaktiven Zellen reduziert das mitochondriale Enzym Succinatdehydrogenase das gelbe Tetrazoliumsalz MTT zu einem blauvioletten Formazanprodukt. Die Menge an gebildetem Formazan korreliert direkt mit der Anzahl lebender Zellen. Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurden die in den Adhäsionsassays verwendeten Zellen mit MTT markiert, um eine einfache Quantifizierung der adhären Zellen zu ermöglichen. Durch Zugabe einer HCl/ Isopropanol-Lösung kam es zu einer Zellyse. Formazan wurde dabei gelöst und konnte anschließend spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Nicht adhären Zellen wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt, sodass die Messwerte die Anzahl der adhären Zellen wiedergaben.

### **2.4.2 Durchführung mit BON Zellen**

Die Zellen wurden durch milde Trypsinisierung aus den Kulturflaschen gelöst, die Zellzahl bestimmt und auf  $3 \times 10^5$  Zellen/ ml eingestellt. Pro Kondition wurden drei Wells einer 24-Well-Mikrotiterplatte mit je 1 ml Zellsuspension befüllt und anschließend die entsprechende Menge an JSM8757 bzw. Dimethylsulfoxid (DMSO: JSM8757-Lösungsmittel) addiert. Um das Absinken der Zellen zu beschleunigen, wurde die Mikrotiterplatte vor der vierstündigen Inkubation im Brutschrank kurz zentrifugiert (1000 rpm/ 2 min). Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass unter diesen Bedingungen zwischen 2 % und 5 % der ausgesäten Zellen anhaften. Während der letzten Stunde der Inkubation erfolgte die Markierung der Zellen durch Zugabe von 100  $\mu$ l MTT ( $C_{\text{MTT}}=2$  mg/ ml). Anschließend wurden sie dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen, um alle nicht adhären Zellen abzuspülen. Eventuell verbliebene PBS-Reste wurden vollständig abgesaugt und 200  $\mu$ l einer HCl/ Isopropanol-Lösung ( $C_{\text{HCl}}=0,1$  mol/ l) zugegeben. Aus jedem Well der 24-Well-Mikrotiterplatte wurden doppelte Messungen angefertigt, indem zweimal jeweils 80  $\mu$ l in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte überführt wurden. Direkt danach erfolgte die Messung am Plattenphotometer bei 595 nm. Die statistische Analyse wurde mit dem GraphPad Prism 4 <sup>TM</sup> Software durchgeführt.

### **2.4.3 Durchführung mit QGP-1 Zellen**

Die Durchführung des Assays mit QGP-1 Zellen erfolgte grundsätzlich wie oben für BON Zellen beschrieben. Im Unterschied zu BON Zellen adhäreren QGP-1 Zellen allerdings sehr viel rascher, sodass bei QGP-1 Zellen eine Inkubationsdauer von einer Stunde hinreichend war. Entsprechend erfolgte die MTT-Gabe bereits zu Beginn der Inkubationszeit und zwar direkt nach dem JSM8757- bzw. DMSO-Zusatz.

## **2.5 Proliferationsassay**

Die integrinvermittelte Zelladhäsion ist von großer Bedeutung für die Proliferation epithelialer Zellen (**s. Kapitel 1.2.5**). Daher sollten hier die Effekte des  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitors JSM8757 auf die Proliferation von BON und QGP-1 Zellen untersucht werden. Diese Effekte wurden jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden mit einer Inhibitorkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  beurteilt.

### **2.5.1 Durchführung mit BON Zellen**

Zunächst wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet und danach in einer Konzentration von  $5 \times 10^3$  Zellen/ Well in Triplikaten in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Stunden kultiviert, anschließend erfolgten das Mediumwechsel und die Behandlung der Zellen jeweils mit der entsprechenden Konzentration an JSM8757 bzw. DMSO (oder ohne jeglichen Zusatz im Fall der Kontrollwerte). Für die drei unterschiedlichen Zeitpunkte (24, 48, 72 Stunden) wurden jeweils unterschiedliche Platten verwendet. Zum gewünschten Zeitpunkt wurde das Medium von den entsprechenden Wells vorsichtig abgesaugt, die Wells wurden mit PBS gewaschen und die Zellen trypsinisiert und gezählt. Dank der kurzen Zentrifugation (1000 rpm/ 1 min) der JSM8757-enthaltenden Wells während des Waschvorgangs gingen bei den Waschschrritten keine Zellen verloren. Die statistische Analyse wurde mit dem GraphPad Prism 4<sup>TM</sup> Software durchgeführt.

## 2.5.2 Durchführung mit QGP-1 Zellen

Bei dieser Zelllinie wurde das Assayprotokoll leicht verändert: Anheftung und das Ausspreiten der QGP-1 Zellen erfolgten bereits innerhalb der ersten 4 Stunden. Angesichts der kürzeren Verdopplungszeiten und der damit verbundenen Gefahr beginnender Konfluenz während des Beobachtungszeitraumes wurde die Inkubation mit Wirkstoff bzw. Vehikel bereits nach 4 Stunden begonnen. Zusätzlich wurden wegen der höheren Proliferationsrate der Zelllinie  $5 \times 10^2$  Zellen/ Well ausgesät.

## 2.6 JC-1 Assay

Der JC-1 Assay wurde eingesetzt, um das Vorliegen von Apoptose zu ermitteln. Er wurde hier verwendet um zu testen, ob der Verlust der  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-vermittelten Zelladhäsion und die anschließende Modifizierung der integrinvermittelten Signaltransduktion (outside-in signaling) zu Apoptose führen können (**s. Kapitel 1.2.5**).

### 2.6.1 Prinzip

Die mit dem Apoptoseprogramm verbundene Veränderung der mitochondrialen Permeabilität bietet einen frühen Apoptoseindikator. Dieser Prozess wird typischerweise definiert als ein Kollaps des elektrochemischen Gradienten entlang der mitochondrialen Membran, der sich in der Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials abbildet. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ist somit ein Indikator für Apoptose und kann durch eine kationische Fluoreszenzfärbung mit dem dichromen Farbstoff [5, 5', 6, 6'-Tetrachloro-1, 1', 3, 3'-Tetraethyl-Benzamidazolocarboxyanin Jodid] (JC-1) detektiert werden [109].

### 2.6.2 Durchführung

Die Zellen wurden aus den Kulturflaschen gewonnen und  $5 \times 10^5$  Zellen/ Well in eine 6-Well-Mikrotiterplatte überführt. Anschließend erfolgte die 24-stündige Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  JSM8757. BON und QGP-1 Zellen wurden zusätzlich mit dem CDK-Inhibitor ZK304709 inkubiert, der hier als positive Kontrolle für die Apoptoseinduktion in beiden Zelllinien diente [110]. Als negative Kontrolle wurde die  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-defiziente HT29

Zelllinie verwendet. Zur Vorbereitung des Assays wurde die JC-1 Stammlösung in warmem Medium verdünnt (1 ml pro Probe), sodass die Endkonzentration 5 µg/ ml betrug. Die Zellen wurden geerntet und dann jeweils 1 ml JC-1 Lösung zu jeder Probe gegeben. Die Proben wurden gut gemischt und 15 Minuten im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Messung am FACScalibur™.

## **2.7 Zellzyklusanalyse**

Mit Hilfe der Zellzyklusanalysen sollten die antiproliferativen Wirkmechanismen von JSM8757 definierten Zellzyklusabschnitten zugeordnet werden. Gleichzeitig liefert die prä-G1 Fraktion der Zellzyklusanalysen einen quantitativen Nachweis apoptotischer Zellen.

### **2.7.1 Prinzip**

Der rote Farbstoff Propidiumjodid (PJ) bindet die DNA und färbt somit die Zellkerne, indem er zwischen den Nukleinbasen interkaliert. PJ kann auch an die RNA binden, was die Verwendung von RNase erforderlich macht, um zwischen DNA- und RNA-Färbung differenzieren zu können [111]. Der lineare Zusammenhang zwischen dem zellulären DNA-Gehalt und der Fluoreszenzintensität ermöglicht die Zuordnung der einzelnen Zellen zu den Zellzyklusphasen sowie eine Identifizierung apoptotischer Zellen als hypodiploide Fraktion bei der FACS-Analyse [112].

### **2.7.2 Durchführung unter adhärenenten Kulturbedingungen**

Unsynchronisierte und synchronisierte BON und QGP-1 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 100 µM JSM8757 in 6-Well-Mikrotiterplatten (5x10<sup>5</sup> Zellen/Well) im Brutschrank inkubiert. Die α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> Integrin-defiziente HT29 Zelllinie diene als die negative Kontrolle, während der CDK-Inhibitor ZK304709 wegen der Induktion von Zellzyklusumverteilungen in beiden NET Zelllinien als positive Kontrolle eingesetzt wurde [110]. Die Zellen wurden geerntet und bei -20 °C in 70 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen, in 300 µl PJ Lösung (C<sub>PJ</sub>=0,02 mg/ ml, C<sub>RNase</sub>=0,01 mg/ ml) resuspendiert und für 20 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Schließlich erfolgte die Messung von jeweils 10.000 Zellen/ Probe am FACS-

Gerät (Fluoreszenzkanal 2). Anhand der zellulären DNA Menge wurden die Zellen den unterschiedlichen Zellzyklusphasen zugeordnet und die Fraktion der Gesamtpopulation in den verschiedenen Phasen quantifiziert.

### **2.7.3 Durchführung unter Anoikisbedingungen**

Der Anoikisassay prüft das Überleben der NET Zellen in Suspensionskultur. Um ein Adhären der Zellen in den Kulturschalen zu verhindern, werden diese mit PolyHEMA [Poly (2-Hydroxyethyl Methacrylat)] beschichtet. NET Zellen wurden auf PolyHEMA-beschichteten 6-Well Platten ausgesäht und für 20 Stunden mit JSM8757 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und bei -20 °C in 70 % Ethanol für 30 Minuten fixiert. Anschließend erfolgten das Waschen der Proben mit PBS sowie ihre Resuspension in 400 µl PJ Lösung ( $C_{PJ}=0,02$  mg/ ml,  $C_{RNAse}=0,01$  mg/ ml). Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden jeweils 10.000 Zellen/ Probe am FACS-Gerät (Fluoreszenzkanal 2) gemessen. Die statistische Analyse wurde mit dem GraphPad Prism 4 <sup>TM</sup> Software durchgeführt.

## **2.8 Western-Blot**

Die Western-Blot-Analyse sollte der (semi)quantitativen Analyse von Proteinen dienen, die Zellzyklusprogression bzw. mitogene Signaltransduktion von NET Zellen regulieren.

### **2.8.1 Präparation von Proteinlysaten**

Synchronisierte NET Zellen wurden durch Zugabe von FCS-haltigem Vollmedium zum Wiedereintritt in den Zellzyklus stimuliert. Mit Beginn der Serumstimulation erfolgte ebenfalls die Gabe von JSM8757 bzw. Vehikel, anschließend wurden die Zellen zu den gewünschten Zeiten geerntet. Hierzu wurden die Kulturen zunächst mit PBS gewaschen, dann die Zellen bei 4 °C in 100 µl Lysepuffer (siehe unten)/ Schale (10 cm) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Der nächste Schritt bestand in der Sonifizierung der Zelllysate (10x1 s Puls; 100 W) und ihrer 15-minütigen Inkubation auf Eis, bevor der Zelldebris durch Zentrifugation (15.300 rpm/ 5 min/ 4 °C) abgetrennt wurde. Aus dem Überstand (Proteinlysat) wurde

anschließend die Proteinkonzentration mit Hilfe des Biorad Proteinassays bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt. In diesem Assay erfolgen Farbstoffveränderungen als Reaktion auf verschiedene Proteinkonzentrationen [113]. Danach wurden alle Proben auf 1µg/ µl bzw. die Konzentration der am niedrigsten konzentrierten Probe durch Zusatz von Lysepuffer eingestellt. Ladepuffer, dessen Menge ca. 20 % des Gesamtvolumens entsprach, wurde hinzugegeben. Die Proteinextrakte wurden dann bei 95 °C fünf Minuten lang aufgekocht und schließlich bei -20 °C gelagert.

### **2.8.2 Proteinauftrennung**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe von SDS PAGE [114]. Hierbei wird durch Radikalketten-Polymerisierung von Acrylamid und dem vernetzenden Bisacrylamid eine poröse Gelmatrix erzeugt. Die Porengröße kann durch Veränderung der Konzentrationen beider Monomere variieren. Der Polymerisierungsstart erfolgt durch die Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylen-Diamin), welches die gebildeten Radikale stabilisiert und somit eine gleichmäßige Polymerisierung bewirkt. Die denaturierten Proben werden auf das Gel geladen, das in geeigneten Elektrolyten eingelegt ist. Anschließend wird eine elektrische Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel hervorruft. Das Gel übernimmt dabei die Funktion eines Siebs. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch seine Poren, während die Wanderung von großen Proteinen langsamer erfolgt. Am Ende des Vorgangs sind alle Proteine nach Größe sortiert. In den hier aufgeführten Experimenten wurde als Elektrolyt der SDS-Laufpuffer verwendet. Die elektrische Spannung betrug 100 V.

### **2.8.3 Western-Blot**

Nachfolgend wurden die Proteine im „Nasstransfer“-Verfahren auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran geblottet. Um unspezifische Bindung der Antikörper an die Membranen zu vermeiden, erfolgte ihre einstündige Behandlung mit Blockierungspuffer (s. unten). Anschließend wurden sie mit dem Primär-Antikörper inkubiert, der 1:1000 mit Blockierungspuffer verdünnt war (10 µl Antikörper in 10 ml Puffer). Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Taumler bewegt, um

eine effektive Antikörperbindung zu gewährleisten. Am Folgetag wurden sie dreimal für jeweils zehn Minuten mit Waschpuffer gewaschen und dann für eine Stunde mit dem an Peroxidase gekoppelten geeigneten Sekundärantikörper inkubiert, der 1:20.000 mit Blockierungspuffer verdünnt war (1 µl Antikörper in 20 ml Puffer). Nach drei weiteren Waschschritten wurden sie für eine Minute mit dem ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Substrat des Western Lightning™-Kits benetzt, anschließend erfolgte die Detektion der Lumineszenzsignale mit Hilfe von Röntgenfilmen.

#### **2.8.4 Western-Blot mit Phospho-Antikörpern**

Bei Western-Blots mit Phospho-Antikörpern wurde das Protokoll leicht verändert. So wurden entsprechend der Empfehlung des Herstellers Nitrozellulose- statt PVDF-Membranen benutzt. Außerdem enthielten der Blockierungs- und der Waschpuffer TBS (Tris Buffered Saline)-TWEEN statt PBS-TWEEN, da die Antikörper gegen Phosphoepitope gerichtet sind und daher phosphatfreie Pufferlösungen zur Anwendung kommen. Ferner erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in einer BSA-Lösung (5 % BSA in TBS/ 0,5 % TWEEN).

#### **2.8.5 Strippen**

Das Strippen, d.h. das Lösen der Antikörperbindungen, erlaubt die weitere Verwendung desselben Blots. Das ist z.B. bei der Untersuchung der Erk-Aktivität vorteilhaft, da hier Erk-Phosphorylierung und Expression am selben Blot überprüft werden können. Beim Strippen wurden die Blots kurz in Ethanol eingelegt (Ausnahme: Nitrozellulosemembranen in H<sub>2</sub>O), anschließend in Stripppuffer (s. unten) für 20 Minuten bei 57 °C inkubiert und schließlich zweimal für jeweils fünf Minuten gewaschen. Am Ende dieses Vorgangs standen die Blots für eine weitere Verwendung zur Verfügung.

