

Aus dem
CharitéCentrum 13 für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie
Medizinische Klinik m.S. Hepatologie und Gastroenterologie
Charité-Universitätsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Bertram Wiedenmann

HABILITATIONSSCHRIFT

Molekulare und zelluläre Mechanismen der Tumorzell-Stroma Interaktion im Rahmen der Angiogenese, Metastasierung und neuralen Invasion gastrointestinaler Tumoren

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Christian Fischer

Eingereicht: September 2014

Dekanin: Professor Dr. med. A. Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Professor Dr. med. V. Ellenrieder, Göttingen

2. Gutachter: Professor Dr. med. M. Löhr, Stockholm

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	3
1.1. <i>Placental growth factor</i> : ein VEGF Homolog mit krankheitsspezifischer Funktion	4
1.2. Das Angiopoietin-Tie Liganden-Rezeptor System in der tumorassoziierten Lymphangiogenese.....	5
1.3. Neurovaskuläre Schnittstelle bei der Tumorzell-Stroma Interaktion	6
1.3.1. Neurale Invasion als eigenständiger Metastasierungsweg	6
1.3.2. Slit2-Robo <i>axon guidance</i> Faktoren: Schnittstelle der Kommunikation zwischen Tumorzelle und dem vaskulären und neuronalen Netzwerk des Tumorstroma	7
2. Eigene Arbeiten.....	9
2.1. Pleiotrope Effekte von anti-PIGF auf die tumorassoziierte Angiogenese, Metastasierung und Resistenzentwicklung von Tumoren	9
2.2. PIGF fördert das Wachstum neuroendokriner Tumoren und dient als prognostischer Parameter für den Erkrankungsverlauf	24
2.3. Angiopoietin-2 stimuliert die lymphatische Metastasierung des Pankreaskarzinoms und korreliert mit dem Überleben von Patienten.....	41
2.4. Der <i>axon guidance</i> Faktor Slit2 hemmt neurale Invasion und Metastasierung des Pankreaskarzinoms	54
2.5. Der Fibronektin Rezeptor $\alpha 5\beta 1$ Integrin vermittelt Wachstumskontrolle gastrointestinaler Tumorzellen durch Modulation der Tumorzell-Matrix Interaktion.....	68
3. Diskussion.....	82
3.1. Evaluierung des angiogenen Wachstumsfaktors PIGF als prognostischer Biomarker, therapeutisches Zielmolekül und Marker für Therapieresistenz	82
3.2. Molekulare und zelluläre Effektoren der Tumorzell-Stroma Interaktion bei der Lymphangiogenese und lymphatischen Metastasierung	84
3.3. Neurovaskuläre Schnittstelle im Pankreaskarzinom.....	86
4. Zusammenfassung.....	89
5. Literaturangaben	91

ABKÜRZUNGEN

Ang1	Angiopoietin-1
Ang2	Angiopoietin-2
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CXCL1	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
DCC	<i>deleted in colon cancer</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ETS	<i>E26 transformation-specific family</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
IFN α	Interferon- α
Il-8	Interleukin 8
KRas	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
NET	neuroendokriner Tumor
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PIGF	<i>placental growth factor</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
Rho	<i>Ras homolog</i>
Robo	<i>roundabout</i>
Robo1	<i>roundabout homolog 1</i>
Robo4	<i>roundabout homolog 4</i>
Scr	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>
Slit1	<i>Slit homolog 1 protein</i>
Slit2	<i>Slit homolog 2 protein</i>
Slit3	<i>Slit homolog 3 protein</i>
srGAP	<i>Slit-Robo Rho GTPase activating protein</i>
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i>
uPAR	Urokinase Rezeptor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	VEGF Rezeptor

1. Einleitung

Eine wesentliche Eigenschaft maligner Tumoren ist sowohl die klonale Expansion genetisch abnormaler Zellen mit unkontrollierter Proliferation als auch die Invasion in angrenzende Gewebe und die Metastasierung in entfernte Organe. Darüber hinaus stellen solide Tumoren ein komplexes und dynamisches Gefüge aus den eigentlich maligne transformierten Tumorzellen und dem umgebenden Tumorstroma dar (1). In bemerkenswerter Weise besitzen Tumorzellen die Fähigkeit, stromale Zellen zu rekrutieren und zu aktivieren. Das auf diese Weise entstehende Tumormikromilieu beeinflusst durch wechselseitige Kommunikation zwischen Tumorzellen und stromalen Zellen maßgeblich Wachstum und Metastasierung. Zu den Zellen des Tumorstroma gehören neben Endothelzellen und Lymphendothelzellen, die tumorassoziierten Fibroblasten, Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen. Zusätzlich tragen tumorassoziierte Makrophagen und hämatopoietische Vorläuferzellen des Knochenmarks zur Bildung des Tumorstroma bei (1).

Endothelzellen, die das tumorassoziierte Gefäßsystem bilden, stellen einen erheblichen Anteil des Tumorstroma dar (2). Ähnlich wie im gesunden Gewebe sichert die tumorassoziierte Angiogenese, d.h. die Neubildung tumoreigener Gefäße, den Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Stoffwechselmetaboliten. Prototyp der angiogenen, d.h. gefäßstimulierenden Faktoren ist der *vascular endothelial growth factor*, VEGF-A und seine Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2, deren Schlüsselfunktion bei der embryonalen Angiogenese sowie der physiologischen und pathologischen Angiogenese des Erwachsenen gut etabliert ist (2-4). Mit der Entdeckung der lymphangiogenen VEGF Homologe, VEGF-C und VEGF-D, und des entsprechenden VEGFR3-Rezeptors auf lymphatischen Endothelzellen konnten darüber hinaus Mechanismen der Lymphangiogenese charakterisiert und deren Funktion bei der lymphatischen Metastasierung von Tumoren entschlüsselt werden (5, 6).

Auf der Grundlage dieser tumorbiologischen Erkenntnisse wurden Therapiestrategien entwickelt, die in erster Linie nicht gegen die eigentlich neoplastische Tumorzelle selbst, sondern gezielt gegen Zellen des Tumorstroma gerichtet sind. Seit der Entdeckung der Schlüsselfunktion von VEGF für die tumorassoziierte Angiogenese und der Zulassung des ersten neutralisierenden anti-VEGF Antikörpers Bevacizumab (Avastin®) für die Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms im Jahre 2004 wurden verschiedene antiangiogene Therapiestrategien, die im Wesentlichen auf einer Hemmung des VEGF-VEGFR2 Signalwegs beruhen, in onkologische Therapiealgorithmen aufgenommen (7, 8).

Die anfänglich damit verbundenen Erwartungen auf eine nachhaltige Prognoseverbesserung von Tumorerkrankungen konnten jedoch im klinischen Alltag nur begrenzt erfüllt werden (9). Entgegen der ursprünglichen Auffassung, dass antiangiogene Therapien aufgrund der genetischen Stabilität von Endothelzellen keine Resistenzen induzieren sollten, ist inzwischen die Entstehung adaptiver Resistenzen gegen antiangiogene Therapien hinreichend belegt und mechanistisch in erster Linie durch die kompensatorische Expression proangiogener Wachstumsfaktoren aus Zellen des Tumorstroma erklärt (8, 10, 11). Tatsächlich weist ein erheblicher Anteil von Tumoren bereits zu Beginn eine Resistenz gegen VEGF-gerichtete Therapien auf. Andere Tumoren wiederum entwickeln erst im Therapieverlauf Resistenzen, so dass sich der Erfolg vieler antiangiogener

Therapien zwar in einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, nicht jedoch des Gesamtüberlebens von Patienten ausdrückt (1, 9, 12, 13). Darüber hinaus verursachen antiangiogene Therapien Nebenwirkungen, die zum Teil mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität einhergehen und daher nicht selten zum Abbruch der Therapie führen (14, 15).

Wenngleich Nervenfasern schon vor mehr als 100 Jahren in Tumoren nachgewiesen wurden (16), ist die Erkenntnis, dass ein tumoreigenes neuronales Netzwerk Bestandteil des Tumorstroma ist, verhältnismäßig jung. Analog den Blutgefäßen stellen auch tumorversorgende Nerven infrastrukturelle Voraussetzungen bereit, die eine spezifische Ausbreitung von Tumorzellen entlang der Nervenbahnen als eigenständigen und von der hämatogenen und lymphatischen Metastasierung unabhängigen Metastasierungsweg ermöglichen (17). Da lange Zeit keine geeigneten experimentellen Modellsysteme zur Darstellung dieser als neurale Invasion bezeichneten Ausbreitung von Tumorzellen entlang der Nervenbahnen zur Verfügung standen, werden erst allmählich molekulare Determinanten der Tumorzell-Nerven Interaktion an der neuronalen Schnittstelle des Tumorstroma entschlüsselt (17).

Vor diesem Hintergrund beschäftigen sich die folgenden Forschungsprojekte mit alternativen angiogenen Liganden-Rezeptor Systemen, die abseits des klassischen VEGF-VEGFR2 Signalwegs Tumorangiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung entlang von Gefäßen und Nervenbahnen regulieren und im translationalen Ansatz vielversprechende Kandidaten für komplementäre Therapiestrategien bei der Behandlung gastrointestinaler Tumoren darstellen.

1.1. *Placental growth factor*: ein VEGF Homolog mit krankheitsspezifischer Funktion

Der angiogene Wachstumsfaktor *placental growth factor* (PlGF) ist ein Homolog aus der Familie der VEGF Faktoren, bindet jedoch im Gegensatz zu VEGF-A ausschließlich VEGFR1 und die Kofaktoren Neuropilin-1 und Neuropilin-2 (11). Untersuchungen an *knock-out* Mäusen mit Verlust der endogenen PlGF Expression zeigen, dass PlGF entscheidend zur Induktion der pathologischen Angiogenese beiträgt, belegen aber auch in eindrucksvoller Weise die Redundanz von PlGF für den Vorgang der embryonalen und physiologischen Angiogenese (11, 18). Diese Beobachtungen erklären, warum PlGF in gesunden Organen kaum nachgewiesen werden kann, während unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise in Tumoren, rheumatischen Erkrankungen und der Atherosklerose, eine deutlich gesteigerte *de novo* Expression von PlGF vorhanden ist (11, 19). Eigene Daten belegen sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene das pleiotrope Wirkspektrum von PlGF im Tumormikromilieu. So stimuliert PlGF über seinen Rezeptor VEGFR1 die Motilität und das Wachstum von Endothelzellen und aktiviert proangiogene und prometastatische Makrophagen sowie endotheliale und hämatopoietische Vorläuferzellen des Knochenmarks (20), die ihrerseits Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung fördern.

Erste klinische Daten korrelierten PlGF Spiegel im Tumorgewebe mit dem Überleben und der Metastasierung des Magen- und Bronchialkarzinoms (11, 21, 22). Bemerkenswerterweise wurde darüber hinaus auch eine Induktion von zirkulierenden PlGF Serumspiegeln unter der Therapie mit VEGF-VEGFR2 Inhibitoren bei Patienten mit Glioblastom und Nierenzellkarzinom beobachtet (23-27). In diesem Zusammenhang gaben mehrere präklinische Studien in Tumormodellen der Maus

Anlass zur Vermutung, dass die kompensatorische Induktion von PlGF in Zellen des Tumorstroma zur Entwicklung adaptiver Resistenzen gegen VEGF-gerichtete antiangiogene Therapien beitragen könnte (13, 28, 29).

In unseren Untersuchungen kamen nun eigens hergestellte monoklonale Antikörper gegen PlGF in einem breiten Spektrum syngener und xenotransplantierter Tumormodelle der Maus zum Einsatz, um den klinischen Stellenwert und die Wirkmechanismen einer pharmakologischen Inhibition von PlGF als antiangiogene Therapiestrategie zu evaluieren und die Rolle von stromalem PlGF als Resistenzmarker zu beurteilen. Angesichts der redundanten Funktion von PlGF für die physiologische Angiogenese sollte darüber hinaus die Annahme untersucht werden, dass die Inhibition von PlGF selektiv die Entstehung pathologischer Gefäße im Tumor hemmt, ohne jedoch einen nachteiligen Effekt auf das gesunde Gefäßsystem auszuüben.

1.2. Das Angiopoietin-Tie2 Liganden-Rezeptor System in der tumorassoziierten Lymphangiogenese

Die Metastasierung in regionale Lymphknoten stellt für viele Tumoren den ersten Schritt der Tumorausbreitung dar und bestimmt maßgeblich die Prognose der Erkrankung. Dabei wandern Tumorzellen entweder in bereits bestehende Lymphgefäße der Tumorperipherie ein oder induzieren selbst die Neubildung von Lymphgefäßen durch Sekretion lymphangiogener Wachstumsfaktoren. Aus der Familie der VEGF Faktoren konnten zunächst - unter anderem auch in eigenen Studien (30, 31) - VEGF-C und VEGF-D als Schlüsselfaktoren der Lymphangiogenese beschrieben und im Folgenden auch eine wesentliche Rolle bei der lymphatischen Metastasierung von Tumoren zugewiesen werden (6, 32-34). Ihre Wirkung vermittelt der Rezeptor VEGFR3, der spezifisch auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird.

Mit der Entdeckung der Tie2-Rezeptoren auf Blut- und Lymphgefäßen sowie ihrer Liganden, den Angiopoietinen Ang1 und Ang2, wurde neben VEGF-VEGFR2 das zweite endothelspezifische Tyrosinkinase Rezeptorsystem identifiziert, das nicht nur die Entwicklung und Reifung embryonaler Gefäße sondern auch das Gleichgewicht des adulten Blut- und Lymphgefäßsystems reguliert (35, 36). Während Ang1 weit verbreitet in adulten Geweben exprimiert wird und als Agonist am Tie2-Rezeptor zur Reifung und Stabilisierung ruhender Gefäße beiträgt, wird Ang2 vornehmlich in Situationen vermehrter, pathologischer Gefäßaktivität gebildet. Ang2 kompetitiert dabei als Antagonist um die Bindung an Tie2-Rezeptoren und induziert im Zusammenspiel mit VEGF pathologische Angiogenese (36). Erste Hinweise auf eine physiologische Funktion des Ang2-Tie2 Liganden-Rezeptor Systems bei der Entwicklung der Lymphgefäße stammten aus Geninaktivierungsstudien der Maus. So führte der Verlust der Ang2 Expression zu einer strukturellen und funktionellen Beeinträchtigung von Lymphgefäßen mit der Folge eines ineffektiven Lymphtransports und Bildung eines chylösen Ascites (37). In Tumoren der Maus hingegen hatte die ektope Überexpression von Ang2 eine vermehrte peritumorale Lymphangiogenese und eine gesteigerte lymphatische Metastasierung zur Folge (38). Die klinische Relevanz dieser experimentellen Daten wurde eindrucksvoll durch Beobachtungen belegt, die erhöhte Ang2

Tumorspiegel mit einer vermehrten lymphatischen Metastasierung des malignen Melanoms und anderen Tumorerkrankungen korrelierten (38, 39).