## 2.8.6 Puffer und Gele

### Lysepuffer: 1xMBL-Puffer (50 ml)

1. 10 ml 5xMBL-Puffer (125 mM HEPES/ 750 mM NaCl/ 50 mM MgCl<sub>2</sub>/ 5 mM EDTA/ 10% Glycerol/ pH 7,5/ 5 % NP40)
2. 500 µl NaF 0,5 M
3. 250 µl PMSF 0,2 M
4. 50 µl DTT 1 M
5. 100 µl Aprotinin 1 M
6. 50 µl Leupeptin 2 M
7. 10 µl NaVO<sub>3</sub> 1 M (Rest mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen)

### Ladepuffer: 5xLämmli-puffer (20 ml)

1. 10 % SDS
2. 500 mM DTT
3. 300 mM Tris-HCl pH 6,8
4. 0,001 % Bromphenolblau
5. 50 % Glycerol (Rest mit H<sub>2</sub>O auf 20 ml auffüllen)

### Trenngel (10 ml)

1. x ml 30 % Acrylamid/ Bisacrylamid
2. 1,875 ml Tris-HCl pH 8,8 2 M
3. 100 µl 10% SDS
4. y ml H<sub>2</sub>O
5. 100 µl 10 % APS
6. 5 µl TEMED

### Sammelgel-Stammlösung 5,6% (200 ml)

1. 37,3 ml 30 % Acrylamid/ Bisacrylamid
2. 12,6 ml Tris-HCl pH 6,8 2 M (Rest mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml auffüllen)

### Sammelgel

1. 5 ml Sammelgel-Stammlösung
2. 50 µl 10 % SDS
3. 50 µl 10 % APS
4. 5 µl TEMED

**SDS-Laufpuffer-Stammlösung:** 5xSDS-Laufpuffer (2 l)

1. 188 g Glycin
2. 30,2 g Tris-Base
3. 100 ml 10 % SDS (Rest mit H<sub>2</sub>O auf 2 l auffüllen)

Anwendung: 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnen

**Blotpuffer-Stammlösung:** 10xBlotpuffer (2 l)

1. 288 g Glycin
2. 60,8 g Tris-Base (Rest mit H<sub>2</sub>O auf 2 l auffüllen)

Anwendung: 1:10 verdünnen (für 1 l: 100 ml Puffer + 100 ml 100 % Ethanol + 800 ml H<sub>2</sub>O)

**Blockierungspuffer:** 5 % Magermilch in PBS/ 0,1 % TWEEN

**Blockierungspuffer (Phospho-AK):** 5 % Magermilch in TBS/ 0,5 % TWEEN

**Waschpuffer:** PBS/ 0,1 % TWEEN

**Waschpuffer (Phospho-AK):** TBS/ 0,5 % TWEEN

**TBS-TWEEN-Stammlösung:** 10xTBS (1 l)

1. 24,2 g Tris-Base
2. 80 g NaCl

Anwendung: auf pH 7,6 mit HCl einstellen, 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnen, 0,5 % TWEEN addieren

**Strippuffer-Stammlösung** (500 ml)

1. 100 ml 10 % SDS
2. 15,5 ml Tris-HCl pH 6,8 2 M (Rest mit H<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen)

Anwendung: 20 ml Strippuffer + 174,5 µl 2-Mercaptoethanol 14,3 M

## 2.9 Literaturrecherche

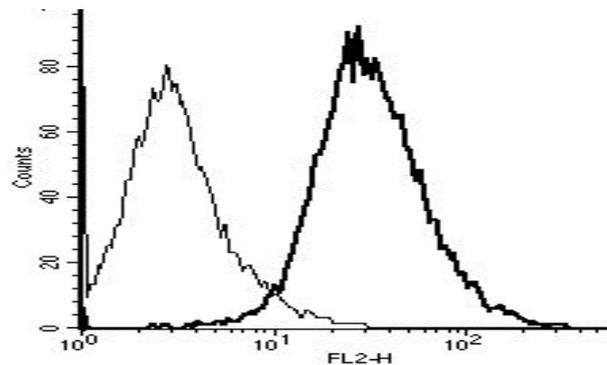
Eine initiale Recherche bei PubMed erfolgte im Oktober 2006 mit Suchbegriffen wie „neuroendocrine tumors“, „gastroenteropancreatic tumors“, „carcinoid tumors“, „integrin signaling“, „integrin signaling AND tumor therapy“, „integrin signaling AND angiogenesis“, „α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> integrin AND angiogenesis“, „fibronectin receptor AND angiogenesis“. Das Literaturverzeichnis wurde alle vier Monate aktualisiert. Zusätzlich kamen Kapitel von Lehrbüchern zur Anwendung.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 BON und QGP-1 Zellen exprimieren $\alpha_5\beta_1$ Integrin an ihrer Oberfläche

Die Untersuchung der biologischen Effekte des  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Antagonisten in den NET Zellen setzt voraus, dass NET Zelllinien dieses Target auch exprimieren. In Vorarbeiten war eine Expression des Fibronectinrezeptors an NET Zellen beobachtet worden. Diese Daten sollten zu Beginn der Arbeit an den aktuellen Zellkulturen nochmals bestätigt werden. Das erfolgte mittels Flow-Zytometrie an nativen nicht fixierten Zellen, die mit direkt konjugierten Antikörpern gegen die beiden Fibronectinrezeptor-Untereinheiten  $\alpha_5$  und  $\beta_1$  gefärbt wurden.

**Abbildung 3.1** illustriert die Expression der Untereinheit  $\alpha_5$  an der Oberfläche von BON Zellen. Die quantitative Auswertung eines repräsentativen Experiments wird in der **Abbildung 3.2** gezeigt. Da unterschiedliche Antikörper verwendet wurden, ist ein Vergleich der Reaktivität von  $\alpha$  und  $\beta$  Integrinuntereinheiten nicht möglich. Allerdings ist eine deutlich stärkere Reaktivität für die  $\beta$  Untereinheit durchaus plausibel, da diese in Kombination mit mehreren  $\alpha$  Untereinheiten Verwendung findet. Insgesamt bestätigen die Daten die Expression von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin an der Oberfläche beider NET Zelllinien.



**Abbildung 3.1: Expression der  $\alpha_5$ -Untereinheit des Integrinmoleküls an der Oberfläche von BON Zellen**

Das Diagramm illustriert am Beispiel der  $\alpha_5$ -Integrin-Färbung den Integrinnachweis in der Durchflusszytometrie an nativen Zellen. Die linke Kurve entspricht der sog. Autofluoreszenz, die auf  $\alpha_5$ -Immunreaktivität beruhende Fluoreszenz wird in der rechten, fett gezeichneten Kurve dargestellt.

NET Zelllinie	$\alpha_5$ -Untereinheit	$\beta_1$ -Untereinheit
BON	90	1423
QGP-1	112	1444

**Abbildung 3.2: NET Zelllinien exprimieren  $\alpha_5\beta_1$  Integrin an ihrer Oberfläche**

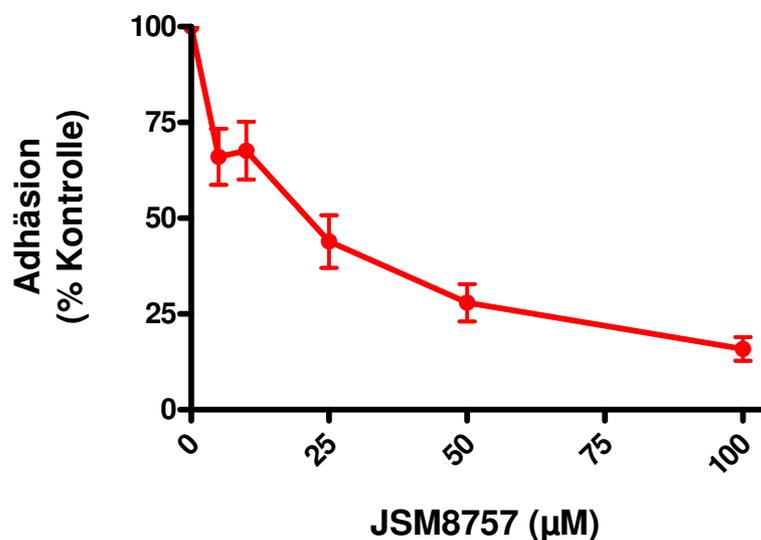
Quantitative Auswertung der  $\alpha_5$ - und  $\beta_1$ -Integrin-Expression zum Vergleich von BON und QGP-1 Zellen. Dargestellt sind die Peak-Werte der jeweiligen Fluoreszenzkurven (es handelt sich um arbiträre Einheiten).

## 3.2 JSM8757 hemmt die Adhäsion und Proliferation von NET Zellen

### 3.2.1 JSM8757 hemmt dosisabhängig die Adhäsion in BON Zellen

Nachdem die Expression des Fibronektinrezeptors  $\alpha_5\beta_1$  Integrin an der Oberfläche beider Zelllinien gesichert war, untersuchten wir die Effekte des  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitors JSM8757 auf zwei grundlegende zelluläre Funktionen von NET Zellen, Adhäsion und Proliferation.

Als Erstes wurde Adhäsion mittels MTT Assays evaluiert (**s. Kapitel 2.4.1**). Unsere Ergebnisse zeigten eine deutliche, dosisabhängige Hemmung der Zelladhäsion in BON Zellen durch JSM8757 (**s. Abbildung 3.3**). Bereits bei der geringsten angewendeten Inhibitorkonzentration (5  $\mu\text{M}$ ) waren im Vergleich zu Vehikelkontrollen weniger als 70 % der Zellen adhären. Bei höheren Konzentrationen (25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) nahm die Anzahl der adhären Zellen weiter ab, wobei eine maximale Inhibition auf  $15,9 \pm 3,1$  % der Kontrolle erzielt wurde.

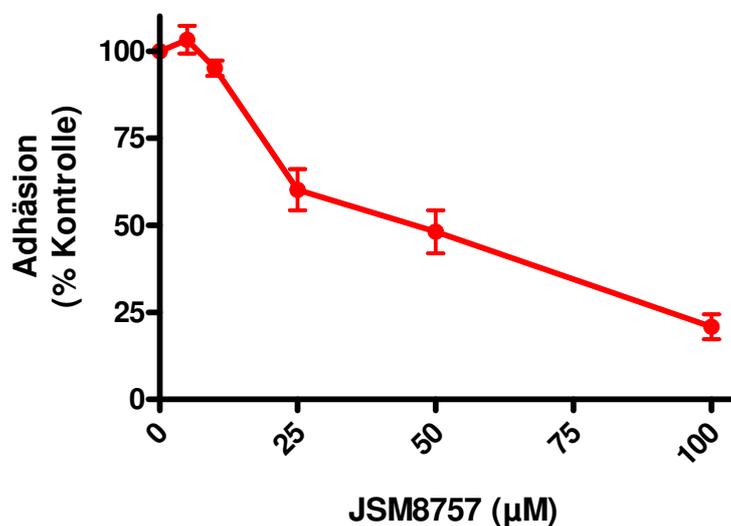


**Abbildung 3.3: Dosisabhängige Hemmung der Adhäsion in BON Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor JSM8757 (MTT Assay)**

Dargestellt ist die Menge der adhären Zellen nach einer vierstündigen Inkubationszeit. Die Werte sind ausgedrückt als Prozentsatz der Adhäsion in vehikelbehandelten Kontrollzellen. Auf der X-Achse werden die steigenden Konzentrationen des Inhibitors angezeigt ( $n_{\text{GES}}=7$ ). Die Adhäsion der Kontrollzellen nach der vierstündigen Inkubation wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft.

### 3.2.2 JSM8757 hemmt dosisabhängig die Adhäsion in QGP-1 Zellen

Der  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor bewirkte auch in der zweiten getesteten NET Zelllinie eine starke, dosisabhängige Adhäsionshemmung (s. **Abbildung 3.4**). Eine signifikante Abnahme der adhärennten Zellen auf etwa 60 % der Kontrollzellen wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  beobachtet. Das Ausmaß der Adhäsionshemmung nahm mit steigenden Inhibitorkonzentrationen bis auf eine maximale Inhibition von  $20,8 \pm 3,6$  % der Kontrolle weiter zu.



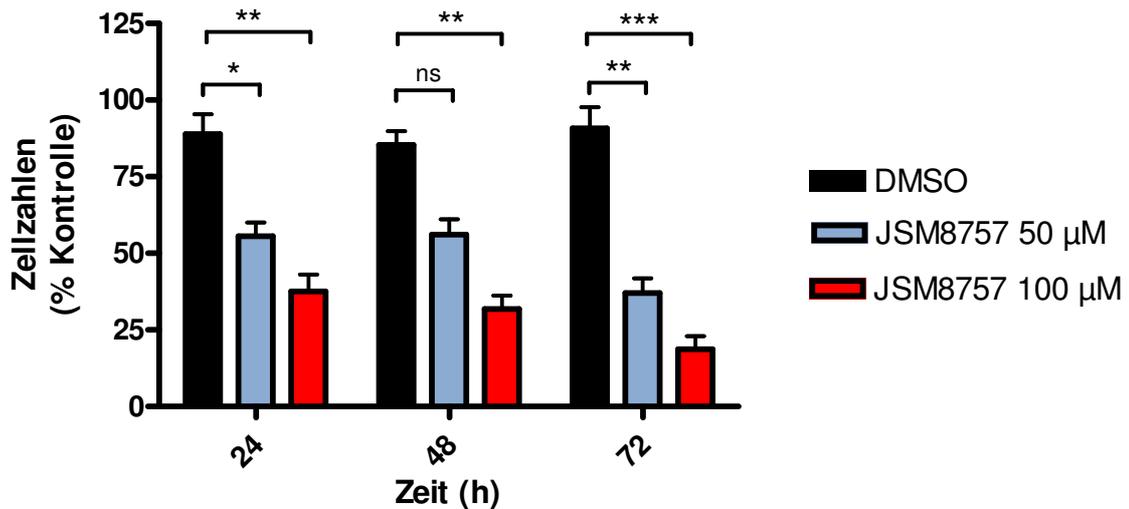
**Abbildung 3.4: Dosisabhängige Hemmung der Adhäsion in QGP-1 Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor JSM8757 (MTT Assay)**

Dargestellt ist die Menge der adhärennten Zellen nach einer einstündigen Inkubationszeit. Die Werte sind ausgedrückt als Prozentsatz der Adhäsion in vehikelbehandelten Kontrollzellen. adhärennten Zellen als Prozent der Kontrolle zu sehen. Auf der X-Achse werden die steigenden Konzentrationen des Inhibitors angezeigt. ( $n_{\text{GES}}=4$ ). Da QGP-1 Zellen sehr viel rascher als BON Zellen adhären, war bei dieser Zelllinie eine Inkubationsdauer von einer Stunde hinreichend. Die Adhäsion der Kontrollzellen wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft.

### **3.2.3 JSM8757 hemmt dosis- und zeitabhängig die Proliferation adhärenter BON Zellen**

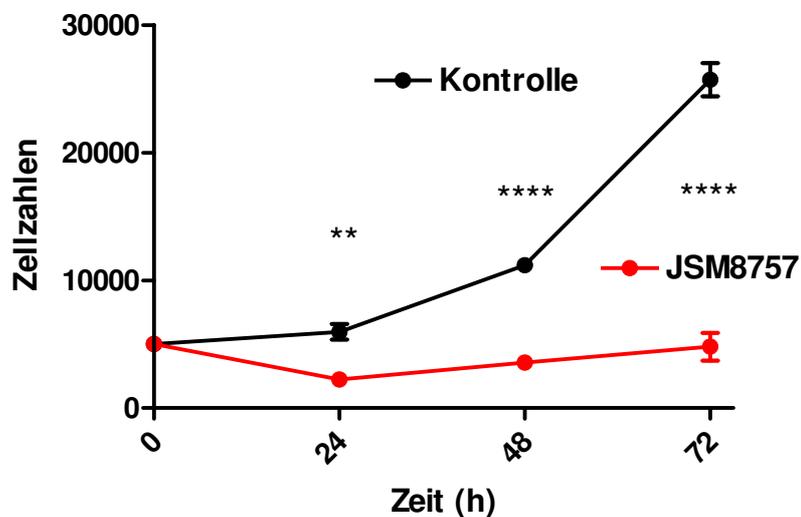
Bei adhärennten Zellen ist die integrinvermittelte Verankerung in der extrazellulären Matrix eine wichtige Voraussetzung für Proliferation. Im zweiten Schritt sollte daher geprüft werden, ob die Proliferation von NET Zellen durch JSM8757 beeinträchtigt wird. Zellzählungen zeigten in der Tat eine dosisabhängige Proliferationshemmung von adhärennten BON Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor. Nach einer 72-stündigen Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  JSM8757 war die Zellzahl auf ca. 35 % der unbehandelten Kontrollzellen reduziert, bzw. auf ca. 18 % bei 100  $\mu\text{M}$  (**s. Abbildung 3.5**). Adhärennte BON Zellen wurden zusätzlich mit DMSO für 72 Stunden inkubiert, um die Effekte des Lösungsmittels selbst zu beurteilen. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Zellzahlen dieser Vehikelkontrollen zu unbehandelten Kontrollzellen (**s. Abbildung 3.5**).

Die Proliferationsassays zeigten ferner eine klare Zeitabhängigkeit der Proliferationshemmung in adhärennten BON Zellen (**s. Abbildung 3.6**). Bereits nach den ersten 24 Stunden gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der unbehandelten Kontrollzellen und der mit dem Inhibitor behandelten Zellen. Diese Differenz nahm bis zum 72-Stunden-Zeitpunkt kontinuierlich zu. Somit wird durch JSM8757 nicht nur eine transiente Verzögerung der Proliferation, sondern eine anhaltende Wachstumshemmung ausgelöst.



**Abbildung 3.5: Dosisabhängige Hemmung der Proliferation adhärenter BON Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor JSM8757**

Gezeigt sind die Zellzahlen nach 24-, 48- und 72-stündiger Kulturdauer unter den angegebenen Bedingungen als Prozent der unbehandelten Kontrollen ( $n_{GES}=4$ ; \*,  $P<0,05$ ; \*\*,  $P<0,01$ ; \*\*\*,  $P<0,001$ ).



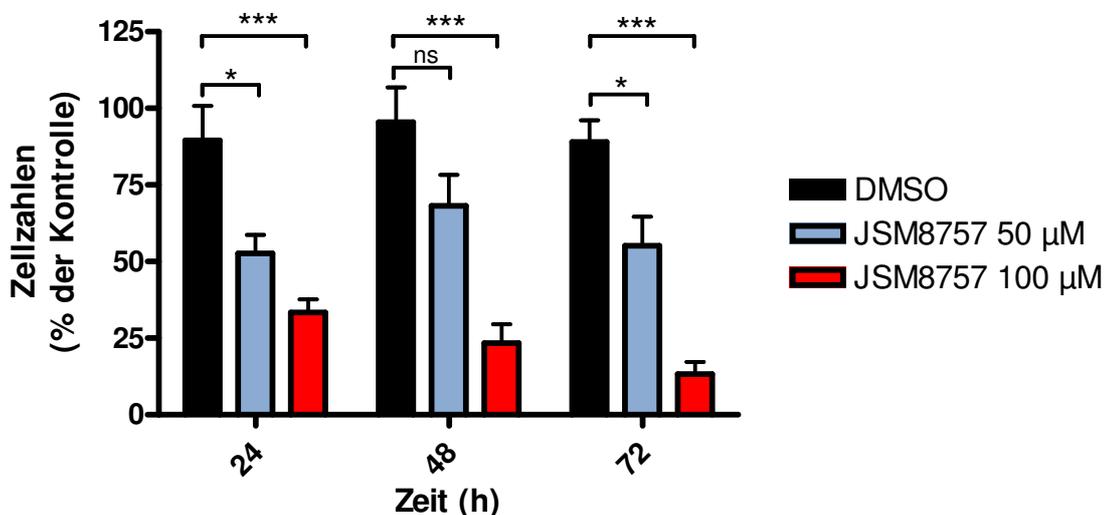
**Abbildung 3.6: Zeitabhängige Hemmung der Proliferation in adhärennten BON Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor JSM8757**

Gezeigt ist eine Gegenüberstellung der Proliferationskurven von vehikelbehandelten Kontrollzellen (schwarze Kurve) sowie von Zellen, die mit 100 µM JSM8757 behandelt wurden (rote Kurve). Auf der Y-Achse ist die Anzahl vitaler Zellen zu sehen (Zahl bei 0 h: 5.000). Auf der X-Achse werden die vier verschiedenen Zeitpunkte angezeigt ( $n_{GES}=4$ ; \*\*,  $P<0,01$ ; \*\*\*\*,  $P<0,0001$ ).