Die frühe lymphatische Metastasierung beeinflusst maßgeblich die Prognose des Pankreaskarzinoms (40, 41). Darüber hinaus stellt gerade das Pankreaskarzinom ein Paradebeispiel für einen besonders stromareichen Tumor dar, bei dem das dynamische Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und stromalen Zellen ein ausgeprägt prometastatisches Mikromilieu erzeugt (42). Vor diesem Hintergrund war das Ziel des Projektes, die Rolle des Ang-Tie Liganden-Rezeptor Systems bei der tumorassoziierten Lymphangiogenese und lymphatischen Metastasierung des Pankreaskarzinoms experimentell zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte im translationalen Ansatz die klinische Relevanz von Ang2 als prognostischer Biomarker und Zielmolekül für neuartige und komplementäre Therapiestrategien zur Hemmung der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms evaluiert werden.

1.3. Neurovaskuläre Schnittstelle bei der Tumorzell-Stroma Interaktion

1.3.1. Neurale Invasion als eigenständiger Metastasierungsweg

Neben einer frühen Metastasierung entlang der Blut- und Lymphgefäße zeichnet sich das Pankreaskarzinom in charakteristischer Weise durch die kontinuierliche Ausbreitung von Tumorzellen entlang tumorversorgender Nervenbahnen aus. Ein Vorgang, der als neurale Invasion bezeichnet wird und im erheblichen Maße die Prognose der Erkrankung bestimmt (17, 41, 43). Eine Vielzahl präklinischer Untersuchungen belegte die Bedeutung der tumorassoziierten Häm- und Lymphangiogenese für die Progression des Pankreaskarzinoms und wies eine gesteigerte Expression angiogener Wachstumsfaktoren, darunter VEGF, PlGF, Ang2, FGF und PDGF, im Pankreaskarzinom nach (44, 45). Jedoch konnten erst in jüngerer Zeit molekular- und zellbiologische Ansätze zum Verständnis der neuralen Invasion des Pankreaskarzinoms erarbeitet, und neurale Invasion als eigenständiger und von der lymphatischen und hämatogenen Metastasierung unabhängiger Ausbreitungsweg von Pankreaskarzinomzellen charakterisiert werden (17, 41). Das Ausbreitungsmuster von Tumorzellen entlang tumorversorgender Nerven bis über die Organgrenze hinaus in extrapancreatisch gelegene Nervengeflechte erklärt anschaulich, warum die neurale Invasion für die Mehrheit der lokalen Tumorrezidive verantwortlich ist und den Erfolg einer kurativen Resektion des Pankreaskarzinoms maßgeblich einschränkt (43). Entgegen der ursprünglichen Auffassung dienen Nervenfasern bei diesem Vorgang nicht als passive Leitstrukturen, die Tumorzellen den geringsten Migrationswiderstand im Gewebe entgegensetzen; vielmehr stellt die neurale Invasion das Ergebnis einer wechselseitigen Interaktion und Kommunikation zwischen Tumorzellen und Nervenzellen dar und umfasst nicht nur die gerichtete Motilität von Tumorzellen entlang der Nervenbahnen, sondern insbesondere auch Anpassungsvorgänge des neuronalen Netzwerkes, die zu einem vermehrten axonalen Wachstum und einer gesteigerten Aussprossung von Nervenfasern im Tumor führen. Diese Umbauvorgänge im Rahmen der neuronalen Plastizität lassen sich histologisch in Form einer gesteigerten Nervendichte und Hypertrophie der tumorversorgenden Nerven im Gewebe des Pankreaskarzinoms nachweisen (17, 46, 47).

Gleichwohl die Charakterisierung neuronaler Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, wie beispielsweise *nerve growth factor* (NGF) und *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), zur Identifizierung von Signalmolekülen und Signalwegen geführt hat, die in experimentellen *in vitro* Modellen des Pankreaskarzinoms die Interaktion von Tumorzellen und Nervenzellen zu regulieren scheinen, so ist unser gegenwärtiges Verständnis von den molekularen Mechanismen der neuralen Invasion des Pankreaskarzinoms nur unzureichend (17). Angesichts der klinischen Relevanz der neuralen Invasion für die Prognose des Pankreaskarzinoms besteht großer Bedarf an der Entschlüsselung zugrundeliegender molekularer Mechanismen, um Therapiestrategien mit dem Ziel der Beeinflussung der Tumorzell-Nerven Interaktion als erfolgversprechende Ansätze zur Hemmung der Tumorprogression und zur Verbesserung der Prognose des Pankreaskarzinoms entwickeln zu können.

1.3.2. Slit2-Robo *axon guidance* Faktoren: Schnittstelle der Kommunikation zwischen Tumorzelle und dem vaskulären und neuronalen Netzwerk des Tumorstroma

Bereits im 16. Jahrhundert beschrieb Andreas Vesalius¹, dass Nerven und Gefäße ein ähnliches stereotypisches Verzweigungsmuster aufweisen. Dieses visionäre Konzept wurde seitdem auf molekularer und zellulärer Ebene bestätigt, als bekannt wurde, dass Gefäße und Nerven auf das gleiche Repertoire an Navigationssignalen und -rezeptoren zurückgreifen (48). Tatsächlich übernahm das entwicklungsbiologisch jüngere Blutgefäßsystem Organisationsprinzipien und Funktionsweisen von Liganden-Rezeptor Systemen, die sich bereits zuvor erfolgreich im Rahmen der Evolution des viel älteren Nervensystems etabliert hatten (49). So lässt sich erklären, dass VEGF zwar ursprünglich als Prototyp der angiogenen Wachstumsfaktoren charakterisiert wurde, aber zwischenzeitlich auch in gefäßlosen Spezies nachgewiesen werden konnte, in denen VEGF maßgebend die Entwicklung des Nervensystems steuert (3, 4). Im umgekehrten Fall konnte für die aus der Neurogenese bereits bekannten *axon guidance* Moleküle eine komplementäre Rolle bei der Regulation der Angiogenese gezeigt werden (48, 50). Hauptvertreter dieser *axon guidance* Faktoren sind Netrine, Slits, Ephrine und Semaphorine, die als lösliche Liganden chemoattraktive beziehungsweise chemorepulsive Navigationssignale vermitteln. Einige ihrer Rezeptoren wurden zwischenzeitlich identifiziert: UNC5 und *deleted in colorectal cancer* (DCC) für Netrine, Plexine und Neuropiline für Semaphorine und *roundabouts* (Robos) für Slits (48, 49). Interessanterweise entsprechen dieser molekularen Übereinstimmung auch strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Nerven und Gefäße. So wird man bei der morphologischen Betrachtung einer sich verzweigenden Endothelzelle an der Spitze eines wachsenden Gefäßes an den Wachstumskegel eines Axons erinnert: sowohl Endothelzelle als auch axonaler Wachstumskegel bilden zytoplasmatische Fortsätze, mit deren Hilfe sie die Umgebung nach Navigationssignalen abtasten (49, 50).

Slit und seine *roundabout* (Robo)-Rezeptoren vermitteln solche Navigationssignale. Ursprünglich als repulsive *axon guidance* Faktoren im Nervensystem identifiziert und charakterisiert, regulieren sie entwicklungsbiologisch das Kreuzen kommissuraler Axone (51). Zwischenzeitlich belegten jedoch

¹ Anatom (1514-1564), Brüssel: De humani corporis fabrica

genetische Studien in *Drosophila* und der Maus die Bedeutung des Slit-Robo Systems auch für das Aussprossen und das gerichtete Wachstum ganz unterschiedlicher Axone im Rahmen der embryonalen Neurogenese (52). Bis heute konnten drei Slit Homologe (Slit1-3) in Säugetieren identifiziert werden, deren Aktivität über die transmembranären Rezeptoren der *roundabout* Familie vermittelt wird (51, 53). Dabei besitzt die zytoplasmatische Domäne der Robo-Rezeptoren keine intrinsische katalytische Aktivität, sondern ist bei der Weitergabe Slit2-spezifischer Signale im Zellinneren auf die Rekrutierung der Adapterproteine Slit-Robo-GAPs (srGAPs) und der kleinen GTPasen Rho, Cdc42 und Rac1 angewiesen, die als bekannte Modulatoren des Aktinzytoskeletts die Motilität von Zellen regulieren (54).

Während die Expression von Slit1 und Slit3 vorwiegend auf das Nervensystem beschränkt ist, konnte für Slit2 auch eine zusätzliche Funktion bei einer Reihe entwicklungsbiologischer Prozesse außerhalb des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden (49, 50, 54). So zeichnet sich für das Slit2-Robo System eine Beteiligung bei der Kontrolle der embryonalen Morphogenese des duktales Drüsenepithels der Niere und der Brust ab (55, 56). Darüber hinaus konnte erstmalig mit der Entdeckung des evolutionsgeschichtlich jüngsten *roundabout* Rezeptors Robo4, dessen Expression vornehmlich auf das Gefäßendothel beschränkt ist, eine angioregulatorische Funktion von Slit2 im Rahmen der embryonalen Angiogenese belegt werden (57-62). In Übereinstimmung mit dieser physiologisch repulsiven Funktion, wurde der Verlust der Slit2-Robo Aktivität mit einem aberranten und enthemmten Epithelwachstum sowie einer gesteigerten Aktivität des Gefäßendothels in Verbindung gebracht (55, 56). Angesichts einer gehäuften epigenetischen Inaktivierung der Slit2 Genexpression in verschiedenen Tumoren (54, 63, 64) wurde darüber hinaus eine Funktion von Slit2 als Tumorsuppressor diskutiert. Ein Verlust der Slit2 Aktivität im Tumor könnte demzufolge ein vermehrtes Tumorwachstum und eine gesteigerte Angiogenese und Metastasierung zur Folge haben.

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich neben der Metastasierung über das Blut- und Lymphgefäßsystem in charakteristischer Weise durch die neurale Invasion entlang pankreatischer Nerven aus (17). In Anbetracht der entwicklungsbiologisch konservierten Rolle der *axon guidance* Faktoren für die Navigation und das Wachstum von Axonen einerseits und für die Angiogenese andererseits ist es daher vorstellbar, dass die *axon guidance* Faktoren Slit und Robo entscheidende Eigenschaften als Regulatoren der vaskulären und neuronalen Netzwerke des Pankreaskarzinoms beibehalten haben und damit im Wesentlichen die infrastrukturellen Voraussetzungen für die beiden klinisch relevanten Ausbreitungswege von Pankreaskarzinomzellen bereitstellen.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Pleiotrope Effekte von anti-PlGF auf die tumorassoziierte Angiogenese, Metastasierung und Resistenzentwicklung von Tumoren

Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels.

Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. *Cell*. 2007 Nov 2;131(3):463-75. (23)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.038>

Vor dem Hintergrund der Beobachtungen aus Geninaktivierungsstudien in PlGF *knock-out* Mäusen, die bereits konzeptionell eine therapeutische Inhibition von PlGF im translationalen Ansatz vielversprechend erscheinen ließen (siehe 1.1.), setzten wir eigens hergestellte monoklonale Antikörper gegen PlGF in einem breiten Spektrum syngener Tumormodelle der Maus ein, um den klinischen Stellenwert und die Wirkmechanismen einer pharmakologischen Inhibition von PlGF als antiangiogene Therapiestrategie zu evaluieren. Darüber hinaus ermöglichte der Einsatz von anti-PlGF Antikörpern die Rolle von PlGF in der tumorassoziierten Angiogenese und der Tumorentzündung näher zu charakterisieren, sowie molekular- und zellbiologische Mechanismen zu entschlüsseln, die für eine mögliche PlGF-vermittelte Entwicklung primärer und sekundärer Tumorresistenzen gegen zielgerichtete antiangiogene Therapien verantwortlich sein könnten.

Experimentelle Daten aus syngenem Tumormodellen der Maus belegen nun, dass die pharmakologische Inhibition von PlGF das Wachstum orthotoper und ektoper Pankreas-, Kolon- und Mammakarzinome sowie Melanome hemmt und deren lymphatische und pulmonale Metastasierung wirkungsvoll verringert. Neben einer direkten Hemmung der Gefäßneubildung im Tumor konnte der Wirkungsmechanismus von anti-PlGF Antikörpern insbesondere auf eine anti-inflammatorische Aktivität, die mit einer verminderten Rekrutierung tumorassoziiierter Makrophagen in das Tumorstroma verbunden ist, erklärt werden (siehe Abbildung 1). Im Detail wurde im orthotopen Pankreaskarzinommodell der Maus gezeigt, dass PlGF tumorassoziierte Makrophagen stimuliert, die wiederum durch Sekretion des lymphangiogenen Faktors VEGF-C Lymphangiogenese induzieren und eine Zunahme der lymphatischen Metastasierung begünstigen.

Die PlGF-vermittelte Rekrutierung tumorassoziiierter Makrophagen in das Tumorstroma trägt darüber hinaus maßgeblich zur Entwicklung spezifischer Tumorresistenzen bei. Funktionelle Analysen an Pankreas- und Kolonkarzinomen belegen in diesem Zusammenhang, dass die Inaktivierung des VEGF-VEGFR2 Signalwegs eine ausgeprägte Regression von Tumorgefäßen mit einer Minderperfusion und einer deutlichen Zunahme der Hypoxie im Tumorgewebe zur Folge hatte. Die entstandene Tumorthypoxie induzierte die Expression von PlGF in Tumor- und Stromazellen und ging mit einem mehr als zehnfachen Anstieg zirkulierender PlGF Serumspiegel in den behandelten Mäusen einher. Die kompensatorische Induktion von PlGF im Tumorstroma wiederum führte zu

einer zahlenmäßigen Zunahme und gesteigerten Aktivität tumorassoziierter Makrophagen, die schließlich über die Sekretion der proangiogenen Faktoren FGF-1, FGF-2, SDF-1, MMP9 und CXCL1 einen adaptiven Resistenzmechanismus gegen VEGF-gerichtete Therapien in Gang setzten. Anti-PlGF Antikörper hingegen hemmten proangiogene Makrophagen, wirkten so der Entwicklung einer adaptiven Tumorresistenz entgegen und wiesen sich in der Kombinationstherapie mit VEGF-VEGFR2 Inhibitoren durch ein verringertes Wachstum und eine verminderte Metastasierung experimenteller Pankreas- und Kolonkarzinome aus.

Die Implementierung antiangiogener Therapien im klinischen Alltag machte deutlich, dass Inhibitoren des VEGF-VEGFR2 Signalwegs, entgegen ersten Annahmen, Nebenwirkungen verursachen, die mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität einhergehen können. Untersuchungen hinsichtlich der Effekte von anti-PlGF Antikörpern auf das physiologische Gefäßsystem und die entsprechenden Endorganfunktionen in gesunden Mäusen lieferten Resultate, die in perfekter Übereinstimmung mit der redundanten Rolle von PlGF bei der physiologischen Angiogenese gesunder Gefäße ein besonders günstiges Nebenwirkungsprofil der pharmakologischen Inhibition von PlGF aufwiesen. Während nämlich die Behandlung gesunder Mäuse mit einem VEGF Inhibitor über nur drei Wochen eine deutliche Verminderung der Kapillardichte der Trachea und der Schilddrüsenfollikel, eine signifikante Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks und eine Erhöhung des Thromboserisikos zur Folge hatte, ließen sich derartige unerwünschte Effekte von anti-PlGF Antikörpern auf gesunde Gefäße nicht nachweisen. Darüber hinaus besaßen anti-PlGF Antikörper keine teratogene Toxizität, während die Behandlung schwangerer Mäuse mit einem VEGF Inhibitor zum Absterben der Embryonen am 8. Gestationstag führte.

Zusammenfassend weisen diese Daten die pharmakologische Inhibition von PlGF als komplementäre und nebenwirkungsarme Therapiestrategie für die Behandlung gastrointestinaler Tumoren aus und belegen zugleich eine wichtige Rolle von stromalen PlGF bei der Entstehung adaptiver Resistenzmechanismen gegen Inhibitoren des VEGF-VEGFR2 Signalwegs.

2.2. PIGF fördert das Wachstum neuroendokriner Tumoren und dient als prognostischer Parameter für den Erkrankungsverlauf

Placental growth factor supports neuroendocrine tumor growth and predicts disease prognosis in patients.

Hilfenhaus G, Göhrig A, Pape UF, Neumann T, Jann H, Zdunek D, Hess G, Stassen JM, Wiedenmann B, Detjen K, Pavel M, **Fischer C.** *Endocr Relat Cancer.* 2013 May 20;20(3):305-19. (65)

<http://dx.doi.org/10.1530/ERC-12-0223>

Neuroendokrine Tumoren (NETs) stellen eine Gruppe äußerst heterogener Tumoren dar, die sich in ihrer molekularen Pathologie und insbesondere in den klinischen Erkrankungsverläufen deutlich voneinander unterscheiden (66, 67). Die herkömmliche Einschätzung von NETs als seltene Tumorerkrankung wurde unlängst angesichts kontinuierlich steigender Inzidenzraten berichtigt (68) – tatsächlich weisen aktuelle US-amerikanische Daten zur Prävalenz (SEER¹ 2004) NETs nach dem kolorektalen Karzinom als zweithäufigste maligne Tumorentität des Gastrointestinaltraktes aus (69). Nach aktueller Auffassung werden Zellen des disseminierten neuroendokrinen Systems beziehungsweise ihre Vorläufer, die multipotenten gastrointestinalen Stammzellen, als Ursprung der NETs angesehen (66). Demzufolge treten diese Tumoren typischerweise entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes auf, insbesondere in den vom embryonalen *foregut* (am häufigsten im Pankreas, ferner Magen und Duodenum) und *midgut* (Jejunum, Ileum) abgeleiteten Abschnitten (67). Gemeinsames Merkmal neuroendokriner Tumoren ist der immunhistochemische Nachweis von Bestandteilen chromaffiner Granula (Chromogranin A) und kleiner synaptischer Vesikel (Synaptophysin), ferner die Produktion und Sekretion von Neurotransmittern und Peptidhormonen, die bei sogenannten funktionellen NETs für die typischen klinischen Symptome des Hypersekretionssyndroms verantwortlich sind (67, 70).

Trotz aller molekularer Heterogenität stellt ihre ausgeprägte Vaskularisierung ein charakteristisches Merkmal dar, das die Mehrzahl der NETs auszeichnet (71-73). Gerade im Zusammenhang mit der jüngsten Zulassung der beiden antiangiogen wirkenden Substanzen Everolimus (Afinitor®) und Sunitinib (Sutent®) entstand ein wachsendes Interesse an der Entwicklung neuer Therapeutika mit antiangiogenen Wirkmechanismen (74, 75). In gleicher Weise erlangte die Suche nach molekular- und zellbiologischen Mechanismen der Tumorangio-genese in NETs zunehmend an Bedeutung, da sie die Zuweisung von Patienten zu personalisierten und zielgerichteten Therapiestrategien ermöglichen könnte (67, 76).

Somit entwickelten sich in Fortsetzung unserer eigenen genetischen und pharmakologischen Untersuchungen zur tumorbiologischen Charakterisierung der Rolle des angiogenen

¹ The National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program

Wachstumsfaktors PIGF translationale Fragestellungen hinsichtlich der klinischen Relevanz von PIGF als prognostisches und therapeutisches Zielmolekül in NETs (11, 23). Zu diesem Zweck konnten wir auf Seren und klinische Verläufe sowohl aus retrospektiven als auch prospektiven Kohorten von Patienten der beiden großen Gruppen der pankreatischen und intestinalen NETs zurückgreifen. Für funktionelle Analysen standen uns darüber hinaus präklinische Tumorzellsysteme und ein orthotopes NET-Modell des Pankreas in der Nacktmaus zur Verfügung.

Quantitative Bestimmungen von PIGF Serumkonzentrationen wiesen signifikant höhere PIGF Serumspiegel in Patienten mit pankreatischen und intestinalen NETs im Vergleich zur gesunden Bevölkerung nach. Darüber hinaus wurde Patienten mit pankreatischen NETs und hohen PIGF Serumspiegeln eine weitaus schlechtere Prognose und ein kürzeres tumorbedingtes 10-Jahres-Überleben zugewiesen. Aufgrund des langsamen Tumorprogresses in der prospektiven Patientenkohorte mit intestinalen NETs, für die eine mediane Überlebenszeit von weit mehr als 10 Jahren zu erwarten ist, konnten bislang keine ausreichenden Daten zum Überleben erhoben werden. Eine entsprechende Dokumentation der klinischen Verlaufsbeobachtung dieser Patienten konnte jedoch zeigen, dass erhöhte PIGF Serumspiegel mit einer signifikant verkürzten Dauer des progressionsfreien Erkrankungsintervalls verbunden sind. Auch wiesen Patienten mit intestinalen NETs, die innerhalb eines Zeitraums von 6 Monaten einen bildmorphologischen Tumorprogress erlitten, deutlich höhere PIGF Serumspiegel als Patienten mit einer anhaltenden stabilen Erkrankungsphase über diesen Zeitraum auf.

Der eindrucksvolle Zusammenhang zwischen zirkulierenden PIGF Spiegeln und dem progressionsfreien beziehungsweise tumorbedingten Überleben verlieh der Frage nach PIGF als therapeutischer Ansatzpunkt in NETs zusätzliche Bedeutung. Experimentelle *in vitro* Untersuchungen an neuroendokrinen Modellsystemen belegten eine Steigerung der Proliferation und der Migration pankreatischer und intestinaler NET Zelllinien unter exogener Stimulation mit PIGF. Die translationale Relevanz dieser Ergebnisse konnte im tierexperimentellen Ansatz bestätigt werden. Als Folge der Behandlung xenotransplantierter Mäuse mit anti-PIGF Antikörpern waren eine signifikante Reduktion des Wachstums und eine im Trend verminderte Metastasierung pankreatischer NETs zu beobachten.

Zusammenfassend belegen unsere klinischen und experimentellen Daten den translationalen Stellenwert von PIGF als prognostischen Biomarker und therapeutisches Zielmolekül in NETs. Gleichzeitig legen sie die Grundlage für eine weiterführende funktionelle Charakterisierung der Regulation und Wirkungsweise von PIGF in NETs sowie für den experimentellen Einsatz von anti-PIGF Antikörpern in der Behandlung von Patienten mit NETs im Rahmen klinischer Studien.

2.3. Angiotensin-2 stimulates lymphatic metastasis of pancreatic cancer and correlates with patient survival

Angiotensin-2 drives lymphatic metastasis of pancreatic cancer.

Schulz P*, Fischer C*, Detjen KM*, Rieke S, Hilfenhaus G, von Marschall Z, Böhmig M, Koch I, Kehrberger J, Hauff P, Thierauch KH, Alves F, Wiedenmann B, Scholz A. FASEB J. 2011 Oct;25(10):3325-35. (77)

<http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-182287>

* geteilte Autorenschaft

Erste Hinweise für die klinische Relevanz des Ang2-Tie2 Liganden-Rezeptor Systems für das Pankreaskarzinom leiteten sich von unseren Untersuchungen zur Expression von Ang2 und des Rezeptors Tie2 in humanen Pankreaskarzinomgeweben ab. Mittels immunhistochemischer Analysen und *in situ* Hybridisierung ließ sich die *de novo* Expression von Ang2 in transformierten duktalem Pankreaskarzinomzellen nachweisen, während sich im gesunden Pankreasgewebe keine Ang2 Expression belegen ließ. Der Nachweis des Tie2-Rezeptors auf Blut- und Lymphgefäßen des Pankreaskarzinoms legte darüber hinaus einen tumorbiologisch relevanten auto-/parakrinen Wirkmechanismus für das Ang2-Tie2 System im Pankreaskarzinom nahe.

Um die tumorbiologische Bedeutung der *de novo* Expression von Ang2 im experimentellen Ansatz zu untersuchen, kamen Klone von unterschiedlichen humanen Pankreaskarzinomzellen mit genetisch modifizierter konstitutiver beziehungsweise induzierbarer¹ Überexpression von Ang2 im orthotopen Pankreastumormodell der Maus zum Einsatz. Dabei wiesen orthotope Pankreastumoren mit ektopter Ang2 Expression einen konsistenten Phänotyp auf, der sich durch ein vermehrtes invasives Wachstum in benachbarte Organe und einer gesteigerten abdominalen und lymphatischen Metastasierung auszeichnete. Immunhistochemische Analysen wiesen darüber hinaus eine Zunahme der Vaskularisierung mit Blut- und peritumoralen Lymphgefäßen in Tumoren mit ektopter Ang2 Expression nach. Die funktionelle Inaktivierung von Ang2 durch Koexpression eines löslichen, d.h. Ang2 neutralisierenden Tie2-Rezeptors hemmte hingegen die Blut- und Lymphgefäßbildung und hatte eine signifikante Reduktion der Lymphknotenmetastasierung orthotoper Pankreastumoren zur Folge (siehe Abbildung 1).

Die Frage nach der translationalen klinischen Relevanz dieser experimentellen Daten konnte durch den quantitativen Nachweis zirkulierender Ang2 Serumspiegel in einem umfangreichen Kollektiv von Patienten mit Pankreaskarzinom beantwortet werden. Tatsächlich wiesen ELISA Analysen einen signifikanten Anstieg der medianen Ang2 Serumspiegel in Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu gesunden Probanden auf. In der Subgruppe der Patienten, die in kurativer Absicht

¹ unter Verwendung des Tetrazyklin-regulierten T-REx™ Vektorsystems (Invitrogen®)

operiert wurden, korrelierten hohe präoperative Ang2 Serumspiegel mit einem höheren Anteil befallener Lymphknoten, während hingegen Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation keine Lymphknotenmetastasen aufwiesen, insgesamt niedrigere Ang2 Serumspiegel besaßen. Bemerkenswerterweise konnte hohen Ang2 Serumspiegeln eine prognostische Wertigkeit für einen ungünstigen Verlauf mit kürzerem Gesamtüberleben sowohl bei Patienten mit kurativer Resektion also auch in der Gesamtkohorte, in die zusätzlich Patienten mit inoperablen Pankreaskarzinomen eingingen, zugewiesen werden.

Weiterführende Studien hatten zum Ziel, die transkriptionelle Regulation der Ang2 Expression im Kontext der Tumorzell-Stroma Interaktion des Pankreaskarzinoms zu charakterisieren. Dabei wiesen Luziferase-Reportergeräten Versuche mit 5'-Deletionskonstrukten stromales TGF β als starken Aktivator des Ang2 Promoters in Pankreaskarzinomzellen nach und verorteten darüber hinaus die Induzierbarkeit des Ang2 Promoters auf ein kurzes Promoterelement, das für die TGF β -vermittelte Ansprechbarkeit und die induzierbare Ang2 Promoteraktivität hinreichend ist.

Zusammenfassend weisen diese Daten eine Beteiligung der *de novo* Expression von Ang2 an der Kontrolle der lymphatischen Metastasierung im Pankreaskarzinom nach. Sie sprechen darüber hinaus für einen möglichen klinischen Einsatz zirkulierender Ang2 Serumspiegel als nichtinvasiver prognostischer Biomarker und legen zugleich Ang2 als attraktives Zielmolekül für eine zielgerichtete Therapie des Pankreaskarzinoms nahe.

2.4. Der *axon guidance* Faktor Slit2 hemmt neurale Invasion und Metastasierung des Pankreaskarzinoms

Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer.

Göhrig A, Detjen KM, Hilfenhaus G, Körner JL, Welzel M, Arsenic R, Schmuck R, Bahra M, Wu JY, Wiedenmann B, **Fischer C**. *Cancer Res.* 2014 Mar 1;74(5):1529-40. (78)

<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1012>

Der konzeptionelle Hintergrund des Projektes stützt sich auf die Beobachtung, dass Gefäß- und Nervensystem entwicklungsbiologisch einheitliche Navigationssignale benutzen. Hiervon abgeleitet konnte für *axon guidance* Faktoren mit bekannter Funktion in der Neurogenese bereits eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Angiogenese gezeigt werden (48, 54). Ausgehend von der Hypothese, dass Tumorzellen für ihre wechselseitige Interaktion sowohl mit Gefäßen als auch mit tumorversorgenden Nerven auf Liganden-Rezeptor Systeme aus der Gruppe der *axon guidance* Moleküle zurückgreifen, untersuchten wir im Speziellen die tumorbiologische Rolle des *axon guidance* Faktors Slit2 im Pankreaskarzinom. Entwicklungsbiologisch üben Slit2 und seine Robo Rezeptoren eine chemorepulsive Wirkung auf die Navigation von Nerven und Gefäßen aus (siehe 1.3.2.). Darüber hinaus legen jüngste Studien eine Funktion des Slit2-Robo Systems bei der Regulation der duktaalen Morphogenese von Drüsenepithelien nahe. Wir gingen nun der Fragestellung nach, ob eine deregulierte Slit2-Robo Aktivität im Pankreaskarzinom Auswirkungen auf die Motilität epithelialer Tumorzellen sowie auf deren Kommunikation mit den vaskulären und den neuronalen Netzwerken des Tumorstroma hat.

Initiale immunhistochemische Analysen wiesen die Expression der Slit2 Rezeptoren Robo1 und Robo4 in Epithelzellen, Nerven und Gefäßen des Pankreaskarzinoms und des gesunden Pankreas nach. Sie identifizierten somit neben der epithelialen Tumorzelle das tumoreigene vaskuläre als auch das neuronale Netzwerk als Slit2-responsive Kompartimente innerhalb des stromalen Mikromilieus des Pankreaskarzinoms. Hingegen belegten quantitative RT-PCR Analysen sowohl eine deutlich verminderte Expression von Slit2 im Pankreaskarzinom im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe, als auch einen vollständigen Verlust der Slit2 Expression in den schlecht differenzierten, nicht aber in den gut differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinien.