### 3.2.4 JSM8757 hemmt zeit- und dosisabhängig die Proliferation adhärenter QGP-1 Zellen

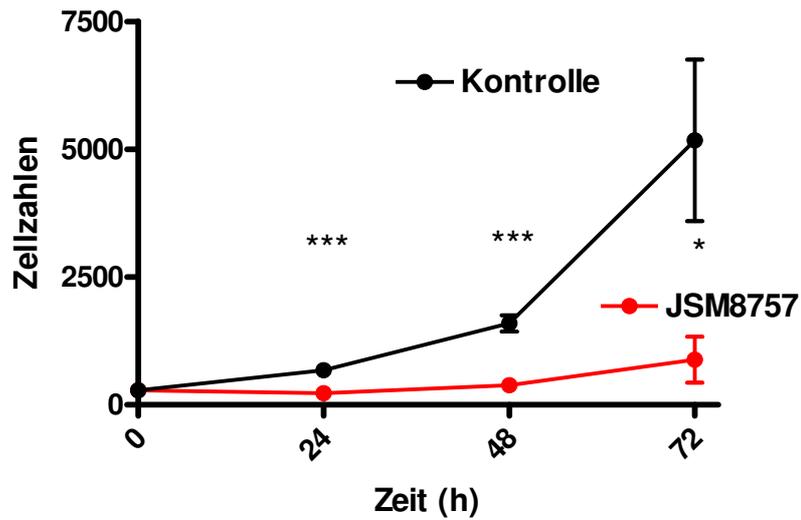
Analog zu den Ergebnissen an den BON Zellen wurden auch an QGP-1 Zellen die Effekte von JSM8757 auf die Proliferation geprüft. In adhärennten QGP-1 Zellen verursachte der Integrinantagonist ebenfalls eine Proliferationshemmung. Nach einer 72-stündigen Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  JSM8757 war die Zellzahl auf ca. 55 % der unbehandelten Kontrollzellen reduziert, bzw. auf ca. 13 % bei 100  $\mu\text{M}$ . Tatsächlich lagen unter diesen Bedingungen die Zellzahlen nur geringfügig über dem Ausgangswert (**s. Abbildung 3.7**). DMSO hatte selbst keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation von adhärennten QGP-1 Zellen.

Auch in den QGP-1 Zellen zeigte sich eine anhaltende Wachstumsinhibition mit ähnlicher Kinetik wie in der BON Zelllinie (**s. Abbildung 3.8**). Im Gegensatz zu den Kontrollen, die ein nahezu exponentielles Wachstum aufwiesen, blieb bei den behandelten Zellen die Zellzahl nahezu auf dem Ausgangsniveau.



**Abbildung 3.7: Dosisabhängige Hemmung der Proliferation in adhärennten QGP-1 Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor JSM8757**

Gezeigt sind die Zellzahlen nach 24-, 48- und 72-stündiger Kulturdauer unter den angegebenen Bedingungen als Prozent der unbehandelten Kontrollen ( $n_{\text{GES}}=5$ ; \*,  $P<0,05$ ; \*\*\*,  $P<0,001$ ).



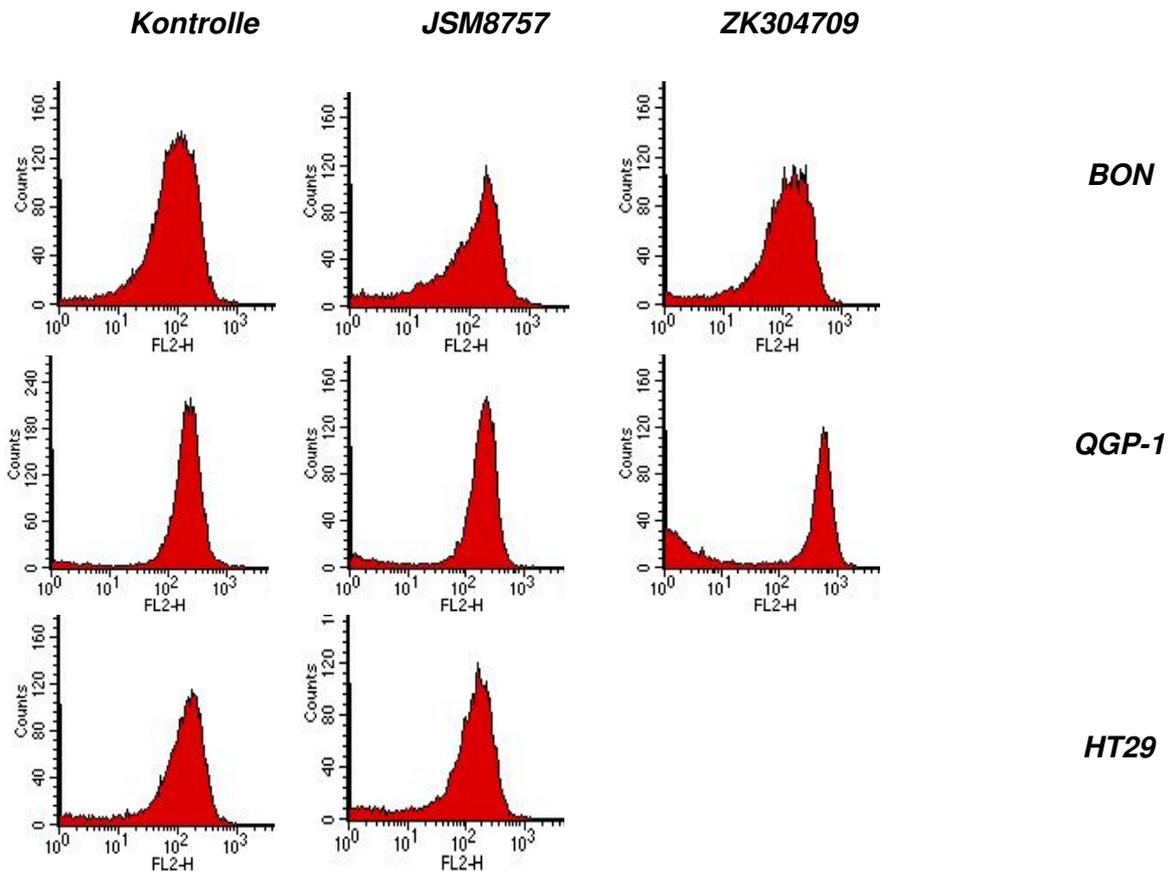
**Abbildung 3.8: Zeitabhängige Hemmung der Proliferation in adhärenen QGP-1 Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor JSM8757**

Gezeigt ist eine Gegenüberstellung der Proliferationskurven von vehikelbehandelten Kontrollzellen (schwarze Kurve) sowie von Zellen, die mit 100  $\mu\text{M}$  JSM8757 behandelt wurden (rote Kurve). Auf der Y-Achse ist die Anzahl vitaler Zellen zu sehen (Zahl bei 0 h: 300). Auf der X-Achse werden die vier verschiedenen Zeitpunkte angezeigt ( $n_{\text{GES}}=5$ ; \*,  $P<0,05$ ; \*\*\*,  $P<0,001$ ).

### 3.3 JSM8757 induziert in adhärennten NET Zellen keine Apoptose

Die bisherigen Experimente belegten eine klare Hemmung der Adhäsion und der Proliferation nach JSM8757-Gabe in beiden NET Zelllinien. Um zu prüfen, inwiefern Apoptose einen Beitrag zu dieser Hemmung leistet, wurde im Folgenden der Anteil apoptotischer Zellen mit Hilfe von JC-1 quantifiziert. JC-1 erlaubt es, das mitochondriale Membranpotential zu beurteilen und gilt als Nachweisverfahren, das auch frühe Apoptosestadien erkennt. Die adhärennten Zellen wurden für 24 Stunden mit 100  $\mu\text{M}$  JSM8757 inkubiert. HT29, eine  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-defiziente Kolonkarzinom-Zelllinie wurde dabei als negative Kontrolle eingesetzt, während ZK304709, ein Multikinase-Inhibitor der in QGP-1 Zellen nach 24 Stunden deutliche Apoptose induziert [110], als positive Kontrolle diente.

In den folgenden Histogrammen entspricht eine Abnahme der Fluoreszenz einer Störung des mitochondrialen Membranpotentials und bezeichnet somit apoptotische Zellen. JSM8757-Behandlung führte weder in BON noch in QGP-1 Zellen zu einer Verringerung der Fluoreszenz, sodass sich bei dem kurzen Behandlungszeitraum kein Anhaltspunkt für Apoptoseinduktion ergab (**s. Abbildung 3.9**). Erwartungsgemäß zeigten HT29 Zellen ebenfalls keine Änderung der JC-1 Fluoreszenz nach JSM8757-Gabe, während ZK304709 in QGP-1 Zellen als Positivkontrolle eine deutliche Linksverschiebung des Fluoreszenzmaximums induzierte. Insgesamt zeigte sich in den durchgeführten JC-1 Assays keine Apoptoseinduktion in beiden NET Zelllinien nach JSM8757-Gabe unter adhärennten Bedingungen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die antiproliferativen Effekte des Integrininhibitors nicht auf dem Boden eines programmierten Zelltods zu erklären sind.



**Abbildung 3.9: Keine Apoptoseinduktion in NET Zellen nach JSM8757-Gabe**

Gezeigt sind Histogramme der JC-1 Fluoreszenz an NET Zellen bzw.  $\alpha_5$  defizienten HT29 Kontrollen, die über 24 Stunden mit Vehikel (Kontrolle), mit 100  $\mu$ M JSM8757, oder mit ZK304709 inkubiert wurden. Nur nach Behandlung mit ZK304709 ist in QGP-1 Zellen eine zweite Population mit deutlich reduzierter Fluoreszenzintensität zu erkennen (gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen).

### 3.4 JSM8757 bewirkt eine Reduktion von Apoptose in QGP-1 Zellen unter substratfreien Bedingungen

Nachdem die JC-1 Färbungen keine Zeichen einer Apoptoseinduktion nach JSM8757-Gabe in adhärennten NET Zellen gezeigt hatten, wurden analoge Untersuchungen auch unter substratfreien (Anoikis-) Bedingungen durchgeführt (**s. Kapitel 2.7.2**). Hierbei wurden zunächst die Spontananoikisraten der beiden NET Zelllinien bestimmt (**s. Abbildung 3.10**).

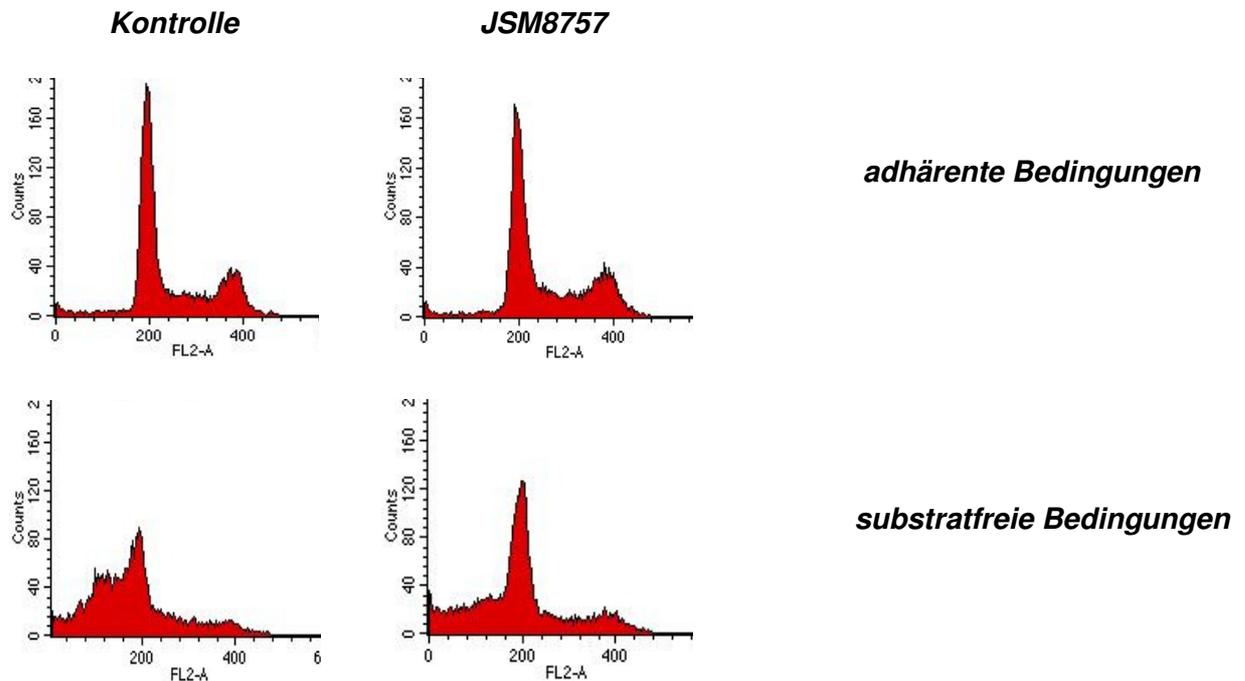
NET Zelllinie	Mittelwert (in %)	SEM (in %)
BON (N=4)	7,25	±0,75
QGP-1 (N=5)	36,8	±7,1

**Abbildung 3.10: QGP-1 Zellen haben höhere Anoikisraten unter substratfreien Bedingungen als BON Zellen**

*Gezeigt sind die Mittelwerte der apoptotischen Fraktionen der jeweiligen Zelllinien unter substratfreien Bedingungen (als Prozentzahl der Gesamtzellen) sowie die SEM Werte.*

Um die Effekte des Inhibitors zu evaluieren, wurden NET Zellen mit 100 µM JSM8757 auf PolyHEMA-Mikrotiterplatten für 20 Stunden inkubiert. Anhand von DNA-Histogrammen wurden anschließend apoptotische Zellen identifiziert, die als subdiploide Zellpopulation links neben den diploiden Zellen in der G1-Phase erschienen (**s. Abbildung 3.11**).

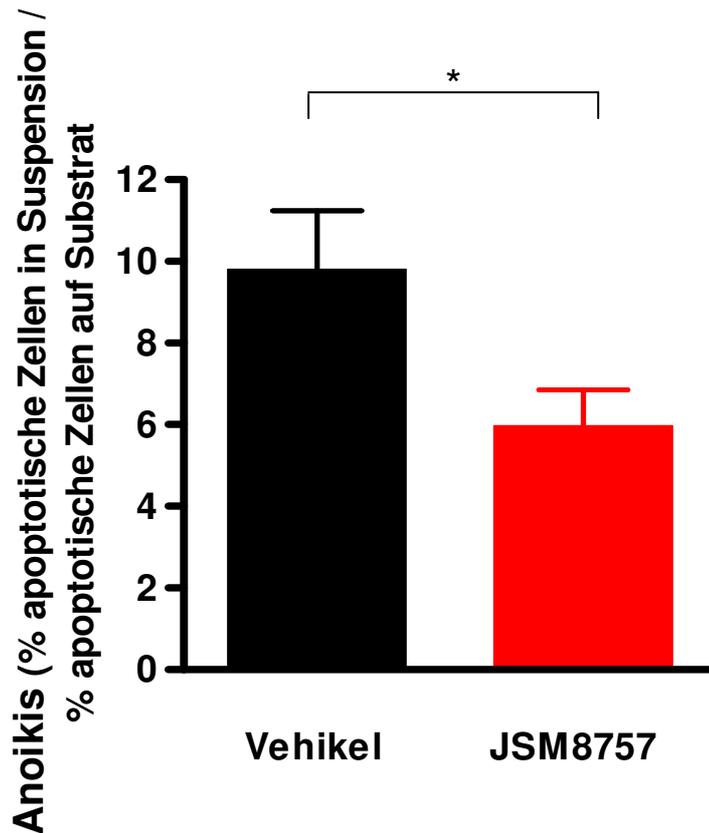
Diese DNA Histogramme zeigten bei BON Zellen sowohl unter adhärennten Bedingungen als auch in Suspensionskultur vergleichbare Apoptoseraten, die sich auch nach JSM8757-Gabe nicht änderten (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise bewirkte der Integrininhibitor eine Reduktion der Anoikisrate in nicht adhärennten QGP-1 Zellen. **Abbildung 3.11** demonstriert ein repräsentatives Experiment. Während unter adhärennten Bedingungen die apoptotische Fraktion nach JSM8757-Gabe nahezu unverändert blieb, bewirkte die Behandlung mit JSM8757 eine klare Reduktion dieser Zellpopulation unter substratfreien Bedingungen.



**Abbildung 3.11: Reduktion von Anoikis in nicht adhärenen QGP-1-Zellen nach JSM8757-Gabe**

Der linke Teil der Abbildung zeigt die Zellzyklusprofile der vehikelbehandelten QGP-1 Zellen, der rechte Teil die korrespondierenden Profile der mit JSM8757 behandelten QGP-1 Zellen. Die hypodiploide Zellfraktion entspricht apoptotischen Zellen (20-stündige Inkubation mit 100  $\mu$ M JSM8757).

Die quantitative Auswertung der Anoikisassays mit QGP-1 Zellen ist in der **Abbildung 3.12** zusammengefasst. Ermittelt wurden zunächst der Prozentsatz apoptotischer Zellen in Suspensionskultur sowie der Prozentsatz apoptotischer Zellen unter adhärenen Bedingungen. Diese Werte wurden ins Verhältnis gesetzt, sodass der Quotient die Induktion von Anoikis relativ zur Apoptose unter basalen Kulturbedingungen widerspiegelt. Die Apoptoseraten in den adhärenen Kontrollkulturen wurden durch Behandlung mit JSM8757 nicht verändert. Im Unterschied hierzu zeigte sich bei Behandlung der Suspensionskulturen mit JSM8757 eine deutliche Abnahme der Apoptosefraktion, sodass durch JSM8757 in den QGP-1 Zellen eine Verminderung von Anoikis erzielt wurde.



**Abbildung 3.12: Reduktion von Anoikis in QGP-1 Zellen durch JSM8757**

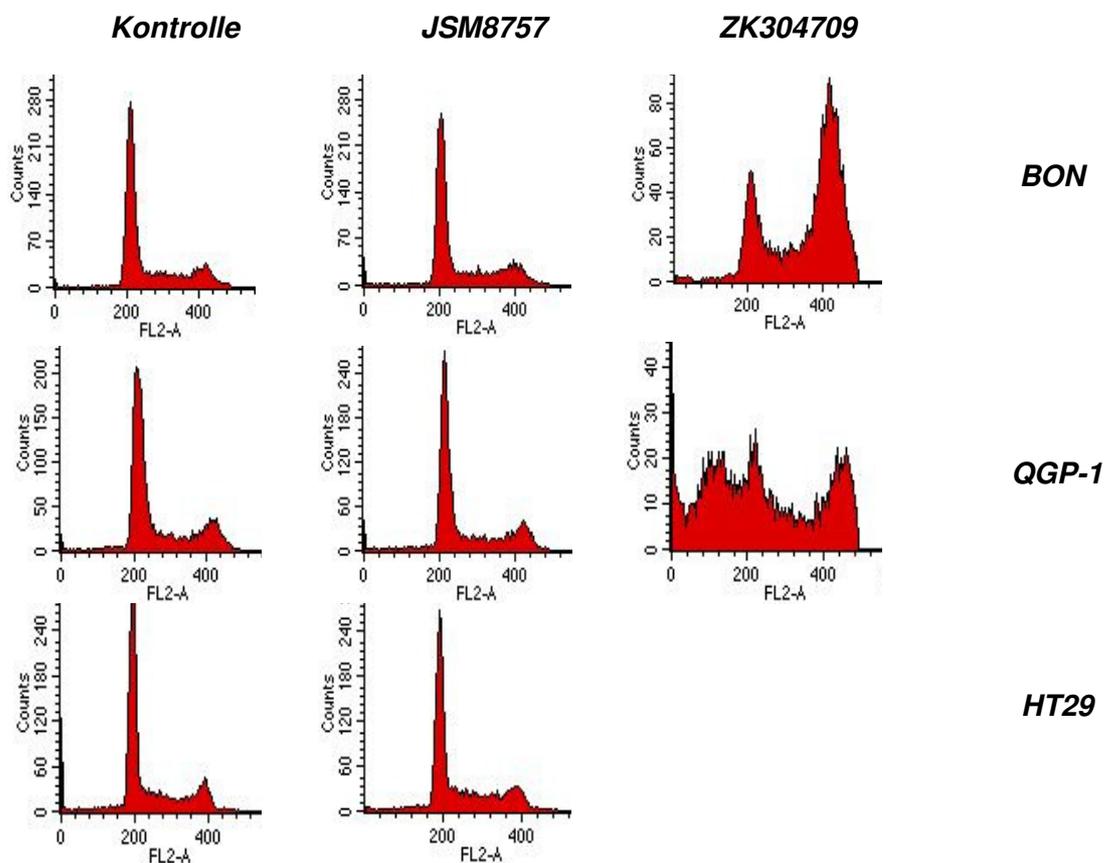
Das Diagramm zeigt die Effekte des Integrinantagonisten auf Anoikis von QGP-1 Zellen. Anoikis wurde hier ermittelt als Menge der apoptotischen Zellen in Suspensionskultur (in % Gesamtzellen) relativ zur Menge apoptotischer Zellen unter adhärenenten Kontrollbedingungen (in % Gesamtzellen). Ausgedrückt wird Anoikis also x-faches der Apoptoserate adhärenenter Kulturen. Die linke Säule zeigt diesen Wert in Abwesenheit des Integrininhibitors und die rechte Säule zeigt die Anoikisrate in QGP-1 Zellen nach JSM8757-Gabe (20-stündige Inkubation mit 100  $\mu$ M JSM8757;  $n_{GES}=6$ ; \*,  $P=0,047$ ).

### 3.5 Zellzyklusanalyse nicht synchronisierter NET Zellen

Die bisherigen Ergebnisse dokumentieren eine deutliche Wachstumsinhibition durch Behandlung mit JSM8757 ohne einen Hinweis auf Apoptoseinduktion. Um Anhaltspunkte für den Wirkmechanismus von JSM8757 zu erhalten, wurden im nächsten Schritt Zellzyklusanalysen nicht synchronisierter Zellen durchgeführt (**s. Kapitel 2.7.2**).

Die folgenden DNA Histogramme zeigen Zellzyklusprofile exponentiell wachsender NET Kulturen unter Behandlung mit Vehikel oder JSM8757. Dabei ist keine wesentliche

Umverteilung in Folge der Behandlung erkennbar (s. **Abbildung 3.13**). Erwartungsgemäß lassen auch die Zellzyklusprofile keine Apoptoseinduktion durch JSM8757 erkennen.  $\alpha_5$ -defiziente HT29 Zellen dienten erneut als negative Kontrolle, als positive Kontrolle diente der CDK-Inhibitor ZK304709, der sowohl Apoptose (QGP-1) wie auch die vorbeschriebene Zellzyklusumverteilung in die G2/ M Phase in beiden NET Zelllinien induzierte. HT29 Zellen zeigten erwartungsgemäß keine Änderung nach Behandlung mit dem Integrinantagonisten. Zusammenfassend zeigten Zellzyklusanalysen nicht synchronisierter NET Zellen keine Zellzyklusumverteilung, die Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus von JSM8757 an den beiden Zelllinien erlaubt hätte.



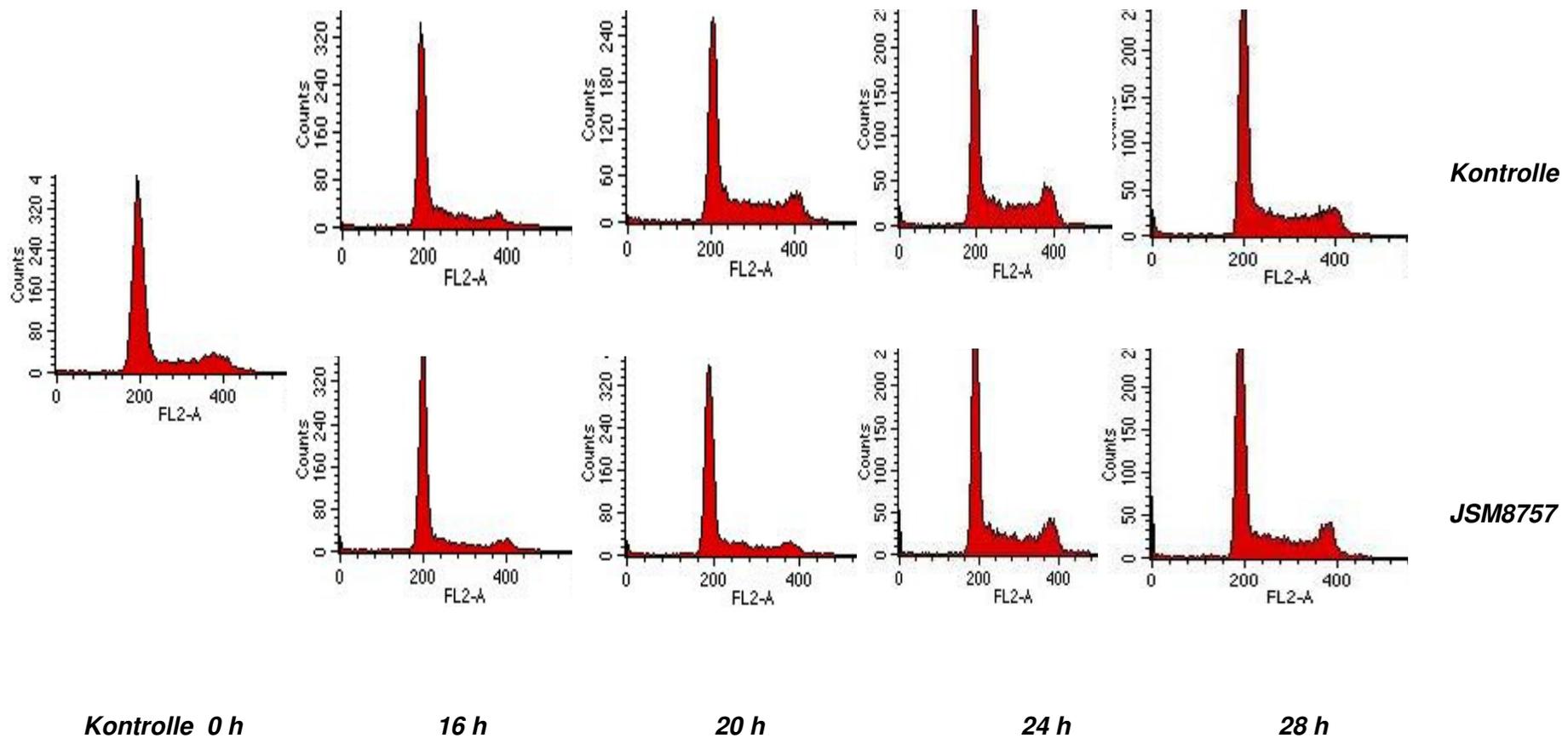
**Abbildung 3.13: Keine Zellzyklusumverteilung in NET Zellen nach JSM8757-Gabe**

Gezeigt sind Histogramme der JC-1 Fluoreszenz an NET Zellen bzw.  $\alpha_5$  defizienten HT29 Kontrollen, die über 24 Stunden mit Vehikel (Kontrolle), mit 100  $\mu\text{M}$  JSM8757, oder mit ZK304709 inkubiert wurden. Nur nach Behandlung mit ZK304709 ist Zellzyklusumverteilung in die G2/ M Phase in beiden NET Zelllinien zu erkennen (gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen).

### 3.6 JSM8757 inhibiert die Zellzyklusprogression in BON Zellen durch Verzögerung der G1/ S-Passage

Nachdem die Zellzyklusanalysen an den nicht synchronisierten Kulturen die Ursache der antiproliferativen Effekte des  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitors an BON Zellen nicht abbilden konnten, wiederholten wir Zellzyklusanalysen nach G1-Synchronisation der Zellen. Zur Synchronisation wurden die Kulturen 48 Stunden unter serumfreien Bedingungen gehalten, wodurch eine partielle Synchronisation mit G1 Fraktionen von ca. 70 % bis 80 % erzielt werden kann. Anschließend wurden die synchronisierten BON-Zellen durch Zugabe von FCS-haltigem Vollmedium zum Wiedereintritt in den Zellzyklus stimuliert. Mit Beginn der Serumstimulation erfolgte ebenfalls die Gabe von JSM8757 bzw. Vehikel, danach wurden die Zellen zu den gewünschten Zeiten geerntet.

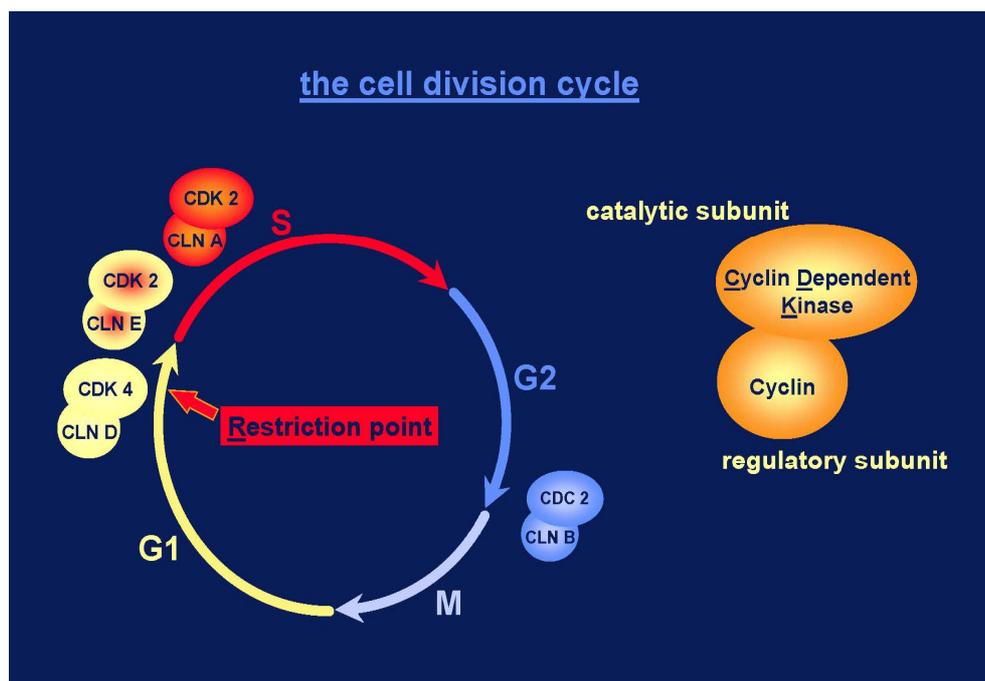
Die DNA-Histogramme der folgenden Abbildung verfolgen die synchronisierten Zellen beim Wiedereintritt in den Zellzyklus. Gut erkennbar ist dabei in den Vehikelkontrollen eine deutliche Zunahme der S-Phase zu Lasten der G1-Phase im Zeitraum von 16 - 24 Stunden (**s. Abbildung 3.14**). Zu den Zeitpunkten 20 und 24 ist zusätzlich das Erreichen der G2/ M Phase erkennbar, die die synchronisierten Kontrollkulturen nach 28 Stunden dann wieder verlassen haben. Im Unterschied zu diesen Kontrollen, zeigten die mit JSM8757 behandelten Zellen eine Verlangsamung der G1/ S-Progression. Besonders eindeutig wurde diese Verlangsamung zu den Zeitpunkten 20 h und 24 h. Während in den Kontrollen relativ viele Zellen sich schon in der S-Phase und G2/ M Phase befanden, wurden diese Phasen in den behandelten Zellen erst nach 28 Stunden erreicht. Somit zeigten die behandelten Zellen einen im Vergleich zu den Kontrollen verzögerten Übergang in die S-Phase.



**Abbildung 3.14: Verzögerte G1/ S-Progression in BON-Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor JSM8757**

FACS-Analyse, die das Durchlaufen einer Zellzyklusrunde in den synchronisierten BON Zellen mit- bzw. ohne JSM8757 Behandlung verfolgt (Zeitpunkte: 0 h, 16 h, 20 h, 24 h, 28 h/ G1-Synchronisation durch einen 48-stündigen FCS-Entzug). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Um einen Einblick in die molekularen Mechanismen zu gewinnen, durch die JSM8757 die Zellzyklusprogression von BON Zellen verlangsamt, überprüften wir mittels Western-Blot-Analyse die Regulation von Proteinen, welche sich am G1/ S-Übergang beteiligen. Die Zykline D, E, A zusammen mit ihren katalytischen Untereinheiten, CDK2 und CDK4, spielen dabei eine grundlegende Rolle (**s. Abbildung 3.15**). Die Zyklin D/ CDK4- und Zyklin E/ CDK2-Komplexe bewirken eine Hyperphosphorylierung von Rb, was wiederum die Bildung des Zyklin A/ CDK2-Komplexes und anschließend den Übergang in die S-Phase induziert (**s. Kapitel 1.2.5**). Außerdem sind die CDK-Inhibitoren (CKIs) p21 und p27 sowie die Serin-Threonin-Kinasen Erk1/2, welche die Zyklin D-Transkription fördern, von zentraler Bedeutung. Zusätzlich wurde die Expression von Zyklin B und der dazugehörigen katalytischen Untereinheit CDC2 untersucht, die den G2/ M-Übergang regulieren, um auch Inhibitoreffekte in dieser Phase abzubilden.

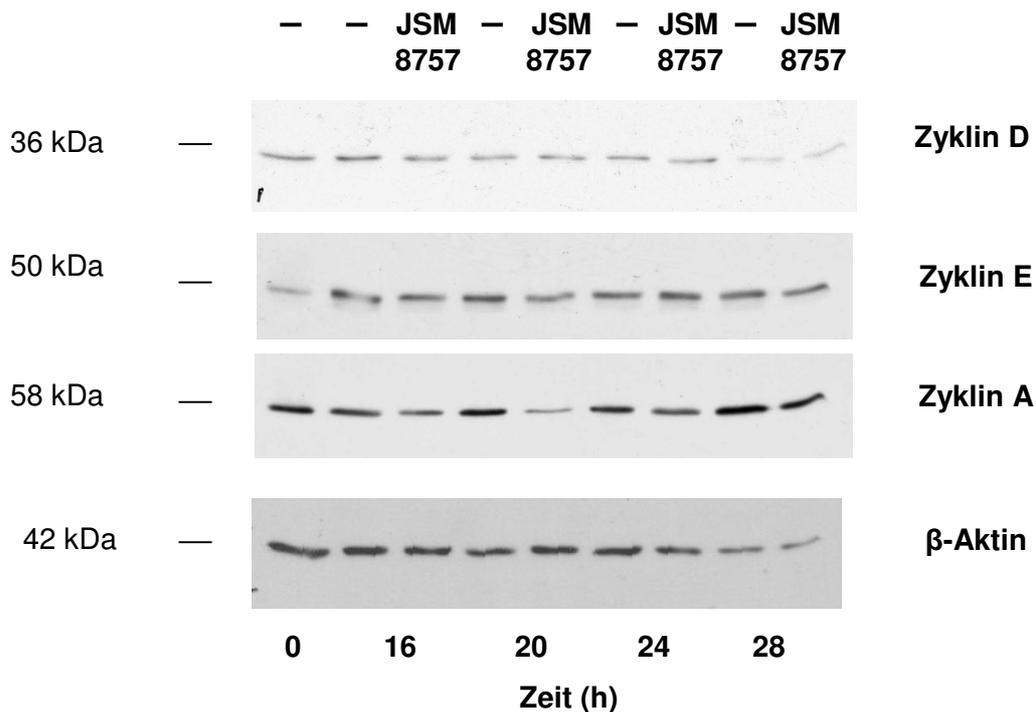


**Abbildung 3.15: Vereinfachtes Schema des Zellzyklus**

Abgebildet sind die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, M) sowie die Zykline und CDKs, die das durchlaufen dieser Phasen wesentlich vorantreiben.