Hiermit standen uns Zellsysteme mit endogen differentieller Slit2 Expression zur Verfügung, die nun mit Hilfe genetischer Manipulation der Slit2-Robo Aktivität eine funktionelle Charakterisierung der Rolle des Slit2-Robo Systems bei der neuralen Invasion, Angiogenese und Metastasierung in etablierten *in vitro* und *in vivo* Modellen des Pankreaskarzinoms ermöglichten. Experimentell führte die stabile und induzierte¹ Reexpression von Slit2 (in endogen Slit2-defizienten Tumorzellen) zu einer Hemmung der gerichteten Migration und Invasion, nicht aber der Proliferation der Tumorzellen.

¹ unter Verwendung des Tetrazyklin-regulierten T-REx™ Vektorsystems (Invitrogen®)

Die funktionelle Inaktivierung des Slit2 Signalwegs in Tumorzellen entweder durch lentiviralen RNAi-vermittelten *knock-down* des Robo1-Rezeptors oder durch Behandlung mit einem löslichen, Slit2-neutralisierenden Robo1-Rezeptorfragment steigerte hingegen die Migration Slit2-profizienter Tumorzellen. Slit2-konditionierter Tumorzellüberstand hemmte darüber hinaus die VEGF-vermittelte Migration und Lamellopodienbildung von Endothelzellen. *In vivo* wiesen schließlich syngene und xenotransplantierte orthotope Pankreastumoren mit konstitutiver oder induzierter Reexpression von Slit2 eine deutlich verringerte Invasion in benachbarte Organe sowie eine verminderte Metastasierung und Vaskularisierung auf, während gegensätzliche Effekte durch RNAi-vermittelten *knock-down* des Robo1-Rezeptors beziehungsweise Neutralisierung von endogenem Slit2 im Tumor erzielt wurden (siehe Abbildung 1).

Die translationale Relevanz dieser experimentellen Daten wurde eindrucksvoll durch klinisch-pathologische Analysen an Patientenproben bestätigt. Diese korrelierten niedrige Slit2 mRNA Expressionswerte in humanen Pankreastumoren mit einem vermehrten Auftreten von Lymphknotenmetastasen und einem höheren Anteil befallener Lymphknoten; indessen wurden hohe Slit2 Werte in Pankreastumoren gemessen, die keine lymphatische Metastasierung aufwiesen.

Um die Effekte des Slit2-Robo Systems auf die wechselseitige Interaktion von Tumorzellen mit neuronalen Zellen zu charakterisieren, implementierten wir *in vitro* und *ex vivo* Modelle aus Kokulturen von neuronalen Zellen mit Tumorzellen. Unter Verwendung modifizierter Migrationskammern untersuchten wir zunächst die Rolle der Slit2-Robo Aktivität auf die gegenseitige Chemotaxis von Tumorzellen und neuronalen Zellen. Diese Studien zeigten, dass die induzierte Reexpression von Slit2 die gerichtete Migration von Tumorzellen entlang des chemoattraktiven Gradienten neurotroper Faktoren aus Nerven- und Schwannzellen und umgekehrt die gerichtete Migration neuronaler Zellen entlang des chemoattraktiven Gradienten von Tumorzellen hemmte.

Darüber hinaus ermöglichten dreidimensionale *ex vivo* Kokulturen von Tumorzellen mit isolierten Spinalganglien einerseits eine morphometrische Analyse des Aussprossens und der Projektion von Neuriten aus den Spinalganglien in Richtung der Tumorzellkolonien und andererseits die quantitative Erfassung der gerichteten Migration von Tumorzellen entlang kontaktierter Neuriten in Richtung der Ursprungsganglien. Im Detail wurde mit Hilfe von Lebendzell- und Zeitrafferaufnahmen die gerichtete Wanderung individueller Tumorzellen entlang der Neuriten verfolgt, und die Motilität von Tumorzellen im Bezug auf die Parameter Geschwindigkeit, Migrationsdistanz und Direktionalität der Tumorzellbewegung quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass Tumorzellen, die den Kontakt mit Neuriten eingegangen sind, eine größere Distanz zurücklegten und höhere Migrationsgeschwindigkeiten im Vergleich zu Tumorzellen ohne Neuritenkontakt erreichten. Hingegen verringerte die Reexpression von Slit2 die Geschwindigkeit und zurückgelegte Distanz der Tumorzellen im Rahmen der Wanderung entlang der Neuriten.

Zusammenfassend charakterisieren diese experimentellen und translationalen Daten eine klinisch äußerst relevante Funktion des entwicklungsbiologisch konservierten Slit2-Robo *axon guidance* Systems im Rahmen der Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen entlang der beiden klinisch bedeutsamen vaskulären und neuronalen Ausbreitungswege. Sie legen darüber hinaus nahe, dass eine verminderte Slit2-Robo Aktivität im Pankreaskarzinom einen Tumorphänotyp mit vermehrter (Lymph-)angiogener Metastasierung und neuraler Invasion begünstigt.

2.5. Der Fibronektin Rezeptor $\alpha 5\beta 1$ Integrin vermittelt Wachstumskontrolle gastrointestinaler Tumorzellen durch Modulation der Tumorzell-Matrix Interaktion

Galectin-1 interacts with the $\alpha 5\beta 1$ fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27.

Fischer C, Sanchez-Ruderisch H, Welzel M, Wiedenmann B, Sakai T, André S, Gabius HJ, Khachigian L, Detjen KM, Rosewicz S. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):37266-77. (79)

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411580200>

Integrine sind heterodimere, transmembranäre Rezeptoren der Zelloberfläche, die spezifische Liganden der Extrazellulärmatrix erkennen und binden (80). Dabei besitzen Integrine selbst keine intrinsische katalytische Aktivität, sondern rekrutieren verschiedenste Signal- und Adapterproteine. Indem sie Liganden der Extrazellulärmatrix mit dem Aktinzytoskelett verankern, steuern Integrine ganz entscheidend die Adhäsion und Migration von Epithelzellen auf unterschiedlichen Substraten der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran (80). Über ihre Funktion in der Adhäsion hinaus initiieren und modulieren Integrine auch intrazelluläre Signalwege. So leiten sie über die Rekrutierung und Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK) und der Tyrosinkinase *Scr* die Signale der Extrazellulärmatrix an die klassischen mitogenen Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktionskaskaden weiter (81). Dabei reguliert das Zusammenwirken von Signalen der Integrine mit Signalkaskaden anderer Wachstumsfaktor-abhängigen Tyrosinkinase Rezeptoren an der Zelloberfläche den Zellzyklus und die Proliferation der Zielzelle (80, 82).

Als Rezeptor für Fibronektin besitzt das $\alpha 5\beta 1$ Integrin eine wesentliche Funktion im Rahmen der embryonalen Epitheldifferenzierung und der physiologischen Epithelhomöostase (beispielsweise im Rahmen der Wundheilung). Dies erklärt auch, warum $\alpha 5\beta 1$ Integrin unter physiologischen Umständen in den wenigsten adulten Epithelien nachweisbar ist, hingegen aber in vielen Tumoren eine verstärkte Expression von $\alpha 5\beta 1$ vorliegt (83). Interessanterweise korreliert in manchen Tumorarten das Ausmaß der Expression von $\alpha 5\beta 1$ Integrin mit der Tumorprogression und einem verkürzten Überleben (83-85).

Eigene Studien identifizierten nun Galectin-1 als neuen Bindungspartner für $\alpha 5\beta 1$ Integrin. Galectin-1 gehört zur Familie der endogenen Lektine, die an Kohlenhydratanteile der Extrazellulärmatrix binden und sich durch die Spezifität für β -Galaktoside als gemeinsames Merkmal auszeichnen (86). In diesem Zusammenhang wiesen nun unsere Studien dem Fibronektinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ Integrin eine neue Funktion bei der Wachstumskontrolle epithelialer Tumorzellen zu, die durch die kohlenhydratabhängige Interaktion zwischen Integrinen und endogenen Liganden der Extrazellulärmatrix des Tumormikromilieus modifiziert werden kann.

Unter Verwendung von gastrointestinalen Tumorzellmodellen mit ektopter Überexpression beziehungsweise Depletion der $\alpha 5$ Integrin Untereinheit belegen unsere Daten, dass die Interaktion von Galectin-1 mit $\alpha 5\beta 1$ Integrin an der Oberfläche von Tumorzellen eine Modifizierung des Musters

der Integrin-vermittelten Signaltransduktion bewirkt, die in ihrer biologischen Konsequenz zu einem $\alpha 5\beta 1$ -abhängigen G1 Zellzyklusarrest und einer Wachstumsinhibition der Tumorzellen führt.

Mechanistisch konnte der wachstumshemmende Effekt von Galektin-1 auf die $\alpha 5\beta 1$ -abhängige Inhibition der Aktivität des kanonischen Ras-MEK-ERK Signalwegs und demzufolge auf eine transkriptionelle Induktion der p21 und p27 Expression, zweier Tumorsuppressormoleküle mit Schlüsselfunktion in der Zellzyklusregulation, zurückgeführt werden. Die molekularbiologische Charakterisierung des p27 Promoters mittels 5'-Deletionskonstrukten in Reporter- und DNA-Bindungsstudien identifizierte ein Galektin-1/ $\alpha 5\beta 1$ -abhängiges Element innerhalb des p27 Promoters mit zwei für die Promoteraktivität entscheidenden Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aus der Gruppe der Sp1 Faktoren. Im Detail führte die verminderte Aktivität der Ras-MEK-ERK Signalkaskade zu einer verstärkten DNA-Bindungskapazität und transkriptionellen Aktivität von Sp1 Transkriptionsfaktoren am Galektin-1/ $\alpha 5\beta 1$ responsiven Promoterelement und folglich zu einer gesteigerten Aktivität der p27 Transkription und Expression.

Im Kontext der karbohydratabhängigen Interaktion von Tumorzellen mit stromalen Liganden des Tumormikromilieus weisen diese Daten dem $\alpha 5\beta 1$ Fibronektin Rezeptor an der Oberfläche von Tumorzellen eine bisher noch nicht beschriebene tumorbiologische Funktion zu, die auf einer Galektin1-abhängigen Modifizierung der Integrin-vermittelten Kontrolle des Zellzyklus und der Proliferation epithelialer Tumorzellen beruht.

3. Diskussion

3.1. Evaluierung des angiogenen Wachstumsfaktors PIGF als prognostischer Biomarker, therapeutisches Zielmolekül und Marker für Therapieresistenz

Die Charakterisierung der pleiotropen Wirkmechanismen des krankheitsspezifischen VEGF Homologs PIGF beleuchtet eindrucksvoll den Einfluss zellulärer und molekularer Interaktionen zwischen Tumorzellen und stromalen Tumorkompartimenten für die Progression und Metastasierung solider Tumoren sowie für die Entstehung spezifischer Tumorresistenzen gegen zielgerichtete antiangiogene Therapien.

Dabei schreiben genetische und pharmakologische Studien PIGF aus dem Tumorstroma eine relevante tumorbiologische Funktion zu (11, 18, 23). Tatsächlich führt die Inaktivierung von stromalem PIGF zu einer Verminderung von Tumorwachstum und Metastasierung (18, 87), während die transgene Überexpression von stromalem PIGF Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung experimenteller Tumoren in der Maus fördert (11, 88). Mechanistisch liegen diesen Effekten in erster Linie eine PIGF-vermittelte Aktivierung von Endothelzellen, hämatopoietischen Vorläuferzellen und tumorassoziierten Makrophagen zugrunde (11, 20). Darüber hinaus konnte für die *de novo* Expression von PIGF im Tumor auch eine klinisch relevante Rolle als prognostischer Parameter identifiziert werden. Demnach korrelieren hohe PIGF mRNA und Proteinspiegel mit einem verkürzten Überleben bei Patienten mit Magen-, kolorektalem, hepatozellulärem und Mammakarzinom (11, 21, 22). Hingegen untersuchten nur wenige Studien zirkulierende PIGF Serumspiegel hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit; diese assoziierten hohe PIGF Serumspiegel mit einer ungünstigen Prognose beim Nierenzellkarzinom (89) und hohe präoperative PIGF Serumspiegel mit einem verminderten rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben nach kurativer Resektion bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (90, 91).

Angesichts einer außergewöhnlich starken Vaskularisierung neuroendokriner Tumoren (NETs) gewannen Konzepte zur therapeutischen Hemmung von Angiogenese sowie die Entschlüsselung angioregulatorischer Mechanismen in NETs besondere Bedeutung. Neben VEGF, dessen angiogene Schlüsselrolle gut etabliert ist (2, 92, 93), wurde auch eine Mitbeteiligung von Angiopoietinen, PDGF und HIF-1 α für die Angiogenese in NETs beschrieben (38, 94, 95). In dieser Hinsicht zeichneten sich Unterschiede zwischen den beiden großen Gruppen der pankreatischen und der im Dünndarm lokalisierten NETs ab (96). Während beispielsweise VEGF in intestinalen NETs stark exprimiert wird, erscheint das Ausmaß der VEGF Expression in pankreatischen NETs vergleichsweise gering, korreliert invers mit der Gefäßdichte und besitzt keine prognostische Aussagekraft.

Eigene Untersuchungen an retrospektiven und prospektiven Patientenkollektiven belegen nun, dass PIGF Serumspiegel nicht nur in der Gruppe der pankreatischen, sondern auch bei intestinalen NETs signifikant erhöht und mit einem verminderten Gesamtüberleben beziehungsweise einer verkürzten Dauer des progressionsfreien Erkrankungsintervalls assoziiert sind (65). Unsere Analysen legen insbesondere für die klinisch äußerst bedeutsame heterogene Gruppe der Patienten mit G2 Tumoren (Histologisches Grading entsprechend einem Ki-67-basierten Proliferationsindex von 2-

20%) dar, dass normale PIGF Serumspiegel mit einer außerordentlich guten Prognose verbunden sind, während Patienten mit pathologisch erhöhten PIGF Serumwerten erheblich kürzere Überlebenszeiten und progressionsfreie Erkrankungsintervalle aufweisen (65). Somit könnten zirkulierende PIGF Spiegel für G2 Tumoren, für die momentan keine gesicherten Parameter zur Abschätzung des weiteren Krankheitsverlaufs zur Verfügung stehen, ein leicht zugänglicher Biomarker zur Risikostratifizierung und Zuweisung von Patienten zu prognostischen Subgruppen darstellen, um eine bessere Einschätzung für angemessene Nachsorgeintervalle und möglicherweise auch für die Therapiewahl vorzunehmen.

Nicht nur wegen ihrer ausgeprägten Vaskularisierung ist ein tieferes Verständnis der Regulation der Angiogenese neuroendokriner Tumoren von enormer Bedeutung. Gerade der vergleichsweise langsame Progress mit langjährigen Krankheitsverläufen vieler NETs erfordert häufig eine langfristige Therapie, bei der die Entwicklung spezifischer Therapieresistenzen einerseits und die zum Teil erheblichen Nebenwirkungen der zugelassenen Therapien andererseits ungelöste klinische Probleme darstellen.