### 3.6.1 JSM8757 verzögert die Zyklin A-Induktion und inhibiert die Zyklin B-Induktion in G1-synchronisierten BON Zellen

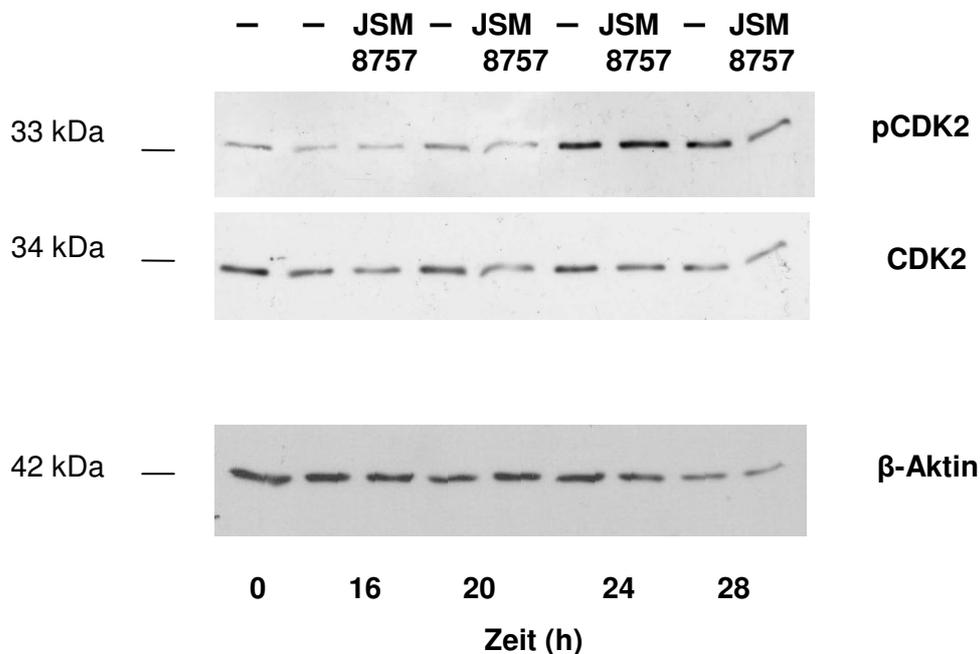
Zunächst wurden mittels Western-Blot-Analysen die Zykline D, E, und A in G1-synchronisierten Zellen untersucht, die entsprechend dem oben geschilderten Versuchsablauf durch FCS zur Wiederaufnahme der Zellzyklusprogression stimuliert waren. Die JSM8757-Gabe bewirkte eine starke Verzögerung der Zyklin A-Induktion (**s. Abbildung 3.16**). Dieser Effekt war zu den ersten drei Zeitpunkten gut zu erkennen (16 h, 20 h, 24 h). Die Zykline D und E schienen dagegen nicht reguliert zu sein. Zusätzlich wurde ein Western-Blot mit  $\beta$ -Aktin angefertigt.  $\beta$ -Aktin ist ein Strukturprotein und wird daher hier als Ladekontrolle verwendet. Diese Ladekontrollen zeigten keine signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf.



**Abbildung 3.16: Verzögerung der Zyklin A-Induktion in G1-synchronisierten BON Zellen nach JSM8757-Gabe**

Western-Blots zur Immunodektektion der Zykline D, E und A. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

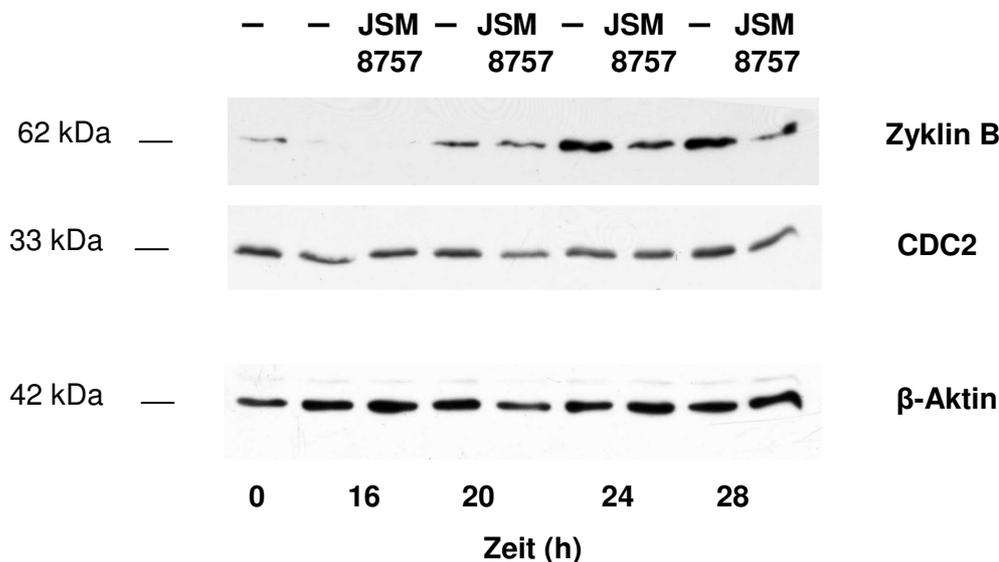
Als Partner von Zyklin A in der Regulation des G1/ S Übergangs fungiert die zyklinabhängige Kinase CDK2. Anschließend wurden Western-Blots zur Detektion von CDK2 bzw. der phosphorylierten, aktivierten Form des Proteins (pCDK2) angefertigt, um mögliche Effekte von JSM8757 auf diesen Komplexpartner zu identifizieren. Der pCDK2 Antikörper ist gegen das Phosphopeptid der an Threonin 160 phosphorylierten Form gerichtet. Die Experimente zeigten in den Vehikelkontrollen eine deutliche Zunahme der phosphorylierten (aktivierten) Form zu den späteren Zeitpunkten (24 h, 28 h), jedoch keine Regulation dieses Proteins durch JSM8757 (**s. Abbildung 3.17**).



**Abbildung 3.17: JSM8757-Behandlung synchronisierter BON Zellen hat keinen Einfluss auf die Expression und Thr 160 Phosphorylierung von CDK2**

Western-Blots zur Immunodetektion von CDK2 sowie des Phospho-Epitopes der an Thr 160 phosphorylierten Form. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Zyklin B spielt zusammen mit seiner katalytischen Untereinheit CDC2 eine sehr wichtige Rolle am G2/ M-Übergang (**s. Kapitel 3.6**). Da Zyklin B in proliferierenden Zellen durch aktive CDK2 Komplexe induziert wird, ist bei Inhibition von CDK2 auch eine Reduktion der Zyklin B Induktion zu erwarten. Western-Blot-Analysen zeigten zu den früheren Zeitpunkten aufgrund der G1-Synchronisation kaum Zyklin B-Expression; ab 20 Stunden wird dann aber in den Vehikelkontrollen eine starker Anstieg beobachtet. Im Unterschied hierzu zeigte CDC2 während des Zeitverlaufs keine Regulation (**s. Abbildung 3.18**). Die Behandlung mit dem Integrinantagonisten führte zu einer starken Inhibition der Zyklin B-Induktion in BON Zellen zu den späten Zeitpunkten (24 h, 28 h).



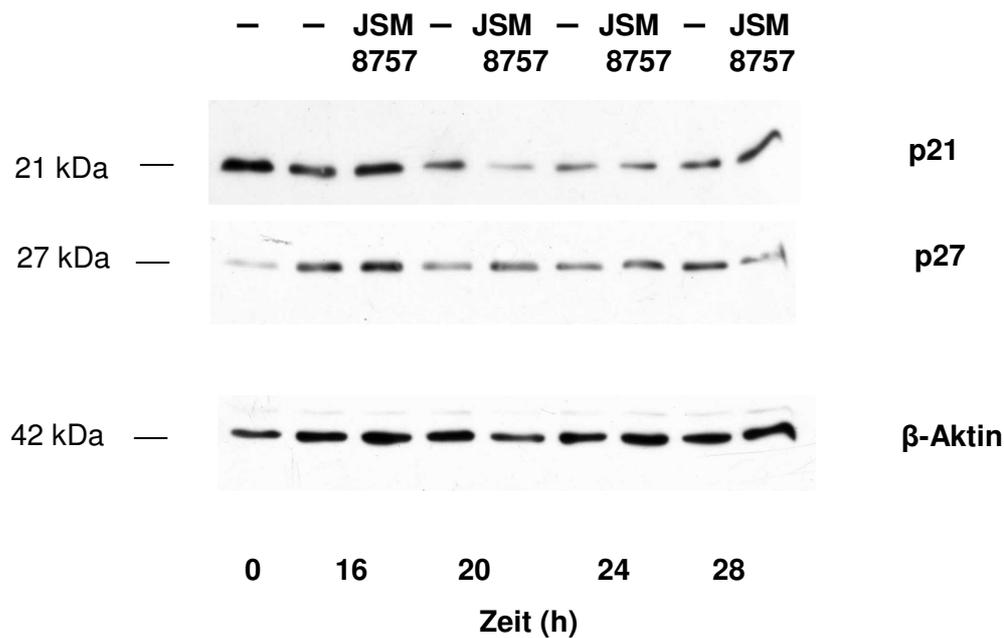
**Abbildung 3.18: Inhibition der Zyklin B-Induktion in G1-synchronisierten BON Zellen nach JSM8757-Gabe**

Western-Blots zur Immunodetektion von Zyklin B und CDC 2. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### **3.6.2 JSM8757 hat keinen Effekt auf die CKI-Expression in G1-synchronisierten BON Zellen**

Die CDK-Inhibitoren (CKIs) p21 und p27 sind sowohl während der G1-Phase als auch beim G1/ S-Übergang von Bedeutung (**s. Kapitel 1.2.5, Kapitel 3.6**) und könnten daher am Wirkmechanismus des Integrininhibitors beteiligt sein. Daher wurde ihre Expression anhand von Immunoblotanalysen dargestellt. Unsere Ergebnisse zeigten eine zeitabhängige Regulation der CKI-Expression in den Kontrollzellen. Eine inhibitorabhängige CKI-Regulation war aber nicht nachweisbar (**s. Abbildung 3.19**). Weitere Experimente zu früheren Zeitpunkten demonstrierten ebenfalls keine JSM8757-induzierten Effekte (1 h, 3 h, 6 h; Daten nicht gezeigt).

Das Retinoblastoma Protein Rb ist Substrat für CDK4 und CDK2. Phosphorylierungsabhängig bindet und inaktiviert Rb den Transkriptionsfaktor E2F, dessen Aktivität für den Übergang aus der G1 in die S-Phase sowie für die Passage der S-Phase benötigt wird. Überraschenderweise ließen Immunoblot Analysen zur Expression oder Phosphorylierung von Rb keine Regulation durch JSM8757 erkennen. (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ließ sich Westernblot-Analysen der Erk-Phosphorylierung kein Unterschied zwischen Vehikelkontrollen und JSM8757 Behandlung darstellen, ein Befund der sich auch bei anschließenden Analysen zu früheren Zeitpunkten bestätigte (1 h, 3 h, 6 h; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.19: Kein Effekt auf die CKI-Regulation in G1-synchronisierten BON Zellen nach JSM8757-Gabe**

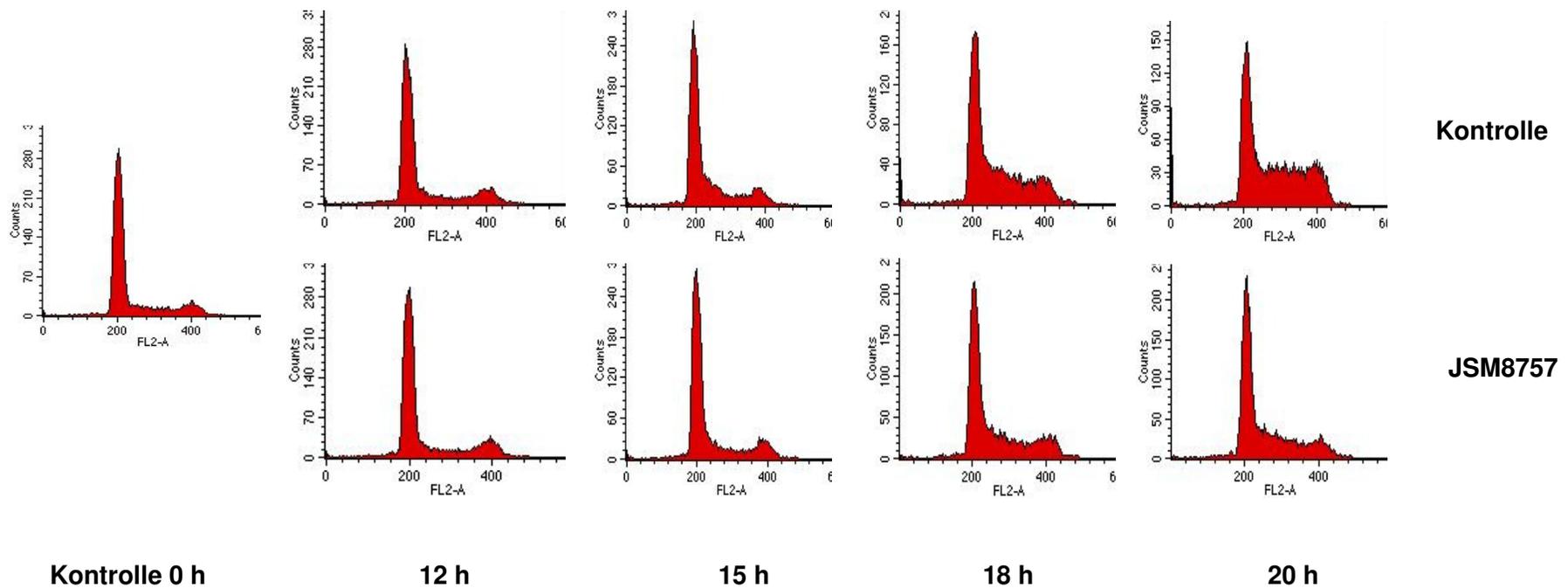
Western-Blots zur Immunodetektion von p21 und p27. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### **3.7 JSM8757 inhibiert die Zellzyklusprogression in QGP-1 Zellen durch Verzögerung der G1/ S-Passage**

Zellzyklusanalysen mit synchronisierten Zellen wurden anschließend auch mit der zweiten NET Zelllinie durchgeführt. Zunächst erfolgte die G1-Synchronisierung der Zellen durch einen 36-stündigen FCS-Entzug. Nachfolgend wurden die synchronisierten QGP-1 Zellen ähnlich wie die BON Zellen durch Zugabe von FCS-haltigem Vollmedium zum Wiedereintritt in den Zellzyklus stimuliert. Mit Beginn der Serumstimulation erfolgte ebenfalls die Gabe von JSM8757 bzw. Vehikel, danach wurden die Zellen zu den gewünschten Zeiten geerntet.

In den DNA-Histogrammen der folgenden Abbildung wird die Verteilung der Zellen zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen abgebildet (**s. Abbildung 3.20**). Zu dem Zeitpunkt 0 h befanden sich mehr als 75% der Zellen in der G1-Phase, was den Erfolg der Synchronisierung bestätigte. Außerdem fand in den behandelten Zellen eine Verzögerung der G1/ S-Progression statt. Besonders deutlich wurde dieses Phänomen zu den späteren Zeitpunkten (15 h, 18 h, 20 h), wo im Gegensatz zu den Kontrollen, die bereits viele Zellen in der S-Phase aufwiesen, der G1/ S-Übergang in den behandelten Kulturen deutlich langsamer erfolgte.

Somit zeigten die mit JSM8757 behandelnden QGP-1 Zellen eine im Vergleich zu den Kontrollen verzögerte G1/ S-Progression.

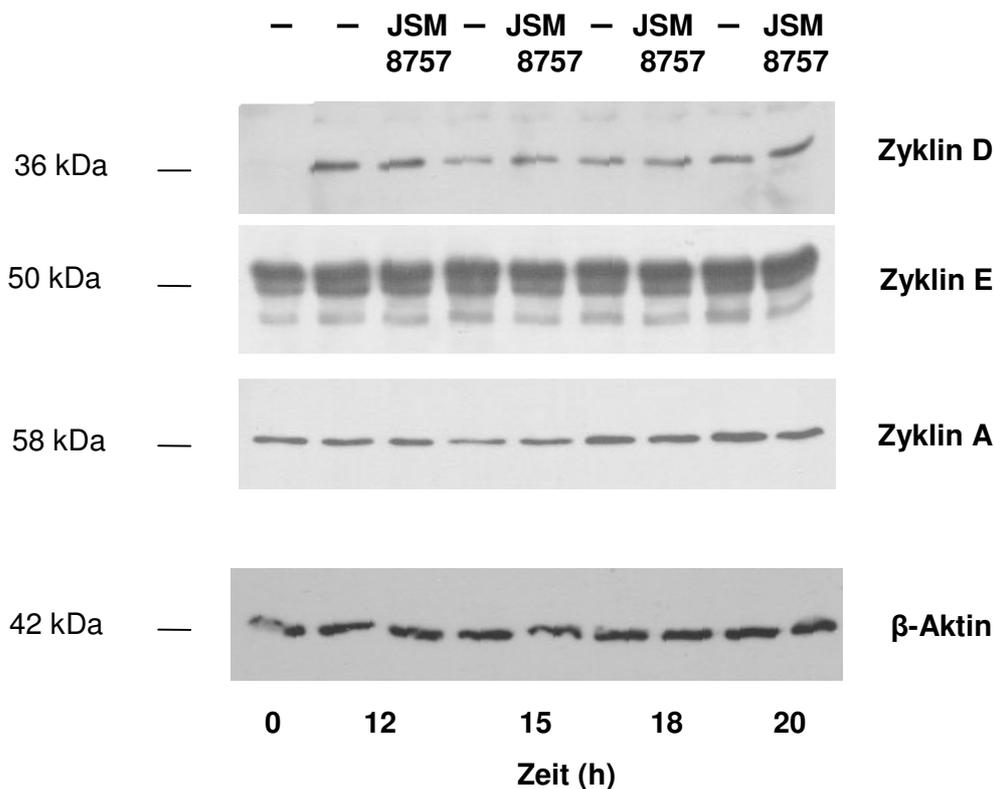


**Abbildung 3.20: Verzögerte G1/ S-Progression in QGP-1 Zellen durch den  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitor JSM8757**

FACS-Analyse, die das Durchlaufen einer Zellzyklusrunde in den synchronisierten QGP-1 Zellen mit- bzw. ohne JSM8757 Behandlung verfolgt (Zeitpunkte: 0 h, 12 h, 15 h, 18 h, 20 h/ G1-Synchronisation durch einen 36-stündigen FCS-Entzug). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.7.1 JSM8757 verringert in G1-synchronisierten QGP-1-Zellen die Expression von Zyklin A und Zyklin B

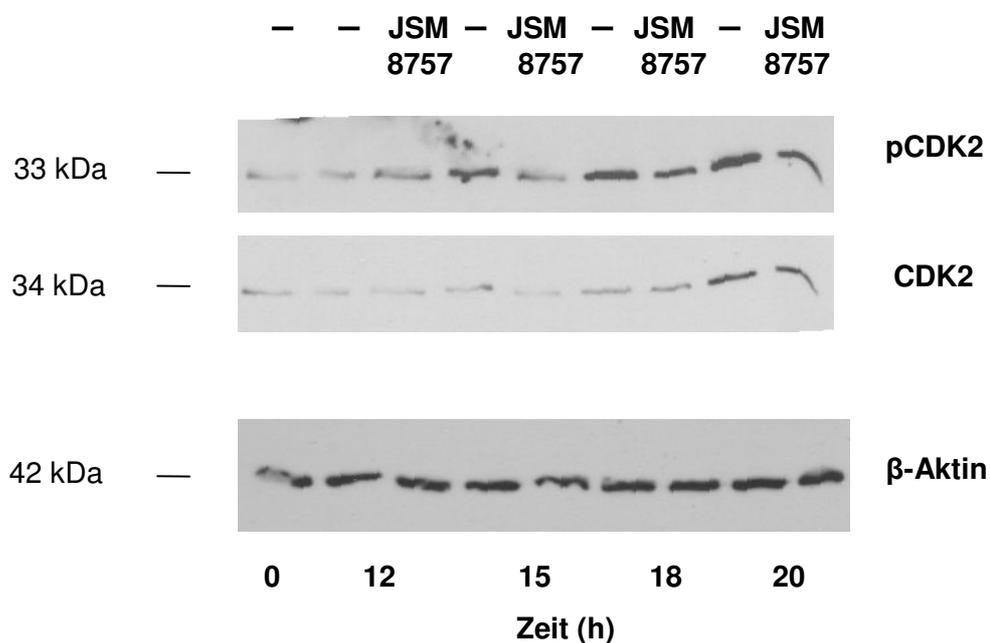
Zunächst wurden wieder die G1 /S-Zykline D, E und A untersucht. Das Fehlen von Zyklin D zum Zeitpunkt 0h entsprach dem ruhenden Zustand der Zellen während des FCS-Entzugs (s. **Abbildung 3.21**). Zu allen späteren Zeitpunkten war Zyklin D nachweisbar, jedoch durch JSM8757 nicht reguliert. Zyklin E zeigte keine zellzyklusabhängige Regulation, während eine Induktion von Zyklin A in den Kontrollzellen nach 18 Stunden auftrat. Zu dem letzten Zeitpunkt (20 h) wurde diese durch JSM8757-Gabe leicht abgeschwächt.



**Abbildung 3.21: Verringerung der Zyklin A-Expression in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen nach JSM8757-Gabe**

Western-Blots zur Immunodetektion der Zykline D, E und A. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

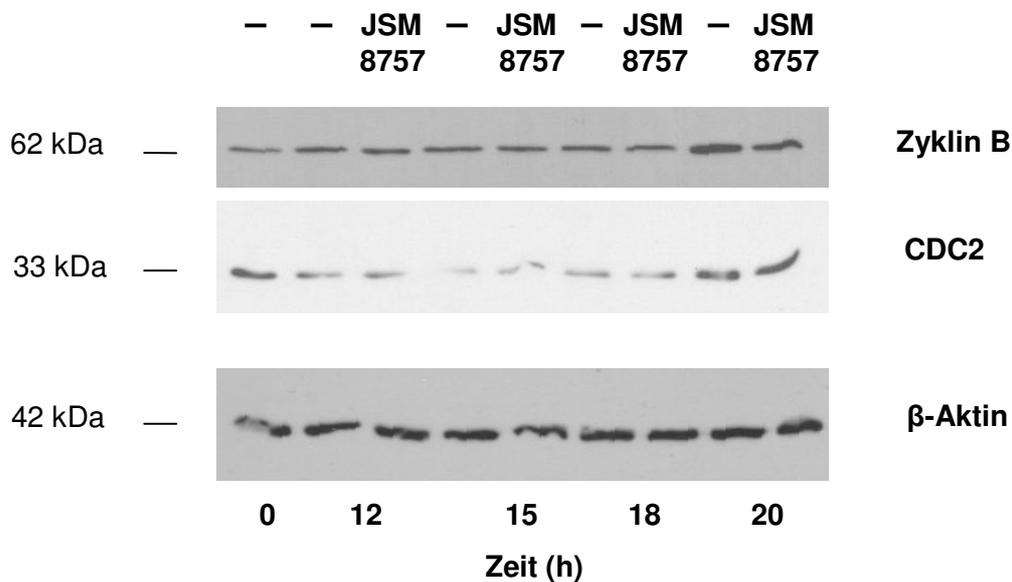
Anschließend wurden wie in BON Zellen Western-Blots zur Detektion des Zyklin A-Komplexpartners CDK2 bzw. pCDK2 (die phosphorylierte, aktivierte Proteinform) angefertigt (**s. Abbildung 3.22**). Unsere Ergebnisse zeigten eine Reduktion der pCDK2-Expression in den behandelten Zellen zu den späteren Zeitpunkten. Ferner wurde eine zeit- aber nicht inhibitorabhängige CDK2-Regulation beobachtet, indem dieses Protein zu den späteren Zeitpunkten insgesamt vermehrt in der aktivierten Form zu finden war.



**Abbildung 3.22: Verminderung der pCDK2-Expression in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen nach JSM8757-Gabe**

Western-Blots zur Immunodetektion von CDK2 sowie des Phospho-Epitopes der an Thr 160 phosphorylierten Form. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Das der G2/ M Phase zugeordnete Zyklin B mit seiner katalytischen Untereinheit CDC2 wurden als Nächstes untersucht. Zyklin B wurde zum Zeitpunkt 0 h aufgrund der G1-Synchronisation nur schwach exprimiert. Eine deutliche Erhöhung der Zyklinexpression in den Kontrollzellen wurde erst bei 20 h beobachtet. Im Vergleich zeigte sich die Zyklin B-Expression in den mit JSM8757 behandelten Zellen zu diesem Zeitpunkt verringert. CDC2 wurde vermehrt bei 20 h exprimiert, eine inhibitorspezifische Regulation war jedoch nicht zu sehen (s. **Abbildung 3.23**).

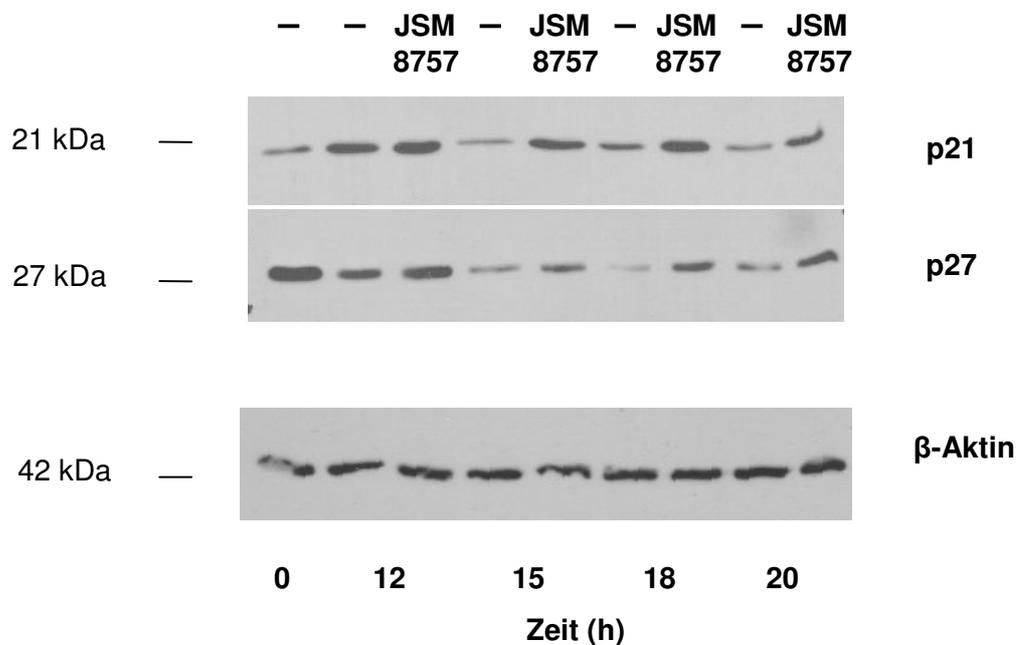


**Abbildung 3.23: Verminderung der Zyklin B-Expression in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen nach JSM8757-Gabe**

Western-Blots zur Immunodetektion von Zyklin B und CDC2. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.7.2 JSM8757 bewirkt eine starke Erhöhung der CKI-Expression in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen

Anschließend erfolgte die Evaluation der CKI-Expression. Infolge der G1-Synchronisation wurde bei 0 h das besonders beim G1/ S-Übergang aktive p21 nur schwach, während der G1-CKI p27 stark exprimiert wurde (**s. Abbildung 3.24**). Ferner zeigte sich eine Verminderung der CKI-Expression in den Kontrollzellen im zeitlichen Verlauf. Die behandelten Zellen demonstrierten hingegen eine starke Hochregulation beider Zellzyklusinhibitoren zu jedem gemessenen Zeitpunkt.

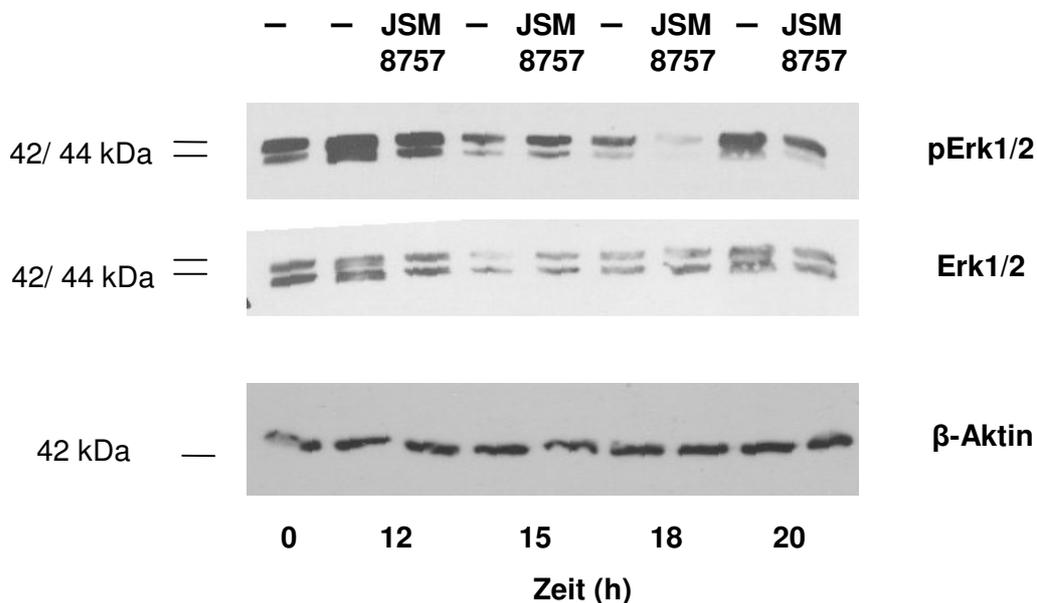


**Abbildung 3.24: Starke Erhöhung der CKI-Expression in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen nach JSM8757-Gabe**

Western-Blots zur Immunodetektion von p21 und p27. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.7.3 JSM8757 verzögert die pErk-Induktion in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen

Als Nächstes wurden Western-Blot-Analysen zur Detektion von Erk1/2 bzw. pErk1/2 (die phosphorylierte, aktivierte Proteinform) durchgeführt. Erk1/2 sind upstream von Zyklin D lokalisierte Proteinkinasen. Der pErk Antikörper ist gegen die Phosphoepitope der an Threonin 202 und Tyrosin 204 doppelphosphorylierten Form gerichtet. Unsere Ergebnisse demonstrierten eine deutliche Verminderung der pErk-Menge bei 18 h und 20 h in den behandelten Zellen (**s. Abbildung 3.25**).



**Abbildung 3.25: Verminderte Erk-Aktivierung in G1-synchronisierten QGP-1 Zellen nach JSM8757-Gabe**

Western-Blots zur Immunodetektion von Erk1/2 sowie der Phosphoepitope der an dem Thr 202 und Tyr 204 doppelphosphorylierten Form. Synchronisierte Zellen waren für die angegebenen Zeiträume mit Serum stimuliert worden, wobei entweder Inhibitor oder Vehikel zugesetzt wurde (links die jeweiligen Molekulargewichte in kDa; „-“ steht für nicht behandelte Zellen; die angewendete Inhibitorkonzentration war 100  $\mu$ M). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Innovative Therapieansätze bei NETs durch „Targeted Therapies“

Unser zunehmendes Verständnis der NET Biologie eröffnet die Perspektive, gezielte, molekulare Therapieansätze zu entwickeln, die als Monotherapie oder in Kombination mit etablierten Therapien wie beispielsweise den Somatostatinanaloga oder mit „konventionellen“ Chemotherapeutika eine effektivere Tumorbekämpfung gewährleisten könnten.

Zwei kürzlich veröffentlichte, placebokontrollierte, multizentrische Phase III Studien untersuchten mit dem Multikinaseinhibitor Sunitinib und dem mTOR Inhibitor Everolimus die Effekte solcher gezielter, molekularer Therapieansätze an Patienten mit fortgeschrittenen pankreatischen NETs [31] [32]. Beide Substanzen haben sich als effektive Therapien bewährt, auch bei Patienten bei denen andere Behandlungsmöglichkeiten versagten [33].

Die neuen, molekular definierten Therapieansätze eröffnen gegenwärtig ein neues Kapitel in der NET Therapie. Zu diesem neuen, spannenden Feld könnten zukünftig ebenfalls Integrin-Inhibitoren beitragen.

### 4.2 Darstellung und Beurteilung der Ergebnisse

#### 4.2.1 Dualer therapeutischer Ansatz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die biologischen Effekte des SMI  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitors JSM8757 auf zwei gut etablierte, humane NET Zelllinien charakterisiert. Im Hinblick auf die inzwischen gut belegte antiangiogene Wirkung von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitoren sowie die mehrmals dokumentierte Überexpression von  $\alpha_5\beta_1$  in Tumorendothelien [80;98;102;103] erscheint JSM8757 bei NETs, die typischerweise außerordentlich gut vaskularisiert sind, als ein vielversprechender therapeutischer Ansatz. Da im Rahmen eigener Vorarbeiten eine Expression dieses Integrins an NET Zelllinien nachgewiesen wurde [115], bearbeiteten wir hier die Frage, ob JSM8757

zusätzlich direkte Effekte an den Zellen auslösen könnte. Somit würde der Integrininhibitor einen Wirkstoff darstellen, der NETs potentiell sowohl auf zellulärem Niveau als auch via antiangiogene Wirkmechanismen bekämpft.

#### **4.2.2 Expression des FN-Rezeptors in NET Zelllinien**

Initiale Experimente bestätigten die zuvor beobachtete Expression des FN-Rezeptors an den aktuell verwendeten Zellkulturen, wobei das Expressionsniveau an QGP-1 Zellen im Vergleich zu BON Zellen geringfügig erhöht war (**s. Kapitel 3.1**). Gegenüber HUVECs oder Tumorendothelzellen ist die Expression des FN-Rezeptors allerdings in beiden Zelllinien deutlich niedriger (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.3 Inhibition von Adhäsion und Proliferation in NET Zelllinien durch JSM8757**

Nach der Bestätigung der Expression des FN-Rezeptors stellte sich die Frage nach direkten biologischen Effekten von JSM8757 an NET Zellen. Wir untersuchten zunächst Adhäsion und Proliferation, da sie zu den Zellfunktionen gehören, die wesentlich durch Integrine und auch speziell durch  $\alpha_5\beta_1$  reguliert werden.

JSM8757 war in der Lage die Adhäsion in BON und QGP-1 Zellen dosisabhängig zu hemmen (**s. Kapitel 3.2.1-3.2.2**). Zudem bewirkte der Integrininhibitor eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung unter adhärennten Bedingungen in beiden NET Zelllinien (**s. Kapitel 3.2.3-3.2.4**). Diese Ergebnisse belegen zunächst eine relevante biologische Funktion des FN-Rezeptors in NET Zellen, da durch einen Inhibitor in zwei unterschiedlichen Tumorzelllinien ausgeprägte Effekte ausgelöst wurden. Zudem wird die gute Wirksamkeit des Inhibitors demonstriert, der die Adhäsion hier um mehr als 75% reduzierte.