Um so mehr sprechen in diesem Zusammenhang wesentliche Eigenschaften für PIGF als attraktives Zielmolekül bei NETs: (1) Präklinische Daten weisen die Inhibition von PIGF mittels neutralisierender anti-PIGF Antikörper als wirksame Therapiestrategie zur Hemmung von Tumorwachstum und Metastasierung in unterschiedlichen syngenen Mausmodellensystemen aus (11, 23, 87, 97-101). Vergleichbare Effekte konnten auf die präklinische Situation bei NETs übertragen werden. So führte die exogene Stimulation von NET Zelllinien *in vitro* zu einer Zunahme der Proliferation, Migration und Koloniebildung, die mit dem neutralisierenden Antikörper gegen PIGF aufgehoben werden konnte. *In vivo* hatte der Einsatz von anti-PIGF Antikörpern eine Reduktion des Wachstums und der Metastasierung orthotoper Pankreas-NETs in der Maus zur Folge und spricht damit für die Relevanz von PIGF als therapeutisches Zielmolekül in NETs (65). (2) Die ursprüngliche Annahme, dass antiangiogene Therapien aufgrund der genetischen Stabilität von Endothelzellen keine Resistenzen induzieren, musste angesichts zahlreicher Studien, die eine kompensatorische Induktion angiogener Faktoren (beispielsweise FGF, SDF1, und Il-8) unter antiangiogenen Therapien nachwies, revidiert werden (10, 13, 28, 29). In diesem Zusammenhang belegen eigene Arbeiten einen mehr als zehnfachen Anstieg der PIGF Expression im Serum und im Tumor von Mäusen nach therapeutischer Hemmung des VEGF-VEGFR2 Signalwegs und weisen nach, dass die daraus resultierende PIGF-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung proangiogener Makrophagen ganz wesentlich zur Entstehung der Tumorresistenz gegen VEGF-gerichtete antiangiogene Therapien beitragen (23). Eine vergleichbare Induktion zirkulierender PIGF Spiegel wurde auch im Serum von Patienten mit Glioblastom, Kolon- und Nierenzellkarzinom unter antiangiogenen Therapien dokumentiert (23-27). (3) Antiangiogene Therapien, die auf einer Hemmung des VEGF-VEGFR2 Signalwegs beruhen, gehen zum Teil mit erheblichen und lebensbedrohlichen Nebenwirkungen einher, da dieser Signalweg neben seiner proangiogenen Funktion im Tumor auch unerlässlich für die Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase in gesunden Organen ist (14, 15, 102). PIGF hingegen spielt eine redundante Rolle für das physiologische Gefäßwachstum (11, 18), so dass die Inhibition von PIGF ausschließlich pathologische Tumorgefäße betrifft. Das Ausbleiben von Nebenwirkungen als Folge einer Hemmung von PIGF zeigt sich nicht nur in Mäusen, in denen die Therapie mit anti-

PIGF Antikörpern keine nachteiligen Auswirkungen auf das physiologische Gefäßsystem hatte (11, 23), sondern wurde zwischenzeitlich auch in klinischen Studien mit dem humanisierten anti-PIGF Antikörper TB-403 (ThromboGenics NV, Belgien) am Menschen bestätigt (103, 104).

Angesichts der beschriebenen genetischen, pharmakologischen und klinischen Beobachtungen erscheinen Strategien zur therapeutischen Inhibition von PIGF vielversprechend, um Tumoren zu behandeln, die Resistenzen gegen zielgerichtete antiangiogene Therapien entwickeln. Betrachtet man darüber hinaus die Eigenschaften von PIGF als krankheitsspezifischen Faktor, ist es vorstellbar, dass der zu erwartende Nutzen einer therapeutischen Inhibition von PIGF ohne wesentliche zusätzliche Nebenwirkungen in der Krebstherapie eingesetzt werden kann. Tatsächlich ist die Vermeidung therapiebedingter Komorbidität, die möglicherweise für den einzelnen Patienten ein größeres Risiko als die eigentliche Tumorerkrankung selbst darstellt, gerade bei Patienten mit NETs, die häufig eine dauerhafte und unter Umständen sogar jahrzehntelange Therapie bedürfen, von grundlegender klinischer Relevanz.

3.2. Molekulare und zelluläre Effektoren der Tumorzell-Stroma Interaktion bei der Lymphangiogenese und lymphatischen Metastasierung

Die Metastasierung in peripankreatische Lymphknoten hat sich in den vergangenen Jahren als ein unabhängiger prognostischer Parameter für einen ungünstigen Krankheitsverlauf nach kurativer Resektion von Patienten mit Pankreaskarzinom entwickelt (40, 41). Aus der Familie der VEGF Wachstumsfaktoren wurden zunächst VEGF-C und VEGF-D als Schlüsselfaktoren für die Lymphangiogenese identifiziert. Ihnen konnte im Folgenden auch eine wesentliche Rolle bei der lymphatischen Metastasierung zugewiesen werden (32, 33). In diesem Zusammenhang beschäftigten sich eigene Arbeiten mit der Etablierung eines neuartigen Modells, das erstmalig den Prozess der embryonalen Lymphangiogenese in *xenopus laevis* Larven morphologisch und funktionell beschrieb und darüber hinaus eine gestörte Entwicklung embryonaler Lymphgefäße nach Geninaktivierung von VEGF-C und VEGF-D nachwies (30, 31). Schließlich belegten transgene Tiermodelle und *knock-out* Studien in der Maus eine führende Rolle von VEGF-C und VEGF-D bei der tumorassoziierten Lymphangiogenese und der lymphatischen Metastasierung des Pankreaskarzinoms, aber auch anderer solider Tumoren (32-34). Die klinische Relevanz dieser experimentellen Daten wurde durch Beobachtungen bestätigt, die erhöhte VEGF-C und VEGF-D Spiegel mit dem Ausmaß der lymphatischen Metastasierung und einer ungünstigeren Prognose in diesen Patienten korrelierten (33).

Während sich zunächst die Tumorzelle selbst als VEGF-C produzierende Einheit im Focus experimenteller Untersuchungen befand, wurde zwischenzeitlich gezeigt, dass insbesondere Zellen des Tumorstroma, allen voran die tumorassoziierten Makrophagen, wesentlich an der Sekretion von VEGF-C beteiligt sind und auf diese Weise Lymphangiogenese im Tumor stimulieren können (5). Vor diesem Hintergrund legten unsere Studien einen Wirkmechanismus dar, der die lymphangiogene Wirkung von PIGF im Tumorstroma auf die Rekrutierung und Aktivierung tumorassoziiierter Makrophagen zurückführt. Demgemäß stimuliert PIGF die Aktivität VEGFR1-exprimierender Makrophagen, die wiederum durch Sekretion des lymphangiogenen Faktors VEGF-C

Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung im Pankreaskarzinommodell der Maus propagieren (11, 23).

Abseits der PlGF-VEGFR1 und VEGF-VEGFR2 Liganden-Rezeptor Systeme weisen eigene Daten Ang2 eine klinisch bedeutsame Rolle als prognostischer Parameter beim Pankreaskarzinom zu. So korrelierten sie hohe Ang2 Serumspiegel mit einer vermehrten lymphatischen Metastasierung und einem verkürzten Gesamtüberleben der Patienten (77). Diese klinischen Beobachtungen wurden eindrucksvoll durch experimentelle Tumorstudien in der Maus ergänzt, die eine gesteigerte Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung als Folge der ektopten Ang2 Überexpression in orthotopen Pankreastumoren nachwies (77). Ähnliche Funktionen von Ang2 konnten zwischenzeitlich auch in anderen Tumorentitäten dokumentiert werden. So ging die Überexpression von Ang2 mit einer vermehrten Metastasierung in Maustumormodellen des Melanoms (39), des Mammakarzinoms (105), des hepatozellulären Karzinoms (106) und neuroendokriner Tumoren einher (38). Auch konnten gesteigerte Ang2 Serumspiegel mit einer vermehrten lymphatischen Metastasierung bei Patienten mit Karzinomen der Brust (107), des Magens (108) und der Prostata (109) assoziiert werden.

Darüber hinaus wiesen unsere Studien bislang noch nicht beschriebene Regulations- und Wirkmechanismen von Ang2 im Pankreaskarzinom nach. Sie identifizierten TGF β als starken Aktivator des Ang2 Promoters und ermöglichten infolgedessen die Entwicklung eines Konzeptes, das eine parakrine TGF β -vermittelte Induktion von Ang2 im Rahmen der wechselseitigen Tumorzell-Stroma Interaktion beschreibt (77). Darüber hinaus belegen RNA-Chip Analysen an Pankreastumorzellen ein konsistentes Muster von Ang2-induzierten Genen (darunter Integrin β 1 Untereinheit, Vitronektin und uPAR), die wesentlich an der Regulation der Zelladhäsion, der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmotilität beteiligt sind (77). Angesichts einer gleichzeitig verminderten RNA Expression von Genen, deren Verlust im Besonderen mit der epithelial-mesenchymalen Transformation (Caveolin-1, DCC) einhergeht (110, 111), scheint ein Zusammenhang zwischen der TGF β -vermittelten transkriptionellen Aktivierung von Ang2 und der malignen Progression des Pankreaskarzinoms vorstellbar. Unsere Daten verankern demzufolge auto-/parakrine Regulationsmechanismen der Ang2 Promoterkontrolle innerhalb des Tumorstroma und skizzieren ein mechanistisches Erklärungsmodell für die im tierexperimentellen und klinisch-translationalen Ansatz beobachteten Effekte eines Ang2-vermittelten prometastatischen Phänotyps im Pankreaskarzinom.

Interessanterweise legen unsere Daten darüber hinaus auch Tie2-unabhängige Effekte von Ang2 nahe (77) und entsprechen damit Arbeiten, die im Mausmodell des Mammakarzinoms einen prometastatischen Effekt von Ang2 über die Bindung an den Fibronektin Rezeptor α 5 β 1 Integrin nachweisen konnten (105). In diesem Zusammenhang belegen unsere Genexpressionsanalysen eine Ang2-abhängige Induktion der β 1 Untereinheit des α 5 β 1 Integrins in Pankreastumorzellen (77). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es sich hierbei um ein koordiniertes Muster der Ang2-vermittelten Genexpression handelt, das vorzugsweise zu einer Aktivierung solcher Signalkaskaden führt, die schließlich in der Bildung eines prometastatischen Tumormikromilieus und einer gesteigerten Migration von Tumorzellen zusammenlaufen. Auch ist vorstellbar, dass Ang2 über die Bindung an den Fibronektin Rezeptor α 5 β 1 Integrin bisher noch nicht dokumentierte mitogene

Signalwege aktiviert. Zumindest weisen eigene Daten die Modifikation der $\alpha 5\beta 1$ Signaltransduktion in Abhängigkeit des Liganden nach (79).

Die Ergebnisse weisen zirkulierenden Ang2 Serumspiegeln darüber hinaus eine klinisch relevante Funktion als prognostischer Biomarker zu (77). Vor dem Hintergrund, dass bis heute für keine der antiangiogenen Substanzklassen, die auf einer Inhibition des VEGF-VEGFR2 Signalwegs beruhen, ein Überlebensvorteil für Patienten mit Pankreaskarzinom nachgewiesen werden konnte (112-114), legen unsere Daten eine klinisch relevante Funktion von Ang2 als leicht zugängliches therapeutisches Zielmolekül für die adjuvante oder palliative Therapie des Pankreaskarzinoms nahe. Angesichts erster klinischer Erfolge einer pharmakologischen Inhibition des Ang-Tie Systems, könnten Ang2-gerichtete Therapien eine alternative Strategie zur antiangiogenen und antimetastatischen Behandlung des Pankreaskarzinoms entweder als Monotherapie oder in Kombination mit VEGF-VEGFR2 basierten Therapien darstellen (115, 116).

3.3. Neurovaskuläre Schnittstelle im Pankreaskarzinom

Die Charakterisierung zellulärer und molekularer Mechanismen der tumorassoziierten Angiogenese und später auch der tumorassoziierten Lymphangiogenese brachte uns ein vertieftes Verständnis des Wachstums und der Metastasierung von Tumoren und ermöglichte gleichzeitig den Entwurf neuartiger Therapiekonzepte mit dem Ziel, Tumorerkrankungen durch eine Hemmung des tumorassoziierten Blut- und Lymphgefäßsystems effektiver und zielgerichteter behandeln zu können (2, 5, 8). Erst in jüngerer Zeit erlangte der Vorgang der neuralen Invasion vermehrt Aufmerksamkeit, als erstmalig molekulare Mechanismen aufgeklärt werden konnten, welche die neurale Invasion als eigenständigen und von der lymphatischen und hämatogenen Metastasierung unabhängigen Ausbreitungsweg von Tumorzellen charakterisierten (17).

Sequenzierungsanalysen im Pankreaskarzinom entschlüsselten vor Kurzem eine ungeahnte Häufung von Mutationen in Genen aus der Familie der *axon guidance* Faktoren und identifizierten im Speziellen eine hohe Prävalenz an Mutationen in Genen des Slit2-Robo1/2 Signalwegs (117, 118). Verminderte Expressionsniveaus von Komponenten dieser Signalwege wurden darüber hinaus mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert (117). In perfekter Ergänzung zu diesen Beobachtungen bestätigen nun unsere experimentellen Daten eine signifikant verminderte Slit2 mRNA Expression im Pankreaskarzinom. Darüber hinaus weisen unsere Studien erstmalig klinisch äußerst relevante Konsequenzen der deregulierten Slit2-Robo Aktivität im Pankreaskarzinom nach, die sich aus der bekannten physiologischen Funktion der Slit2-Robo Faktoren als repulsives *axon* und *vessel guidance* Liganden-Rezeptor System ableiten lassen (48, 54, 119). Demzufolge setzt die induzierte Reexpression von Slit2 in Tumorzellen die Fähigkeit orthotoper Pankreastumoren zur Metastasierung und Gefäßneubildung herab, während hingegen die funktionelle Inhibition der Slit2-Robo Aktivität (durch Robo1-Rezeptor *knock-down* beziehungsweise durch Neutralisierung von endogenem Slit2) eine deutlich gesteigerte Invasion, Metastasierung und Vaskularisierung der Tumoren zur Folge hat (78). In bemerkenswerter Weise lassen sich diese experimentellen Daten auf die klinische Situation bei Patienten mit Pankreaskarzinom übertragen: niedrige Slit2 mRNA Spiegel im Tumor korrelieren mit einer vermehrten lymphatischen Metastasierung, während Tumoren ohne

Lymphknotenmetastasen hohe Slit2 mRNA Werte aufweisen. Ähnliche Beobachtungen wurden zwischenzeitlich als Folge der epigenetischen Inaktivierung von Slit2 im kolorektalen, Mamma- und Bronchialkarzinom beschrieben (63, 64), in denen verminderte Slit2 mRNA Spiegel mit einer vermehrter Metastasierung und einem verkürzten Überleben assoziiert waren (54, 119).

Im Besonderen weisen unsere Ergebnisse Slit2 eine neuartige und bisher unbekannt Funktion bei der wechselseitigen Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des tumoreigenen neuronalen Netzwerks zu. So hemmt Slit2 die gegenseitige und durch neurotrope Faktoren vermittelte Chemotaxis zwischen Tumorzellen, Neuronen und Schwanzzellen. Lebendzellmikroskopische und durch Zeitraffertechniken gestützte Untersuchungen an dreidimensionalen Modellen für neurale Invasion belegten darüber hinaus, dass die Reexpression von Slit2 die Fähigkeit von Tumorzellen zur gerichteten Wanderung entlang wachsender Neuriten hemmt (78).