Interessanterweise wurden ähnliche Ergebnisse von einer Studie geliefert, welche die biologischen Effekte des  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitors SJ749 an zwei Astrozytoma-Zelllinien (A172, U87) untersuchte [95]. SJ749 zeigte eine dosisabhängige Adhäsionshemmung in beiden getesteten Zelllinien. Die Inhibition war in A172 Zellen stärker ausgeprägt, die eine niedrigere  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Expression aufweisen. Das stellt einen linearen Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin und dem biologischen Effekt des Inhibitors in Frage. Mögliche Erklärungsansätze könnten in

einem modifizierten inside-out signaling, einer veränderten Glykosylierung und Funktionalität des Integrins oder in zelllinientypischen Unterschieden in der intrazellulären Weiterleitung und Weiterverarbeitung des Signals liegen. Analog zu unseren Befunden mit JSM8757 wurde ferner im Rahmen der Experimente mit SJ749 auch eine Verminderung der Proliferation in beiden Tumorzelllinien unter adhärennten Bedingungen dargestellt [95].

Die o.g. Daten mit beiden kleinmolekularen Integrininhibitoren ergänzen sich weiter mit den Ergebnissen aus *in vitro* Versuchen mit Voloxicimab, einem chimären, monoklonalen, gegen den FN-Rezeptor gerichteten Antikörper, der ebenfalls eine Wachstumsinhibition in einer Reihe von Tumorzelllinien bewirkte [116].

#### 4.2.4 Effekt auf Apoptose und Anoikis

Für die weitere Abklärung der direkten antiproliferativen Effekte an BON und QGP-1 Zellen überprüften wir inwiefern Apoptose einen Beitrag zu diesen Phänomenen leistet. Apoptoseinduktion durch funktionelle Inhibition von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin wurde bereits in der Literatur beschrieben, allerdings nur für Tumorendothelzellen [98;102;103], welche eine erheblich höhere Expression des FN-Rezeptors als die NET Zellen aufweisen.

Die durchgeführten JC-1 Assays belegten jedoch weder bei BON noch bei QGP-1 Zellen eine Apoptoseinduktion unter adhärennten Bedingungen nach JSM8757-Gabe (**s. Kapitel 3.3**). Integrininhibition verursachte vielmehr unter substratfreien (Anoikis-) Bedingungen eine Apoptoseverminderung bei QGP-1 Zellen (**s. Kapitel 3.4**). Dies lässt sich möglicherweise anhand der Tatsache erklären, dass unligierte Integrine proapoptotisch Signale initiieren können (**s. Kapitel 1.2.3**), ein Phänomen das durch die Besetzung des FN-Rezeptors mit JSM8757 offenbar wesentlich reduziert wird. Grundsätzlich wird angenommen, dass durch Intergrinengagement nicht nur assoziierte Kinasesignalwege (z.B. FAK, ILK) aktiviert werden, sondern auch die intrazelluläre Verteilung sowie Clustering und Aktivierung von Todesrezeptoren gesteuert werden. Intergrinengagement unterdrückt dabei Clustering und Aktivierung. Inwieweit Integrininhibitoren wie JSM8757 dies beeinflussen ist nicht bekannt, die Daten an QGP-1 Zellen werfen aber die Frage auf, ob JSM8757 diese Aktivierung nicht ebenso unterdrückt wie der Agonist Fibronectin. Bei BON Zellen, welche unter substratfreien Bedingungen eine deutlich niedrigere Apoptoserate als QGP-1 Zellen aufweisen (**s. Kapitel 3.4**), war erwartungsgemäß keine signifikante Reduktion des programmierten

Zelltods nach JSM8757-Gabe zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen der Studie mit SJ749 wurde ebenfalls substratunabhängiges Wachstum mit Hilfe von Klonogenitätsassays geprüft, die entweder in Anwesenheit vom Vehikel oder von der Testsubstanz durchgeführt wurden. Es zeigte sich eine inhibitorinduzierte Wachstumshemmung, indem SJ749 eine Reduktion der Zahl der formierten Kolonien bewirkte. Im Vergleich zu den Kontrollen war dieser Effekt am deutlichsten bei Zelllinien, die eine höhere  $\alpha_5$ -Expression aufweisen [95]. Der scheinbare Widerspruch dieser Ergebnisse zu unseren Beobachtungen lässt sich aber möglicherweise auflösen, wenn die unterschiedlichen Untersuchungsverfahren berücksichtigt werden. Klonogenitätsassays stellen keine reinen Apoptoseassays dar, sondern erlauben die Ermittlung adhäsionsunabhängigen Zellwachstums, indem sie mehrere Komponenten erfassen. Faktoren außer Apoptoseinduktion, wie beispielsweise Inhibition von Proliferation, können nämlich ebenfalls zu einer Inhibition der Koloniebildung führen.

#### **4.2.5 JSM8757 inhibiert die Zellzyklusprogression in BON und QGP-1 Zellen durch eine verzögerte G1/ S-Progression**

Der Ausschluss von Apoptose als Ursache der Wachstumsinhibition von NET Zellen durch JSM8757 ließ die Frage nach dem antiproliferativen Wirkmechanismus offen. Mit Hilfe von Zellzyklusanalysen nicht synchronisierter Zellen versuchten wir Zellzyklusumverteilungen zu identifizieren, welche die Wirkung des Inhibitors erklären könnten (**s. Kapitel 3.5**). Solche Veränderungen waren jedoch erst erkennbar, nachdem wir bei den Zellen eine G1-Synchronisation mittels FCS-Entzug durchgeführt hatten. Unsere Ergebnisse zeigten, dass JSM8757 den Übergang in die S-Phase in beiden Zelllinien verzögerte (**s. Kapitel 3.6-3.7**). Die im Anschluss daran durchgeführten Western-Blots ermöglichten, die zugrundeliegenden Wirkmechanismen molekular weiter einzugrenzen. In BON Zellen war eine verzögerte Zyklin A-Induktion in den behandelten Zellen zu sehen. Andere G1- und S-Phase-Zykline (Zykline D, E) sowie CDK2 waren nicht reguliert. Zusätzlich wurde eine starke Inhibition der Zyklin B-Induktion samt einer leichten Hinunterregulation seiner katalytischen Untereinheit CDC2 nach JSM8757-Gabe festgestellt (**s. Kapitel 3.6.1**).

Angesichts der fundamentalen Rolle von Zyklin A beim G1/ S-Übergang, bietet die verzögerte Induktion dieses Moleküls eine gute Erklärungsmöglichkeit für den antiproliferativen Effekt des Integrininhibitors. Zudem legt die Blockade der

zellzyklusabhängigen Induktion von Zyklin A, wie sie in den Kontrollzellen beobachtet wird, nahe, dass Integrin-Signaling auch in NET-Zellen für den Zellzyklus und seine Progression von zentraler Bedeutung ist.

Hinsichtlich der Hinunterregulation beider Komponenten des Zyklin B/ CDC2-Komplexes, erscheint eine sekundäre Regulation als Folge der G1 Inhibition naheliegend. Weniger plausibel erscheint dagegen die Betrachtung der Zyklin B-Inhibition als einen G1-unabhängigen Effekt von JSM8757.

Eine leichte Regulation von Zyklin A war ebenfalls in den Western-Blots mit QGP-1 Zellen zu sehen. Neben der schwachen Induktionsverzögerung dieses Zyklins wurde zusätzlich eine verminderte Expression der aktivierten Form seiner katalytischen Untereinheit (pCDK2) detektiert. Andere G1- und S-Phase-Zykline (Zykline D, E) waren nicht reguliert, allerdings lag eine leichte Hinunterregulation von Zyklin B in den behandelten Zellen vor (**s. Kapitel 3.7.1**).

Die Inhibitoreffekte auf Zyklin A und pCDK2 stimmen mit dem verzögerten G1/ S-Übergang überein, der in der Zeitverlaufsanalyse mit QGP-1 Zellen beobachtet wurde. Ferner wurde angesichts der Zyklin A-Induktion in den Kontrollen die zellzyklusspezifische Rolle des integrinvermittelten Signalings in einer zweiten NET Zelllinie belegt.

Die Zyklin B-Hinunterregulation ist, analog zu der BON Zelllinie, am ehesten als Folge der G1 Inhibition einzuordnen.

In QGP-1 Zellen identifizierten wir auch einen zweiten Wirkmechanismus in Form einer starken Zunahme von CKIs in den behandelten Zellen (**s. Kapitel 3.7.2**). Da Integrin-Signaling die Degradation von CKIs steigern kann [76], wäre es möglich den beobachteten Effekt als Ausdruck der Hemmung dieser Degradation durch JSM8757 zu deuten. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit könnte mit der ebenfalls in behandelten QGP-1 Zellen beobachteten Verminderung der Erk-Aktivität zusammenhängen (**s. Kapitel 3.7.3**). Erk-Aktivierung kann zur Reduktion von p21 und p27 führen [117], sodass die verminderte bzw. verzögerte Aktivierung der Erk-Kaskade durch den Integrininhibitor die verstärkte Präsenz von CKIs erklären könnte.

In BON Zellen wurde hingegen keine Regulation von CKIs beobachtet (**s. Kapitel 3.6.2**). Der wesentlichen Abweichung hinsichtlich der Inhibitorwirkung auf die beiden Zellzyklusinhibitoren könnten mehrere Ursachen zugrunde liegen. Das Fehlen von Rb bei QGP-1 Zellen [118] impliziert eine verstärkte Funktion alternativer Kontrollmechanismen des G1/ S-Übergangs, wozu auch CKIs gehören. Eine

unterschiedliche p53-Menge könnte einen weiteren Faktor darstellen. So weisen QGP-1 Zellen eine viel stärkere p53-Expression als BON Zellen auf, obwohl keine Mutationen beobachtet wurden [119]. Da p53 als zentraler Regulator der p21-Transkription fungiert, ist vorstellbar, dass p21 in QGP-1 Zellen in besonderer Weise zur Kontrolle der Zellzyklusprogression beiträgt.

Schließlich wurde durch JSM8757 eine Abschwächung und Verzögerung der seruminduzierten Aktivierung von Erk1/2 in QGP-1 Zellen ausgelöst (**s. Kapitel 3.7.3**). Erk-Kinasen gehören einerseits zu den gut etablierten proximalen Signalmolekülen der Integrinsignaltransduktion, andererseits ist ihre Beteiligung an der transkriptionellen Regulation der Zyklinexpression, z.B. Zyklin D, überzeugend belegt (**s. Kapitel 1.2.5**). Dieser Zusammenhang ist aber möglicherweise in den verwendeten Tumorzelllinien durch alternative onkogene Mechanismen der Zyklin D-Regulation gelockert, die Zyklin D-Menge war hier nicht verändert (**s. Kapitel 3.7.1**). Weiterhin repräsentieren Erk-Kinasen ein facettenreiches Funktionsfeld mit Beteiligung auch an anderen Zellvorgängen wie Adhäsion [120], welches ihnen eine Wechselwirkung mit Molekülen verschiedener Signalkaskaden erlaubt.

## 4.3 Ausblick

### 4.3.1 Untersuchung der $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Expression in weiteren NET Zelllinien

Die Adhäsions- und Proliferationshemmung sowie die Verzögerung des Zellzyklus durch die Verlangsamung der G1/ S-Progression in zwei unterschiedlichen NET Zelllinien sind klare Indizien für die *in vitro* Wirksamkeit des  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitors JSM8757. Inwiefern sich diese Ergebnisse auf die klinische Situation übertragen lassen ist unklar und wird entscheidend auch davon abhängen, in welchem Umfang eine Expression des FN-Rezeptors in einem breiten Spektrum NET Zelllinien vorliegt. Hierzu sind bisher noch keine systematischen Daten erhoben worden, was nicht zuletzt an dem Mangel an gut charakterisierten NET Zelllinien liegt [121].

Der nächste Schritt zur Evaluierung des möglichen Einsatzes von JSM8757 würde daher in einer umfangreichen Untersuchung des Expressionsmusters von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin an klinischen NET Proben bestehen. Eine solche Analyse könnte dann erste Hinweise liefern, inwiefern JSM8757 bei mehreren NETs antiproliferativ wirksam sein könnte.

Außerdem wird der Nachweis von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin in Immun- [122;123] und in Bindegewebszellen [124], kombiniert mit der bereits erwähnten hohen Expression in Endothel- sowie in Lymphendothelzellen [89;91], besonders spannend angesichts neuer Erkenntnisse über den entscheidenden Einfluss, den das sog. „tumor microenvironment“ auf die Karzinogenese ausüben sollte [125]. Diese Zellen der Tumormikroumgebung wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Immunzellen sowie Fibroblasten verhalten sich nicht unbedingt ausschließlich „passiv“ gegenüber Tumorzellen, sondern sind imstande, sich zusätzlich „aktiv“ an der Tumorprogression zu beteiligen. Sie könnten beispielsweise mitbestimmen, ob dysfunktionelle Epithelzellen weiter wachsen und eventuell invasiv werden oder sich einfach zu bedeutungslosen Mikrohyperplasien entwickeln [125].

#### **4.3.2 *In vivo* Experimente im BON orthotopen Mausmodell**

Ein wesentlicher Schritt wäre dann die *in vivo* Evaluierung der funktionellen Inhibition des FN-Rezeptors. Die BON orthotopen pankreatischen Tumoren stellen ein gut etabliertes Mausmodell dar [110], das sich für diesen Zweck eignet. *In vivo* Daten zur JSM8757-Pharmakodynamik sowie Therapiestudien in subkutanen Xenograft-Modellen anderer Tumorentitäten (persönliche Mitteilung C. Christner), lassen eine solche *in vivo* Evaluierung möglich erscheinen. Bisher liegen keine Ergebnisse im Sinne eines Therapieversuchs im orthotopen Modell vor. Allerdings zeigen erste Imaging-Untersuchungen mit einem strukturell verwandten  $\alpha_5\beta_1$  Inhibitor eine spezifische Signalanreicherung in subkutanen BON Tumoren (persönliche Mitteilung Dr. Petra Schulz). Ob hierzu neben Tumorgefäßen auch eine Bindung an  $\alpha_5\beta_1$  Integrin auf den Tumorzellen beiträgt, bleibt zu klären.

## 4.4 Fazit

Zusammenfassend zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine funktionelle Inhibition des FN-Rezeptors  $\alpha_5\beta_1$  Integrin durch JSM8757 in NET Zellen. JSM8757 hemmte in zwei gut charakterisierten, humanen NET Zelllinien (BON und QGP-1) zwei wesentlich tumorbiologische Zellfunktionen, Adhäsion und Proliferation. Nachdem wir Apoptose als Ursache der antiproliferativen Effekte ausgeschlossen hatten, demonstrierten beide Tumorzelllinien nach G1-Synchronisation einen verzögerten G1/ S-Übergang. In BON Zellen korrelierte die Wachstumsinhibition mit einer verzögerten Zyklin A-Induktion, während in QGP-1 Zellen eine starke Induktion der CKIs p21 und p27 der Wachstumsinhibition voranging. Vor dem Hintergrund der biologischen Eigenarten von NETs (gute Vaskularisierung, molekulare Heterogenität, relativ langsame Progression), könnte sich die Kombination der direkten Effekte an NET Tumorzellen zusammen mit der vorbeschriebenen antiangiogenen Wirkung von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitoren [80;98;102;103] als erfolgversprechend erweisen.

Eine Reihe von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitoren wurde bis heute gegen eine Vielzahl von Tumoren präklinisch getestet [80;95;102;116]. Mittlerweile wurden mit den Inhibitoren Volociximab und ATN-161 auch klinische Phase II bzw. Phase I Studien abgeschlossen [127;128]. Die weitere Untersuchung des Expressionsmusters von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin in NETs sowie die *in vivo* Evaluierung des Integrininhibitors im etablierten Mausmodell von BON orthotopen pankreatischen Tumoren werden die ersten Anhaltspunkte liefern, ob die vielversprechenden Eigenschaften von JSM8757 in einen neuen therapeutischen Ansatz gegen NETs umgewandelt werden könnten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Neuroendokrine Tumoren (NETs) konstituieren eine relativ seltene Gruppe von Neoplasien, die am häufigsten im Gastrointestinaltrakt entstehen. Die Operation stellt die einzige kurative Option dar, während in der palliativen Therapie neben der Unterdrückung der Hypersekretionssyndrome die Kontrolle des Tumorwachstums als Hauptziel gilt. Angesichts der biologischen Merkmale von NETs (hohe Vaskulasierung, molekulare Heterogenität, langsame Progression) könnte sich eine Therapie, die direkte Effekte an den Tumorzellen mit antiangiogener Wirkung kombiniert, als erfolgversprechend erweisen. Im Rahmen dieser Studie charakterisierten wir die biologischen Effekte des  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-Inhibitors JSM8757 in zwei gut etablierten humanen NET Zelllinien (BON, QGP-1). Integrine sind transmembranäre Heterodimere und bilden eine Familie von zellulären EZM-Rezeptoren.  $\alpha_5\beta_1$  Integrin fungiert als Fibronectinrezeptor und nimmt somit an vielen zellulären Funktionen teil. Zudem gibt es gute präklinische Evidenz für antiangiogene Effekte infolge Antagonisierung von  $\alpha_5\beta_1$  Integrin. In NET Zelllinien verminderte die Inhibition des Fibronectinrezeptors die Adhäsion und Proliferation, ohne dass eine Induktion von Apoptose beobachtet wurde. Die Zellzyklusanalysen an G1-synchronisierten Zellkulturen ergaben eine Inhibition der Zellzyklusprogression infolge eines verzögerten G1/ S-Übergangs. Mittels Western-Blot-Analysen untersuchten wir weiter nach JSM8757-induzierten Modifikationen in der Expression von Zellzyklusmolekülen. Als wichtigste Effekte fanden sich eine Inhibition der Zyklin A-Induktion in BON Zellen und eine starke Erhöhung der Expression der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 in QGP-1 Zellen. Zusammenfassend stellt die Inhibition des Fibronectinrezeptors  $\alpha_5\beta_1$  Integrin einen attraktiven Therapieansatzpunkt in NET Zellen dar.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Hofslie E: Genes involved in neuroendocrine tumor biology. *Pituitary* 25-9-2006.
- [2] Modlin IM, Lye KD, Kidd M: A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 15-2-2003;97:934-959.
- [3] Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, Latich I, Modlin IM: The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer* 1-12-2005;104:2292-2309.
- [4] Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle FG, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruszniewski P, Sundin A: Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 2008;9:61-72.
- [5] Groetzinger C: Tumour biology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology* 2004;80 Suppl 1:8-11.
- [6] Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Shapiro MD: Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* 2005;128:1717-1751.
- [7] Herold G: *Innere Medizin - Eine vorlesungsfreie Darstellung*. Cologne, G. Herold, 2005.
- [8] Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B: TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006;449:395-401.
- [9] Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B: TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2007;451:757-762.
- [10] Hemminki K, Li X: Incidence trends and risk factors of carcinoid tumors: a nationwide epidemiologic study from Sweden. *Cancer* 15-10-2001;92:2204-2210.
- [11] Ramage JK, Davies AH, Ardill J, Bax N, Caplin M, Grossman A, Hawkins R, McNicol AM, Reed N, Sutton R, Thakker R, Aylwin S, Breen D, Britton K, Buchanan K, Corrie P, Gillams A, Lewington V, McCance D, Meeran K, Watkinson A: Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours. *Gut* 2005;54 Suppl 4:iv1-16.
- [12] Babovic-Vuksanovic D, Constantinou CL, Rubin J, Rowland CM, Schaid DJ, Karnes PS: Familial occurrence of carcinoid tumors and association with other malignant neoplasms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:715-719.
- [13] Kumar V CRRS: in *Basic pathology*: Philadelphia, W.B. Saunders, 1997.
- [14] Lindor NM, Greene MH: The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst* 15-7-1998;90:1039-1071.
- [15] Monson JP: The epidemiology of endocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:29-36.
- [16] Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA, Jr., Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N: DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 4-3-2011;331:1199-1203.