Die physiologische Funktion des Slit2-Robo Systems im adulten Pankreas bleibt gegenwärtig mangels experimenteller Daten spekulativ. Expressionsanalysen in *xenopus laevis* weisen zumindest auf ein distinktes räumliches und zeitliches Expressionsmuster von Slit2 während der embryonalen Pankreasentwicklung hin und implizieren für Slit-Robo Signale eine Rolle bei der Fusion der beiden embryonalen Pankreasanlagen (120). Expressionsanalysen an Mikrodissektaten des adulten Pankreas belegen darüber hinaus die konservierte Expression von Slit2 in Pankreasepithelzellen (121, 122), während eigene immunhistochemische Analysen den differentiellen Nachweis der Slit2 Rezeptoren Robo1 und Robo4 im epithelialen beziehungsweise vaskulären Kompartiment des Pankreas verorten (78). Insbesondere spricht der Nachweis von Robo1 in tumorversorgenden Nerven für die Möglichkeit einer regulatorischen Funktion des Slit2-Robo1 Liganden-Rezeptor System bei der Homöostase des neuronalen Netzwerks im Pankreas. Angesichts der Ergebnisse aus Geninaktivierungsstudien, die eine gestörte epitheliale Differenzierung und ein aberrantes Epithelwachstum im Rahmen der duktaalen Morphogenese der Brustdrüse, der Lungen und der Nieren als Folge des Verlusts der Slit2-Robo Aktivität beschreiben (55, 56, 123), ist eine physiologisch repulsive Funktion des Slit2-Robo Liganden-Rezeptor Systems im Pankreas naheliegend. Entsprechend hätte der Verlust der Slit2 Expression im Pankreaskarzinom durch den Wegfall Slit2-Robo-vermittelter, hemmender Kontrollmechanismen eine gesteigerte Motilität von Tumorzellen und Endothelzellen mit dem Resultat einer vermehrten Metastasierung zur Folge; insbesondere wäre in diesem Szenario auch eine verstärkte Interaktion von Tumorzellen mit dem neuronalen Netzwerk des Tumors vorstellbar, die sich in einer gesteigerten neuronalen Invasion widerspiegeln könnte.

Mechanistisch lässt sich der inhibitorische Effekt von Slit2 auf die Metastasierung orthotoper Pankreastumore sowohl mit der direkten Hemmung der Motilität von Tumorzellen, als auch einer verminderten tumorassoziierten Angiogenese erklären (78). Richtungsweisende Erkenntnisse zum Verständnis einer angiogenen Funktion des Slit2-Robo4 Signalwegs lieferten Untersuchungen an Robo4 *knock-out* Mäusen, die belegten, dass Slit2-Robo4 Signale wesentlich zur Stabilisierung und Reifung physiologischer Gefäße beitragen, wohingegen der Verlust der Slit2-Robo4 Aktivität pathologische Angiogenese noch zusätzlich verstärkt (62). Offenbar scheinen Slit2-Robo4 Signale für die Feinjustierung der angiogenen Effekte von VEGF verantwortlich zu sein und eine überschießende VEGF-vermittelte Angiogenese zu verhindern (62). Vereinbar mit einer solchen

Slit2-vermittelten, gefäßstabilisierenden Funktion belegen nun eigene Untersuchungen, dass Slit2 die VEGF induzierte Migration und Lamellopodienbildung von Endothelzellen *in vitro* hemmt. Sie weisen darüber hinaus einen antiangiogenen Effekt von Slit2 in orthotopen Pankreastumoren nach, während die funktionelle Inhibition von endogenem Slit2 eine gesteigerte Gefäßdichte im Tumor zur Folge hat (78). Allerdings stehen diese experimentellen Beobachtungen im Widerspruch mit anderen publizierten Daten, die einen chemoattraktiven und proangiogenen Effekt von Slit2 auf Endothelzellen *in vitro* nachwiesen (59, 124, 125). Erklärungsansätze für diese diskrepanten Befunde sind gegenwärtig noch spekulativ und implizieren unter anderem die Möglichkeit (i) einer Kofaktor- und kontextabhängigen Umkehrung der Slit2 Effekte, wie sie im Hinblick auf Ephrin-A1 oder andere Matrix-Komponenten beschrieben wurde (126-128) und (ii) einer differentiellen und vom Tumormikromilieu abhängigen Prozessierung von Slit2 in die proteolytischen N- und C-terminalen Slit2-Fragmente mit möglicherweise unterschiedlichen oder gar antagonistisch wirkenden tumorbiologischen Effekten (126, 127), wie sie gegenwärtig in unserer Arbeitsgruppe erforscht werden.

Neben einer starken Vaskularisierung zeichnet sich das Pankreasparenchym durch eine außerordentlich dichte Innervierung aus. Dieses neuronale Netzwerk unterliegt permanenten strukturellen Umbauvorgängen, um die vaskulären und epithelialen Parenchymstrukturen ausreichend mit axonalen Nervenendigungen zu versorgen und eine regelrechte exokrine und endokrine Funktion des Pankreas aufrechtzuerhalten (129). Interessanterweise lassen sich im Rahmen von Störungen dieser neuronalen Plastizität im Pankreaskarzinom eine Hypertrophie der Nervenfasern und eine vermehrte Nervendichte im Tumorgewebe nachweisen (130). Der Verlust geordneter epithelialer Parenchymstrukturen des Pankreas, wie er beispielsweise im Rahmen maligner oder entzündlicher Umbauvorgänge stattfindet, scheint mit einem chaotischen und überzähligen Aussprossen von Neuriten und axonalen Endigungen einherzugehen. Diese Beobachtungen legen eine gegenseitige Abhängigkeit und Kontrolle zwischen dem Pankreasepithel einerseits und dem neuronalen Netzwerk des Pankreas andererseits nahe (129).

In diesem Zusammenhang weisen folgende Aspekte auf eine Rolle des repulsiven Slit2-Robo *axon guidance* Systems bei der Aufrechterhaltung und der Plastizität des neuronalen Netzwerkes im adulten Pankreas hin: (i) Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster der Slit2-Robo *axon guidance* Faktoren reguliert die Migration solcher Zellen aus der Neuralleiste, aus denen sich später selektiv das enterische und sensorische Nervensystem des Pankreas entwickelt (131). Dabei werden Robo1-exprimierende Neuralleistenzellen daran gehindert in angrenzende Gewebe hoher Slit2 Konzentrationen einzuwandern; (ii) GDNF, das im Rahmen der embryonalen Morphogenese unter der Kontrolle der Slit2-Robo Signaltransduktion steht (55), wurde kürzlich als wesentlicher Regulator für die neuronale Kolonisation des Pankreas, nicht aber anderer Darmabschnitte, charakterisiert (132); (iii) Slit2 wird in den Inselzellen des Pankreas gebildet und trägt maßgeblich am Zusammenspiel des Inselzellapparats mit dem autonomen Nervensystem bei (133). Angesichts der konservierten Expression sowohl von Slit2 in Pankreasepithelzellen (121, 122), als auch von Robo1 in Nervenfasern des adulten Pankreas ist es naheliegend, dass Slit2-Robo Signale an der Regulation der Homöostase des neuronalen Netzwerkes im adulten Pankreas beteiligt sind. Geninaktivierungsstudien belegen zumindest eine Beteiligung der repulsiven Aktivität von Slit-Robo

Faktoren bei der Faszikulierung von Motorneuronen im Rahmen der Muskelinnervierung und weisen somit erstmalig *axon guidance* Faktoren eine funktionelle Rolle bei der Innervierung peripherer Organe zu (134). Vor diesem Hintergrund belegen unveröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass konditionierte Medien von Pankreastumorzellen die Aussprossung und das Wachstum von Neuriten aus primären Neuronen *ex vivo* stimulieren, während die Reexpression von Slit2 in Pankreastumorzellen diese neurotrophen Effekte wirkungsvoll aufhebt.

Zusammengefasst legen unsere experimentellen und translationalen Daten nahe, dass die verminderte Expression von Slit2 im Pankreaskarzinom Tumorzellen und Stromazellen dazu befähigen könnte, repulsive Slit2-Robo-vermittelte Navigationssignale zu meiden und auf diese Weise vermehrt die vaskulären und neuronalen infrastrukturellen Leitstrukturen als Metastasierungswege zu verwenden.

4. Zusammenfassung

Die vorgestellten Forschungsarbeiten beleuchten aus unterschiedlichen Blickwinkeln die Bedeutung der wechselseitigen Kommunikation und Interaktion von Tumorzellen mit den vaskulären und neuronalen Kompartimenten des Tumorstroma für das Wachstum und die Metastasierung gastrointestinaler Tumoren (siehe Abbildung 1). Unter Verwendung experimenteller *in vitro* und *in vivo* Tumormodelle sowie komplexer *ex vivo* Kokulturen aus Tumor- und Nervenzellen identifizieren sie Effektoren der Tumorzell-Stroma Interaktion und entschlüsseln dabei molekulare und zellbiologische Wirkungsweisen klinisch äußerst relevanter Liganden-Rezeptor Systeme und Signalmoleküle, die im translationalen Ansatz vielversprechende Kandidaten für die Evaluierung sowohl prognostischer Parameter als auch therapeutischer Zielmoleküle zur Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung entlang der Blutgefäße und Nervenbahnen darstellen und darüber hinaus als Modellsysteme zur Erklärung spezifischer Resistenzmechanismen zielgerichteter antiangiogener Therapien dienen.

Im Detail werden im Kontext der wechselseitigen Tumorzell-Stroma Interaktion die pleiotropen Effekte des krankheitsspezifischen VEGF Homologs PIGF auf die Bildung von Blut- und Lymphgefäßen und die lymphatische Metastasierung charakterisiert, und die Rolle von PIGF als prognostischer Biomarker, therapeutisches Zielmolekül und Mediator der Resistenzentwicklung gegen antiangiogene Therapien evaluiert. Darüber hinaus wird eine wesentliche Funktion des (lymph)endothelspezifischen Ang2-Tie2 Liganden-Rezeptor Systems für die Lymphangiogenese und die lymphatische Metastasierung beschrieben, und die Bedeutung des Fibronektin Rezeptors $\alpha 5\beta 1$ Integrin für die Wachstumskontrolle im Rahmen der Interaktion von Tumorzellen mit der stromalen Extrazellulärmatrix untersucht. Schließlich wird erstmalig mit der Charakterisierung der aus der Neurogenese bekannten *axon guidance* Moleküle Slit2 und Robo ein entwicklungsbiologisch konserviertes Liganden-Rezeptor System vorgestellt, das die unmittelbare Interaktion von Tumorzellen mit dem neuronalen Netzwerk des Tumorstroma beeinflusst und auf diese Weise neurale Invasion als eigenständigen Metastasierungsweg in Tumoren reguliert.

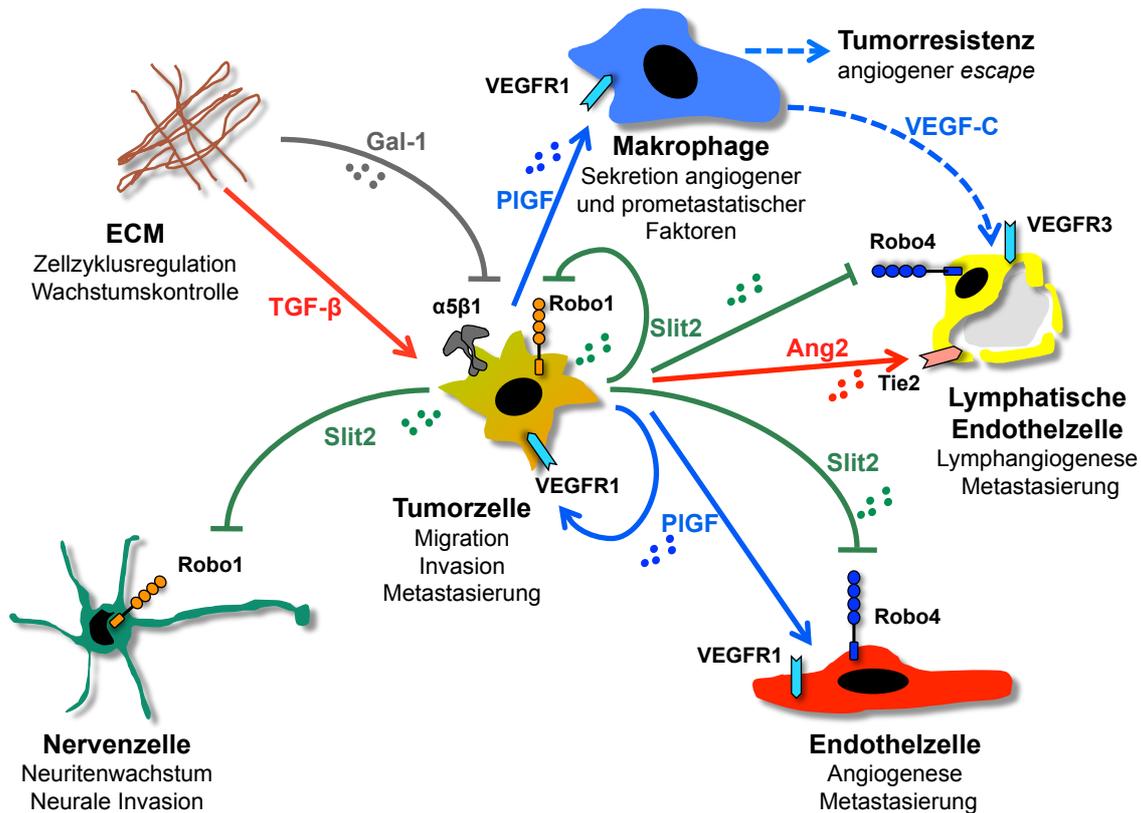


Abbildung 1: Molekulare und zelluläre Effektoren der Tumorzell-Stroma Interaktion im Rahmen der Angiogenese, Metastasierung und neuronalen Invasion. Pleiotrope Effekte von *placental growth factor* (PIGF) auf Angiogenese und Metastasierung (blaue Pfeile): PIGF stimuliert direkt (durchgezogene Pfeile) die Proliferation und Motilität von Endothelzellen und führt zur einer gesteigerten tumorassoziierten Angiogenese. Darüber hinaus fördert PIGF die Proliferation und Migration von VEGFR1-exprimierenden Tumorzellen in einer auto-/parakrinen Weise. PIGF rekrutiert und aktiviert tumorassoziierte Makrophagen, die wiederum durch Sekretion des lymphangiogenen Faktors VEGF-C Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung propagieren. Diese indirekt durch PIGF vermittelten Effekte (gestrichelte Pfeile) tragen darüber hinaus durch die kompensatorische Expression angiogener Wachstumsfaktoren aus Makrophagen (*angiogener escape*) zur Entwicklung spezifischer Tumorresistenzen gegen antiangiogene Therapien bei. Effekte des Angiopoietin-2 (Ang2)-Tie2 Liganden-Rezeptor Systems auf Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung (rote Pfeile): Stromales TGF β stimuliert die transkriptionelle Aktivität des Ang2 Promoters in Tumorzellen. Die *de novo* Expression von Ang2 fördert tumorassoziierte Lymphangiogenese und lymphatische Metastasierung. Der Fibronectinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ Integrin vermittelt Wachstumskontrolle von Tumorzellen durch Galektin-1 (Gal-1)-abhängige Modifikation der Interaktion zwischen Integrinen und endogenen Liganden der Extrazellulärmatrix, ECM (grauer Pfeil). Effekte des repulsiven Slit2-Robo *axon guidance* Liganden-Rezeptor Systems an der vaskulären und neuronalen Schnittstelle des stromalen Tumormikromilieus (grüne Pfeile): Die experimentelle Reexpression von Slit2 in Tumorzellen hemmt Neuritenwachstum und Angiogenese und vermindert die Metastasierung von Tumorzellen entlang der vaskulären und neuronalen infrastrukturellen Netzwerke des Tumorstroma. Der Verlust der Slit2 Expression im Tumor propagiert folglich durch den Wegfall repulsiver Slit2-Robo Signale einen prometastatischen Tumorphänotyp mit gesteigerter Metastasierung und neuraler Invasion.

5. Literaturangaben

1. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
2. Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936.
3. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439.
4. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-442.
5. Alitalo, K. 2011. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 17:1371-1380.
6. Alitalo, K., and Carmeliet, P. 2002. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1:219-227.
7. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335-2342.
8. Carmeliet, P., and Jain, R.K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298-307.
9. Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W., and Loeffler, J.S. 2006. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 3:24-40.
10. Bergers, G., and Hanahan, D. 2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8:592-603.
11. Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B., and Carmeliet, P. 2008. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 8:942-956.
12. Loges, S., Mazzone, M., Hohensinner, P., and Carmeliet, P. 2009. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell* 15:167-170.
13. Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. 2009. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15:220-231.
14. Verheul, H.M., and Pinedo, H.M. 2007. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer* 7:475-485.
15. Force, T., Krause, D.S., and Van Etten, R.A. 2007. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer* 7:332-344.
16. Martinez, A., Marin, V.G., Junquera, S.R., Martinez-Murillo, R., and Freire, M. 2005. The contributions of Santiago Ramon y Cajal to cancer research - 100 years on. *Nat Rev Cancer* 5:904-909.
17. Bapat, A.A., Hostetter, G., Von Hoff, D.D., and Han, H. 2011. Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. *Nat Rev Cancer* 11:695-707.
18. Carmeliet, P., Moons, L., Lutun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., et al. 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7:575-583.
19. Roncal, C., Buyschaert, I., Gerdes, N., Georgiadou, M., Ovchinnikova, O., Fischer, C., Stassen, J.M., Moons, L., Collen, D., De Bock, K., et al. 2010. Short-term delivery of anti-PlGF antibody delays progression of atherosclerotic plaques to vulnerable lesions. *Cardiovasc Res* 86:29-36.
20. Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., et al. 2001. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7:1194-1201.
21. Parr, C., Watkins, G., Boulton, M., Cai, J., and Jiang, W.G. 2005. Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer* 41:2819-2827.

22. Wei, S.C., Tsao, P.N., Yu, S.C., Shun, C.T., Tsai-Wu, J.J., Wu, C.H., Su, Y.N., Hsieh, F.J., and Wong, J.M. 2005. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut* 54:666-672.
23. Fischer, C., Jonckx, B., Mazzone, M., Zacchigna, S., Loges, S., Pattarini, L., Chorianopoulos, E., Liesenborghs, L., Koch, M., De Mol, M., et al. 2007. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 131:463-475.
24. Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.J., Zhu, M., et al. 2007. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 11:83-95.
25. Motzer, R.J., Michaelson, M.D., Redman, B.G., Hudes, G.R., Wilding, G., Figlin, R.A., Ginsberg, M.S., Kim, S.T., Baum, C.M., DePrimo, S.E., et al. 2006. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24:16-24.
26. Willett, C.G., Boucher, Y., Duda, D.G., di Tomaso, E., Munn, L.L., Tong, R.T., Kozin, S.V., Petit, L., Jain, R.K., Chung, D.C., et al. 2005. Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J Clin Oncol* 23:8136-8139.
27. Gerstner, E.R., Eichler, A.F., Plotkin, S.R., Drappatz, J., Doyle, C.L., Xu, L., Duda, D.G., Wen, P.Y., Jain, R.K., and Batchelor, T.T. 2010. Phase I trial with biomarker studies of vatalanib (PTK787) in patients with newly diagnosed glioblastoma treated with enzyme inducing anti-epileptic drugs and standard radiation and temozolomide. *J Neurooncol*.
28. Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., and Hanahan, D. 2005. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8:299-309.
29. Ebos, J.M., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. 2009. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15:232-239.
30. Ny, A., Koch, M., Schneider, M., Neven, E., Tong, R.T., Maity, S., Fischer, C., Plaisance, S., Lambrechts, D., Heligon, C., et al. 2005. A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med* 11:998-1004.
31. Ny, A., Koch, M., Vandevelde, W., Schneider, M., Fischer, C., Diez-Juan, A., Neven, E., Geudens, I., Maity, S., Moons, L., et al. 2008. Role of VEGF-D and VEGFR-3 in developmental lymphangiogenesis, a chemicogenetic study in *Xenopus* tadpoles. *Blood* 112:1740-1749.
32. Koch, M., Dettori, D., Van Nuffelen, A., Souffreau, J., Marconcini, L., Wallays, G., Moons, L., Bruyere, F., Oliviero, S., Noel, A., et al. 2009. VEGF-D deficiency in mice does not affect embryonic or postnatal lymphangiogenesis but reduces lymphatic metastasis. *J Pathol* 219:356-364.
33. Kurahara, H., Takao, S., Maemura, K., Shinchi, H., Natsugoe, S., and Aikou, T. 2004. Impact of vascular endothelial growth factor-C and -D expression in human pancreatic cancer: its relationship to lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 10:8413-8420.
34. Mandriota, S.J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D.G., et al. 2001. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 20:672-682.
35. Zheng, W., Aspelund, A., and Alitalo, K. 2014. Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *J Clin Invest* 124:878-887.
36. Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:165-177.
37. Gale, N.W., Thurston, G., Hackett, S.F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M.H., Jackson, D., et al. 2002. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3:411-423.

38. Detjen, K.M., Rieke, S., Deters, A., Schulz, P., Rexin, A., Vollmer, S., Hauff, P., Wiedenmann, B., Pavel, M., and Scholz, A. 2010. Angiopoietin-2 promotes disease progression of neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 16:420-429.
39. Helfrich, I., Edler, L., Sucker, A., Thomas, M., Christian, S., Schadendorf, D., and Augustin, H.G. 2009. Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 15:1384-1392.
40. Smith, R.A., Bosonnet, L., Ghaneh, P., Raraty, M., Sutton, R., Campbell, F., and Neoptolemos, J.P. 2008. Preoperative CA19-9 levels and lymph node ratio are independent predictors of survival in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Surg* 25:226-232.
41. Stathis, A., and Moore, M.J. 2010. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 7:163-172.
42. Erkan, M., Hausmann, S., Michalski, C.W., Fingerle, A.A., Dobritz, M., Kleeff, J., and Friess, H. 2012. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:454-467.
43. Chatterjee, D., Katz, M.H., Rashid, A., Wang, H., Iuga, A.C., Varadhachary, G.R., Wolff, R.A., Lee, J.E., Pisters, P.W., Crane, C.H., et al. 2012. Perineural and intraneural invasion in posttherapy pancreaticoduodenectomy specimens predicts poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 36:409-417.
44. Michl, P., and Gress, T.M. 2013. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut* 62:317-326.
45. Neesse, A., Michl, P., Frese, K.K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M.A., Lolkema, M.P., Buchholz, M., Olive, K.P., Gress, T.M., et al. 2011. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60:861-868.
46. Gil, Z., Cavel, O., Kelly, K., Brader, P., Rein, A., Gao, S.P., Carlson, D.L., Shah, J.P., Fong, Y., and Wong, R.J. 2010. Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves. *J Natl Cancer Inst* 102:107-118.
47. Ceyhan, G.O., Demir, I.E., Altintas, B., Rauch, U., Thiel, G., Muller, M.W., Giese, N.A., Friess, H., and Schafer, K.H. 2008. Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 374:442-447.
48. Carmeliet, P., and Tessier-Lavigne, M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436:193-200.
49. Larrivee, B., Freitas, C., Suchting, S., Brunet, I., and Eichmann, A. 2009. Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. *Circ Res* 104:428-441.
50. Carmeliet, P., De Smet, F., Loges, S., and Mazzone, M. 2009. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* 6:315-326.
51. Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Tear, G. 1998. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215.
52. Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., and Chedotal, A. 2010. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 137:1939-1952.
53. Chedotal, A. 2007. Slits and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621:65-80.
54. Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chedotal, A. 2011. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 11:188-197.
55. Grieshammer, U., Le, M., Plump, A.S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., and Martin, G.R. 2004. SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6:709-717.
56. Macias, H., Moran, A., Samara, Y., Moreno, M., Compton, J.E., Harburg, G., Strickland, P., and Hinck, L. 2011. SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev Cell* 20:827-840.
57. Bedell, V.M., Yeo, S.Y., Park, K.W., Chung, J., Seth, P., Shivalingappa, V., Zhao, J., Obara, T., Sukhatme, V.P., Drummond, I.A., et al. 2005. roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6373-6378.
58. Park, K.W., Morrison, C.M., Sorensen, L.K., Jones, C.A., Rao, Y., Chien, C.B., Wu, J.Y., Urness, L.D., and Li, D.Y. 2003. Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev Biol* 261:251-267.

59. Suchting, S., Heal, P., Tahtis, K., Stewart, L.M., and Bicknell, R. 2005. Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. *FASEB J* 19:121-123.
60. Huminiecki, L., Gorn, M., Suchting, S., Poulsom, R., and Bicknell, R. 2002. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 79:547-552.
61. Legg, J.A., Herbert, J.M., Clissold, P., and Bicknell, R. 2008. Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis* 11:13-21.
62. Jones, C.A., London, N.R., Chen, H., Park, K.W., Sauvaget, D., Stockton, R.A., Wythe, J.D., Suh, W., Larrieu-Lahargue, F., Mukoyama, Y.S., et al. 2008. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat Med* 14:448-453.
63. Dallol, A., Da Silva, N.F., Viacava, P., Minna, J.D., Bieche, I., Maher, E.R., and Latif, F. 2002. SLIT2, a human homologue of the Drosophila Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. *Cancer Res* 62:5874-5880.
64. Dallol, A., Morton, D., Maher, E.R., and Latif, F. 2003. SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 63:1054-1058.
65. Hilfenhaus, G., Gohrig, A., Pape, U.F., Neumann, T., Jann, H., Zdunek, D., Hess, G., Stassen, J.M., Wiedenmann, B., Detjen, K., et al. 2013. Placental growth factor supports neuroendocrine tumor growth and predicts disease prognosis in patients. *Endocr Relat Cancer* 20:305-319.
66. Modlin, I.M., Oberg, K., Chung, D.C., Jensen, R.T., de Herder, W.W., Thakker, R.V., Caplin, M., Delle Fave, G., Kaltsas, G.A., Krenning, E.P., et al. 2008. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 9:61-72.
67. Rindi, G., and Wiedenmann, B. 2012. Neuroendocrine neoplasms of the gut and pancreas: new insights. *Nat Rev Endocrinol* 8:54-64.
68. Niederle, M.B., Hackl, M., Kaserer, K., and Niederle, B. 2010. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification: an analysis based on prospectively collected parameters. *Endocr Relat Cancer* 17:909-918.
69. Hauso, O., Gustafsson, B.I., Kidd, M., Waldum, H.L., Drozdov, I., Chan, A.K., and Modlin, I.M. 2008. Neuroendocrine tumor epidemiology: contrasting Norway and North America. *Cancer* 113:2655-2664.
70. Barakat, M.T., Meeran, K., and Bloom, S.R. 2004. Neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 11:1-18.
71. Marion-Audibert, A.M., Barel, C., Gouysse, G., Dumortier, J., Pilleul, F., Pourreyron, C., Hervieu, V., Poncet, G., Lombard-Bohas, C., Chayvialle, J.A., et al. 2003. Low microvessel density is an unfavorable histoprognostic factor in pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology* 125:1094-1104.
72. Couvelard, A., O'Toole, D., Turley, H., Leek, R., Sauvanet, A., Degott, C., Ruzniewski, P., Belghiti, J., Harris, A.L., Gatter, K., et al. 2005. Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *Br J Cancer* 92:94-101.
73. Poncet, G., Villaume, K., Walter, T., Pourreyron, C., Theillaumas, A., Lepinasse, F., Hervieu, V., Cordier-Bussat, M., Scoazec, J.Y., and Roche, C. 2009. Angiogenesis and tumor progression in neuroendocrine digestive tumors. *J Surg Res* 154:68-77.
74. Yao, J.C., Shah, M.H., Ito, T., Bohas, C.L., Wolin, E.M., Van Cutsem, E., Hobday, T.J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E.G., et al. 2011. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 364:514-523.
75. Raymond, E., Dahan, L., Raoul, J.L., Bang, Y.J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C., Valle, J., Metrakos, P., Smith, D., Vinik, A., et al. 2011. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 364:501-513.
76. Raymond, E., Garcia-Carbonero, R., Wiedenmann, B., Grande, E., and Pavel, M. 2013. Systemic therapeutic strategies for GEP-NETS: what can we expect in the future? *Cancer Metastasis Rev.*