- [17] Oberg K, Jelic S: Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008;19 Suppl 2:ii104-ii105.
- [18] Modlin IM, Champaneria MC, Chan AK, Kidd M: A three-decade analysis of 3,911 small intestinal neuroendocrine tumors: the rapid pace of no progress. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1464-1473.
- [19] Mansour JC, Chen H: Pancreatic endocrine tumors. *J Surg Res* 2004;120:139-161.
- [20] Plockinger U, Wiedenmann B: Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Management of metastatic endocrine tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:553-576.
- [21] Strosberg JR, Kvols LK: A review of the current clinical trials for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16:219-224.
- [22] Di BM, Bajetta E, Zilembo N, de BF, Di LA, Verusio C, D'Aprile M, Scanni A, Barduagni M, Barduagni A, .: Treatment of carcinoid syndrome with recombinant interferon alpha-2a. *Acta Oncol* 1993;32:235-238.
- [23] Dirix LY, Vermeulen PB, Fierens H, De SB, Corthouts B, Van Oosterom AT: Long-term results of continuous treatment with recombinant interferon-alpha in patients with metastatic carcinoid tumors--an antiangiogenic effect? *Anticancer Drugs* 1996;7:175-181.
- [24] Jacobsen MB, Hanssen LE, Kolmannskog F, Schrupf E, Vatn MH, Bergan A: Interferon-alpha 2b, with or without prior hepatic artery embolization: clinical response and survival in mid-gut carcinoid patients. The Norwegian carcinoid study. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:789-796.
- [25] Oberg K, Norheim I, Alm G: Treatment of malignant carcinoid tumors: a randomized controlled study of streptozocin plus 5-FU and human leukocyte interferon. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25:1475-1479.
- [26] Schnirer II, Yao JC, Ajani JA: Carcinoid--a comprehensive review. *Acta Oncol* 2003;42:672-692.
- [27] Oberg K, Kvols L, Caplin M, Delle FG, de HW, Rindi G, Ruzniewski P, Woltering EA, Wiedenmann B: Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Ann Oncol* 2004;15:966-973.
- [28] Pavel ME, Baum U, Hahn EG, Schuppan D, Lohmann T: Efficacy and tolerability of pegylated IFN-alpha in patients with neuroendocrine gastroenteropancreatic carcinomas. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:8-13.
- [29] Knox CD, Feurer ID, Wise PE, Lamps LW, Kelly WJ, Chari RS, Lee GD, Wright PC: Survival and functional quality of life after resection for hepatic carcinoid metastasis. *J Gastrointest Surg* 2004;8:653-659.
- [30] Sarmiento JM, Heywood G, Rubin J, Ilstrup DM, Nagorney DM, Que FG: Surgical treatment of neuroendocrine metastases to the liver: a plea for resection to increase survival. *J Am Coll Surg* 2003;197:29-37.
- [31] Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Horsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van CE, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzniewski P: Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 10-2-2011;364:501-513.
- [32] Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van CE, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Oberg K: Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 10-2-2011;364:514-523.
- [33] Jensen RT, Delle FG: Promising advances in the treatment of malignant pancreatic endocrine tumors. *N Engl J Med* 10-2-2011;364:564-565.

- [34] Gilcrease MZ: Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* 8-3-2007;247:1-25.
- [35] Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 20-9-2002;110:673-687.
- [36] de Melker AA, Sonnenberg A: Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays* 1999;21:499-509.
- [37] van der FA, Sonnenberg A: Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001;305:285-298.
- [38] Sastry SK, Horwitz AF: Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:819-831.
- [39] Eble JA: Collagen-binding integrins as pharmaceutical targets. *Curr Pharm Des* 2005;11:867-880.
- [40] Eliceiri BP, Cheresh DA: The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999;103:1227-1230.
- [41] Gullberg DE, Lundgren-Akerlund E: Collagen-binding I domain integrins--what do they do? *Prog Histochem Cytochem* 2002;37:3-54.
- [42] Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA: The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 4-8-2000;275:23409-23412.
- [43] Heino J: The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol* 2000;19:319-323.
- [44] Horton MA: Laminin isoforms and their integrin receptor; in *Adhesion receptors as therapeutic targets*: 1996, pp 09-36.
- [45] Nievers MG, Schaapveld RQ, Sonnenberg A: Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol* 1999;18:5-17.
- [46] Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW: Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 21-7-2000;275:21785-21788.
- [47] Leahy DJ, Aukhil I, Erickson HP: 2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell* 12-1-1996;84:155-164.
- [48] Pytela R, Pierschbacher MD, Argraves S, Suzuki S, Ruoslahti E: Arginine-glycine-aspartic acid adhesion receptors. *Methods Enzymol* 1987;144:475-489.
- [49] Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH: Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 20):3563-3571.
- [50] Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG: A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 4-9-1998;94:625-634.
- [51] Hughes PE, az-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, Ginsberg MH: Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* 22-3-1996;271:6571-6574.
- [52] O'Toole TE, Mandelman D, Forsyth J, Shattil SJ, Plow EF, Ginsberg MH: Modulation of the affinity of integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of alpha IIb. *Science* 8-11-1991;254:845-847.
- [53] O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH: Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 1994;124:1047-1059.

- [54] Tozer EC, Hughes PE, Loftus JC: Ligand binding and affinity modulation of integrins. *Biochem Cell Biol* 1996;74:785-798.
- [55] Hughes PE, Pfaff M: Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* 1998;8:359-364.
- [56] Betson M, Lozano E, Zhang J, Braga VM: Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 4-10-2002;277:36962-36969.
- [57] Weston C, Gordon C, Teressa G, Hod E, Ren XD, Prives J: Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *J Biol Chem* 21-2-2003;278:6450-6455.
- [58] Ichinose J, Murata M, Yanagida T, Sako Y: EGF signalling amplification induced by dynamic clustering of EGFR. *Biochem Biophys Res Commun* 19-11-2004;324:1143-1149.
- [59] Guo W, Giancotti FG: Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:816-826.
- [60] Friedl P, Wolf K: Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362-374.
- [61] Hood JD, Cheresch DA: Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002;2:91-100.
- [62] O'Brien LE, Jou TS, Pollack AL, Zhang Q, Hansen SH, Yurchenco P, Mostov KE: Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat Cell Biol* 2001;3:831-838.
- [63] Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-454.
- [64] Somasiri A, Howarth A, Goswami D, Dedhar S, Roskelley CD: Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 2001;114:1125-1136.
- [65] Troussard AA, Costello P, Yoganathan TN, Kumagai S, Roskelley CD, Dedhar S: The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene* 16-11-2000;19:5444-5452.
- [66] Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-656.
- [67] Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH: Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 17-4-2000;149:431-446.
- [68] Frisch SM, Francis H: Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-626.
- [69] Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA: Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 29-10-2001;155:459-470.
- [70] Zahir N, Lakins JN, Russell A, Ming W, Chatterjee C, Rozenberg GI, Marinkovich MP, Weaver VM: Autocrine laminin-5 ligates alpha6beta4 integrin and activates RAC and NFkappaB to mediate anchorage-independent survival of mammary tumors. *J Cell Biol* 22-12-2003;163:1397-1407.

- [71] Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS, Miranti CK: Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:8586-8599.
- [72] Schwartz MA, Ginsberg MH: Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 2002;4:E65-E68.
- [73] Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG: The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 15-11-1996;87:733-743.
- [74] Yamada KM, Miyamoto S: Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:681-689.
- [75] Assoian RK, Schwartz MA: Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:48-53.
- [76] Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 5-5-1995;81:323-330.
- [77] Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 9-8-1996;86:353-364.
- [78] Sheppard D: Endothelial integrins and angiogenesis: not so simple anymore. *J Clin Invest* 2002;110:913-914.
- [79] Varner J: in Goldberg laREM (ed): *Regulation of Angiogenesis*. Basel, Birkhauser Verlag , 1997, pp 361-390.
- [80] Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parry GC, Parikh AA, McCarty MF, Bucana CD, Mazar AP, Ellis LM: Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *Int J Cancer* 20-4-2003;104:496-503.
- [81] Hynes RO: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 27-2-1987;48:549-554.
- [82] Loeffler G, Petrides P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*, ed 7. Berlin, Springer Verlag, 2003.
- [83] Francis SE, Goh KL, Hodivala-Dilke K, Bader BL, Stark M, Davidson D, Hynes RO: Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1-6-2002;22:927-933.
- [84] Hynes RO: A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 2002;8:918-921.
- [85] Taverna D, Hynes RO: Reduced blood vessel formation and tumor growth in alpha5-integrin-negative teratocarcinomas and embryoid bodies. *Cancer Res* 1-7-2001;61:5255-5261.
- [86] Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA: Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 2000;156:1345-1362.
- [87] Kim S, Harris M, Varner JA: Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 27-10-2000;275:33920-33928.
- [88] Kim S, Bakre M, Yin H, Varner JA: Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. *J Clin Invest* 2002;110:933-941.
- [89] Zhang X, Groopman JE, Wang JF: Extracellular matrix regulates endothelial functions through interaction of VEGFR-3 and integrin alpha5beta1. *J Cell Physiol* 2005;202:205-214.
- [90] Varner JA, Emerson DA, Juliano RL: Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 1995;6:725-740.

- [91] Boudreau NJ, Varner JA: The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. *J Biol Chem* 6-2-2004;279:4862-4868.
- [92] Gong J, Wang D, Sun L, Zborowska E, Willson JK, Brattain MG: Role of alpha 5 beta 1 integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1997;8:83-90.
- [93] Han S, Ritzenthaler JD, Sitaraman SV, Roman J: Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 6-10-2006;281:29614-29624.
- [94] Livant DL, Brabec RK, Pienta KJ, Allen DL, Kurachi K, Markwart S, Upadhyaya A: Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma. *Cancer Res* 15-1-2000;60:309-320.
- [95] Maglott A, Bartik P, Cosgun S, Klotz P, Ronde P, Fuhrmann G, Takeda K, Martin S, Dontenwill M: The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res* 15-6-2006;66:6002-6007.
- [96] Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N: Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J* 2008;275:1939-1948.
- [97] Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM: ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 1995;131:275-278.
- [98] Trochon-Joseph V, Martel-Renoir D, Mir LM, Thomaidis A, Opolon P, Connault E, Li H, Grenet C, Fauvel-Lafeve F, Soria J, Legrand C, Soria C, Perricaudet M, Lu H: Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res* 15-3-2004;64:2062-2069.
- [99] Calvete JJ, Jurgens M, Marcinkiewicz C, Romero A, Schrader M, Niewiarowski S: Disulphide-bond pattern and molecular modelling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin alpha5beta1 antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. *Biochem J* 1-2-2000;345 Pt 3:573-581.
- [100] Oshikawa K, Terada S: Ussuristatin 2, a novel KGD-bearing disintegrin from *Agkistrodon ussuriensis* venom. *J Biochem (Tokyo)* 1999;125:31-35.
- [101] Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, Gomer CJ: Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res* 1-8-2000;60:4066-4069.
- [102] Schwarz MA, Kandel J, Brett J, Li J, Hayward J, Schwarz RE, Chappey O, Wautier JL, Chabot J, Lo GP, Stern D: Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells. *J Exp Med* 2-8-1999;190:341-354.
- [103] Umeda N, Kachi S, Akiyama H, Zahn G, Vossmeier D, Stragies R, Campochiaro PA: Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an alpha5beta1 integrin antagonist. *Mol Pharmacol* 2006;69:1820-1828.
- [104] Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., Thompson JC: The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors. *Ann N Y Acad Sci* 15-9-1994;733:393-406.
- [105] Townsend CM, Jr., Ishizuka J, Thompson JC: Studies of growth regulation in a neuroendocrine cell line. *Acta Oncol* 1993;32:125-130.
- [106] Kaku M, Nishiyama T, Yagawa K, Abe M: Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. *Gann* 1980;71:596-601.

- [107] Marshall CJ, Franks LM, Carbonell AW: Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1743-1751.
- [108] Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 16-12-1983;65:55-63.
- [109] Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Jr., Chen LB: Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1-5-1991;88:3671-3675.
- [110] Scholz A, Wagner K, Welzel M, Remlinger F, Wiedenmann B, Siemeister G, Rosewicz S, Detjen KM: The oral Multi-Target Tumour Growth Inhibitor<sup>TM</sup>, ZK 304709, inhibits growth of pancreatic neuroendocrine tumours in an orthotopic mouse model. *Gut* 1-10-2008.
- [111] Tas J, Westerneng G: Fundamental aspects of the interaction of propidium diiodide with nuclei acids studied in a model system of polyacrylamide films. *J Histochem Cytochem* 1981;29:929-936.
- [112] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 3-6-1991;139:271-279.
- [113] Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7-5-1976;72:248-254.
- [114] Weber K, Osborn M: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 25-8-1969;244:4406-4412.
- [115] Fischer C, Sanchez-Ruderisch H, Welzel M, Wiedenmann B, Sakai T, Andre S, Gabius HJ, Khachigian L, Detjen KM, Rosewicz S: Galectin-1 interacts with the  $\alpha 5 \beta 1$  fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J Biol Chem* 4-11-2005;280:37266-37277.
- [116] Bhaskar V, Fox M, Breinberg D, Wong MH, Wales PE, Rhodes S, Dubridge RB, Ramakrishnan V: Volociximab, a chimeric integrin  $\alpha 5 \beta 1$  antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits. *Invest New Drugs* 1-9-2007.
- [117] Giancotti FG, Tarone G: Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:173-206.
- [118] Huang L, Lang D, Geradts J, Obara T, Klein-Szanto AJ, Lynch HT, Ruggeri BA: Molecular and immunochemical analyses of RB1 and cyclin D1 in human ductal pancreatic carcinomas and cell lines. *Mol Carcinog* 1996;15:85-95.
- [119] Bartz C, Ziske C, Wiedenmann B, Moelling K: p53 tumour suppressor gene expression in pancreatic neuroendocrine tumour cells. *Gut* 1996;38:403-409.
- [120] Lee JW, Juliano R: Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* 30-4-2004;17:188-202.
- [121] Modlin IM, Moss SF, Chung DC, Jensen RT, Snyderwine E: Priorities for improving the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *J Natl Cancer Inst* 17-9-2008;100:1282-1289.
- [122] Krivacic KA, Levine AD: Extracellular matrix conditions T cells for adhesion to tissue interstitium. *J Immunol* 15-5-2003;170:5034-5044.
- [123] Leveille C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, Reyes-Moreno C, Lapointe R, Merhi Y, Wilkins JA, Mourad W: CD40 ligand binds to  $\alpha 5 \beta 1$  integrin and triggers cell signaling. *J Biol Chem* 23-2-2007;282:5143-5151.

- [124] Lygoe KA, Wall I, Stephens P, Lewis MP: Role of vitronectin and fibronectin receptors in oral mucosal and dermal myofibroblast differentiation. *Biol Cell* 2007;99:601-614.
- [125] Albini A, Sporn MB: The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2007;7:139-147.
- [126] Ramsey S, Aitchison M: Treatment for renal cancer: are we beyond the cytokine era? *Nat Clin Pract Urol* 2006;3:478-484.
- [127] Bell-McGuinn KM, Matthews CM, Ho SN, Barve M, Gilbert L, Penson RT, Lengyel E, Palaparthi R, Gilder K, Vassos A, McAuliffe W, Weymer S, Barton J, Schilder RJ: A phase II, single-arm study of the anti-alpha5beta1 integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 26-1-2011.
- [128] Carter A: Integrins as target: first phase III trial launches, but questions remain. *J Natl Cancer Inst* 19-5-2010;102:675-677.

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Antonios Douros, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Funktionelle Inhibition des Fibronektinrezeptors  $\alpha_5\beta_1$  Integrin in humanen neuroendokrinen Tumorzellen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

24. April 2012

Datum

Unterschrift

# DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem:

**Prof. Dr. med. B. Wiedenmann:**

Für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

**Dr. med. K. Detjen:**

Für ihre herausragend engagierte Betreuung, für geduldiges Zuhören und stetige Ermutigung auch während schwieriger Phasen bei der Erstellung dieser Arbeit.

**Dipl.-Chem. Martina Welzel, Dr. cell. biol. Hugo Sanchez-Ruderisch:**

Für die kompetente und immer freundliche Unterstützung bei wichtigen Teilen der experimentellen Phase dieser Arbeit.

**Meiner Familie:**

Für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

## **LEBENS LAUF**

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