77. Schulz, P., Fischer, C., Detjen, K.M., Rieke, S., Hilfenhaus, G., von Marschall, Z., Bohmig, M., Koch, I., Kehrberger, J., Hauff, P., et al. 2011. Angiopoietin-2 drives lymphatic metastasis of pancreatic cancer. *FASEB J* 25:3325-3335.
78. Gohrig, A., Detjen, K.M., Hilfenhaus, G., Korner, J.L., Welzel, M., Arsenic, R., Schmuck, R., Bahra, M., Wu, J.Y., Wiedenmann, B., et al. 2014. Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Res* 74:1529-1540.
79. Fischer, C., Sanchez-Ruderisch, H., Welzel, M., Wiedenmann, B., Sakai, T., Andre, S., Gabius, H.J., Khachigian, L., Detjen, K.M., and Rosewicz, S. 2005. 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* 280:37266-37277.
80. Desgrosellier, J.S., and Cheresch, D.A. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10:9-22.
81. Cabodi, S., del Pilar Camacho-Leal, M., Di Stefano, P., and Defilippi, P. 2010. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer* 10:858-870.
82. Giancotti, F.G., and Tarone, G. 2003. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:173-206.
83. Adachi, M., Taki, T., Higashiyama, M., Kohno, N., Inufusa, H., and Miyake, M. 2000. Significance of integrin α_5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 6:96-101.
84. Ren, J., Xu, S., Guo, D., Zhang, J., and Liu, S. 2013. Increased expression of $\alpha_5\beta_1$ -integrin is a prognostic marker for patients with gastric cancer. *Clin Transl Oncol*.
85. Dingemans, A.M., van den Boogaart, V., Vosse, B.A., van Suylen, R.J., Griffioen, A.W., and Thijssen, V.L. 2010. Integrin expression profiling identifies integrin α_5 and β_1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 9:152.
86. Astorgues-Xerri, L., Riveiro, M.E., Tijeras-Raballand, A., Serova, M., Neuzillet, C., Albert, S., Raymond, E., and Faivre, S. 2014. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev* 40:307-319.
87. Schmidt, T., Kharabi Masouleh, B., Loges, S., Cauwenberghs, S., Fraisl, P., Maes, C., Jonckx, B., De Keersmaecker, K., Kleppe, M., Tjwa, M., et al. 2011. Loss or inhibition of stromal-derived PIGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1(+) leukemia. *Cancer Cell* 19:740-753.
88. Marcellini, M., De Luca, N., Riccioni, T., Ciucci, A., Orecchia, A., Lacal, P.M., Ruffini, F., Pesce, M., Cianfarani, F., Zambruno, G., et al. 2006. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. *Am J Pathol* 169:643-654.
89. Matsumoto, K., Suzuki, K., Koike, H., Okamura, K., Tsuchiya, K., Uchida, T., Takezawa, Y., Kobayashi, M., and Yamanaka, H. 2003. Prognostic significance of plasma placental growth factor levels in renal cell cancer: an association with clinical characteristics and vascular endothelial growth factor levels. *Anticancer Res* 23:4953-4958.
90. Wei, S.C., Liang, J.T., Tsao, P.N., Hsieh, F.J., Yu, S.C., and Wong, J.M. 2009. Preoperative serum placenta growth factor level is a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 52:1630-1636.
91. Rahbari, N.N., Reissfelder, C., Muhlbaier, M., Weidmann, K., Kahlert, C., Buchler, M.W., Weitz, J., and Koch, M. 2011. Correlation of Circulating Angiogenic Factors with Circulating Tumor Cells and Disease Recurrence in Patients Undergoing Curative Resection for Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol* 18:2182-2191.
92. Ferrara, N., and Kerbel, R.S. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438:967-974.
93. Terris, B., Scoazec, J.Y., Rubbia, L., Bregeaud, L., Pepper, M.S., Ruzsniowski, P., Belghiti, J., Flejou, J., and Degott, C. 1998. Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. *Histopathology* 32:133-138.
94. Kulke, M.H. 2007. Clinical presentation and management of carcinoid tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 21:433-455; vii-viii.
95. Srirajaskanthan, R., Dancey, G., Hackshaw, A., Luong, T., Caplin, M.E., and Meyer, T. 2009. Circulating angiopoietin-2 is elevated in patients with neuroendocrine tumours and correlates with disease burden and prognosis. *Endocr Relat Cancer* 16:967-976.

96. Ploeckinger, U., Kloeppe, G., Wiedenmann, B., and Lohmann, R. 2009. The German NET-registry: an audit on the diagnosis and therapy of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 90:349-363.
97. Coenegrachts, L., Maes, C., Torrekens, S., Van Looveren, R., Mazzone, M., Guise, T.A., Bouillon, R., Stassen, J.M., Carmeliet, P., and Carmeliet, G. 2010. Anti-placental growth factor reduces bone metastasis by blocking tumor cell engraftment and osteoclast differentiation. *Cancer Res* 70:6537-6547.
98. Heindryckx, F., Bogaerts, E., Coulon, S.H., Devlies, H., Geerts, A.M., Libbrecht, L., Stassen, J.M., Carmeliet, P., Colle, I.O., and Van Vlierberghe, H.R. 2012. Inhibition of the placental growth factor decreases burden of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma in a transgenic mouse model. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 24:1020-1032.
99. Heindryckx, F., Coulon, S., Terrie, E., Casteleyn, C., Stassen, J.M., Geerts, A., Libbrecht, L., Allemeersch, J., Carmeliet, P., Colle, I., et al. 2013. The placental growth factor as a target against hepatocellular carcinoma in a diethylnitrosamine-induced mouse model. *J Hepatol* 58:319-328.
100. Snuderl, M., Batista, A., Kirkpatrick, N.D., Ruiz de Almodovar, C., Riedemann, L., Walsh, E.C., Anolik, R., Huang, Y., Martin, J.D., Kamoun, W., et al. 2013. Targeting placental growth factor/neuropilin 1 pathway inhibits growth and spread of medulloblastoma. *Cell* 152:1065-1076.
101. Van de Veire, S., Stalmans, I., Heindryckx, F., Oura, H., Tijeras-Raballand, A., Schmidt, T., Loges, S., Albrecht, I., Jonckx, B., Vinckier, S., et al. 2010. Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PIGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell* 141:178-190.
102. Eremina, V., Jefferson, J.A., Kowalewska, J., Hochster, H., Haas, M., Weisstuch, J., Richardson, C., Kopp, J.B., Kabir, M.G., Backx, P.H., et al. 2008. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 358:1129-1136.
103. Lassen, U., Nielsen, D.L., Sorensen, M., Winstedt, L., Niskanen, T., Stenberg, Y., Pakola, S., Stassen, J.M., and Glazer, S. 2012. A phase I, dose-escalation study of TB-403, a monoclonal antibody directed against PIGF, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 106:678-684.
104. Martinsson-Niskanen, T., Riisbro, R., Larsson, L., Winstedt, L., Stenberg, Y., Pakola, S., Stassen, J.M., and Glazer, S. 2011. Monoclonal antibody TB-403: a first-in-human, Phase I, double-blind, dose escalation study directed against placental growth factor in healthy male subjects. *Clin Ther* 33:1142-1149.
105. Imanishi, Y., Hu, B., Jarzynka, M.J., Guo, P., Elishaev, E., Bar-Joseph, I., and Cheng, S.Y. 2007. Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the alpha(5)beta(1) integrin-mediated pathway. *Cancer Res* 67:4254-4263.
106. Yoshiji, H., Kuriyama, S., Noguchi, R., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Yanase, K., Namisaki, T., Kitade, M., Uemura, M., Masaki, T., et al. 2005. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice. *Gut* 54:1768-1775.
107. Sfiligoi, C., de Luca, A., Cascone, I., Sorbello, V., Fuso, L., Ponzzone, R., Biglia, N., Audero, E., Arisio, R., Bussolino, F., et al. 2003. Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival. *Int J Cancer* 103:466-474.
108. Jo, M.J., Lee, J.H., Nam, B.H., Kook, M.C., Ryu, K.W., Choi, I.J., Kim, Y.W., and Bae, J.M. 2009. Preoperative serum angiopoietin-2 levels correlate with lymph node status in patients with early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 16:2052-2057.
109. Morrissey, C., True, L.D., Roudier, M.P., Coleman, I.M., Hawley, S., Nelson, P.S., Coleman, R., Wang, Y.C., Corey, E., Lange, P.H., et al. 2008. Differential expression of angiogenesis associated genes in prostate cancer bone, liver and lymph node metastases. *Clin Exp Metastasis* 25:377-388.
110. Sotgia, F., Williams, T.M., Schubert, W., Medina, F., Minetti, C., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. 2006. Caveolin-1 deficiency (-/-) conveys premalignant alterations in mammary epithelia, with abnormal lumen formation, growth factor independence, and cell invasiveness. *Am J Pathol* 168:292-309.
111. Jo, M., Lester, R.D., Montel, V., Eastman, B., Takimoto, S., and Gonias, S.L. 2009. Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell signaling. *J Biol Chem* 284:22825-22833.

112. Van Cutsem, E., Vervenne, W.L., Bennouna, J., Humblet, Y., Gill, S., Van Laethem, J.L., Verslype, C., Scheithauer, W., Shang, A., Cosaert, J., et al. 2009. Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 27:2231-2237.
113. Kindler, H.L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F., Mulcahy, M.F., O'Reilly, E., Wozniak, T.F., et al. 2010. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 28:3617-3622.
114. Costello, E., Greenhalf, W., and Neoptolemos, J.P. 2012. New biomarkers and targets in pancreatic cancer and their application to treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:435-444.
115. Hashizume, H., Falcon, B.L., Kuroda, T., Baluk, P., Coxon, A., Yu, D., Bready, J.V., Oliner, J.D., and McDonald, D.M. 2010. Complementary actions of inhibitors of angiotensin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* 70:2213-2223.
116. Brown, J.L., Cao, Z.A., Pinzon-Ortiz, M., Kendrew, J., Reimer, C., Wen, S., Zhou, J.Q., Tabrizi, M., Emery, S., McDermott, B., et al. 2010. A human monoclonal anti-ANG2 antibody leads to broad antitumor activity in combination with VEGF inhibitors and chemotherapy agents in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 9:145-156.
117. Biankin, A.V., Waddell, N., Kassahn, K.S., Gingras, M.C., Muthuswamy, L.B., Johns, A.L., Miller, D.K., Wilson, P.J., Patch, A.M., Wu, J., et al. 2012. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491:399-405.
118. Nones, K., Waddell, N., Song, S., Patch, A.M., Miller, D., Johns, A., Wu, J., Kassahn, K.S., Wood, D., Bailey, P., et al. 2014. Genome-wide DNA methylation patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma reveal epigenetic deregulation of SLIT-ROBO, ITGA2 and MET signaling. *Int J Cancer* 135:1110-1118.
119. Ballard, M.S., and Hinck, L. 2012. A roundabout way to cancer. *Adv Cancer Res* 114:187-235.
120. Jarikji, Z., Horb, L.D., Shariff, F., Mandato, C.A., Cho, K.W., and Horb, M.E. 2009. The tetraspanin Tm4sf3 is localized to the ventral pancreas and regulates fusion of the dorsal and ventral pancreatic buds. *Development* 136:1791-1800.
121. Tan, A.C., Jimeno, A., Lin, S.H., Wheelhouse, J., Chan, F., Solomon, A., Rajeshkumar, N.V., Rubio-Viqueira, B., and Hidalgo, M. 2009. Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol* 3:425-438.
122. Vincent, A., Omura, N., Hong, S.M., Jaffe, A., Eshleman, J., and Goggins, M. 2011. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 17:4341-4354.
123. Xian, J., Clark, K.J., Fordham, R., Pannell, R., Rabbitts, T.H., and Rabbitts, P.H. 2001. Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the Dutt1/Robo1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15062-15066.
124. Kaur, S., Castellone, M.D., Bedell, V.M., Konar, M., Gutkind, J.S., and Ramchandran, R. 2006. Robo4 signaling in endothelial cells implies attraction guidance mechanisms. *J Biol Chem* 281:11347-11356.
125. Sheldon, H., Andre, M., Legg, J.A., Heal, P., Herbert, J.M., Sainson, R., Sharma, A.S., Kitajewski, J.K., Heath, V.L., and Bicknell, R. 2009. Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors. *FASEB J* 23:513-522.
126. Nguyen Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Ma, L., Wang, K.H., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chedotal, A. 2001. Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J Neurosci* 21:4281-4289.
127. Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chedotal, A. 2001. Sensory axon response to substrate-bound Slit2 is modulated by laminin and cyclic GMP. *Mol Cell Neurosci* 17:1048-1058.
128. Dunaway, C.M., Hwang, Y., Lindsley, C.W., Cook, R.S., Wu, J.Y., Boothby, M., Chen, J., and Brantley-Sieders, D.M. 2011. Cooperative signaling between Slit2 and Ephrin-A1 regulates a balance between angiogenesis and angiostasis. *Mol Cell Biol* 31:404-416.

129. Fink, T., Di Sebastiano, P., Buchler, M., Beger, H.G., and Weihe, E. 1994. Growth-associated protein-43 and protein gene-product 9.5 innervation in human pancreas: changes in chronic pancreatitis. *Neuroscience* 63:249-266.
130. Ceyhan, G.O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I.E., Hinz, U., Muller, M.W., Giese, T., Buchler, M.W., Giese, N.A., et al. 2009. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology* 136:177-186 e171.
131. Giovannone, D., Reyes, M., Reyes, R., Correa, L., Martinez, D., Ra, H., Gomez, G., Kaiser, J., Ma, L., Stein, M.P., et al. 2012. Slits affect the timely migration of neural crest cells via Robo receptor. *Dev Dyn* 241:1274-1288.
132. Munoz-Bravo, J.L., Hidalgo-Figueroa, M., Pascual, A., Lopez-Barneo, J., Leal-Cerro, A., and Cano, D.A. 2013. GDNF is required for neural colonization of the pancreas. *Development* 140:3669-3679.
133. Yang, Y.H., Manning Fox, J.E., Zhang, K.L., MacDonald, P.E., and Johnson, J.D. 2013. Intraislet SLIT-ROBO signaling is required for beta-cell survival and potentiates insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:16480-16485.
134. Jaworski, A., and Tessier-Lavigne, M. 2012. Autocrine/juxtacrine regulation of axon fasciculation by Slit-Robo signaling. *Nat Neurosci* 15:367-369.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die mich auf dem Weg zur Habilitation begleitet und unterstützt haben. Insbesondere danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann, der mich sowohl beim Aufbau meiner eigenen Arbeitsgruppe, als auch bei der Ausübung meiner Forschungstätigkeit vorbehaltlos unterstützte.

Mein herzlicher Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Fred Luft für seine tatkräftige Unterstützung, ohne die der Aufbau meiner Forschungsgruppe am ECRC nicht möglich gewesen wäre.

Richtungsweisend für meine Forschungslaufbahn war die Arbeit als Postdoc bei Herrn Prof. Dr. Peter Carmeliet. Während meiner dreijährigen Tätigkeit in seinem Forschungslabor konnte ich mir ein breites Spektrum molekular-, zellbiologischer und tierexperimenteller Fertigkeiten aneignen. Ich danke ihm vor allem für das uneingeschränkte Vertrauen, das er in mich als Mitarbeiter gesetzt hat. Dieser Dank gilt auch den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, ohne deren Hilfe und Freundschaft die Forschungsarbeiten nicht hätten durchgeführt werden können. Dies gilt im Besonderen für Bart Jonckx, Annelii Ny, Massimiliano Mazzone und Femke Zwerts.

Den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe namentlich Martina Welzel, Andreas Göhrig, Andrea Behm und Georg Hilfenhaus möchte ich für eine konstruktive und stets freundschaftlich geprägte Teamarbeit danken. Ihr unermüdlicher persönlicher Einsatz hat entscheidend zum Gelingen unserer Forschungsprojekte beigetragen. Besonders zu Dank verpflichtet bin ich dabei Katharina Detjen. Ohne sie wäre weder der Aufbau unserer gemeinsamen Arbeitsgruppe, noch eine erfolgreiche Führung der Projektarbeit möglich gewesen.

Sehr herzlich bedanke ich mich schließlich bei meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung.

ERKLÄRUNG

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 24.09.2014

.....

Unterschrift