

**Der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1
(IGF-1R) und Histondeacetylasen (HDAC) als
Zielstrukturen für innovative Therapieansätze bei
gastrointestinalen Tumoren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Viola Baradari

aus Norden

Oktober 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans Scherübl

Disputation am 08.02.2008

Danksagung

Herrn Professor Dr. Scherübl danke ich sehr für die interessante Aufgabenstellung, die gute Betreuung und kontinuierliche Unterstützung und die konstruktiven Diskussionen, die mich stets zu Verbesserungen herausgefordert haben.

Herrn Professor Dr. Mutzel gilt mein Dank für die freundliche Übernahme des Referates dieser Arbeit und seine Hilfsbereitschaft bei Problemen und Fragen.

Bei Herrn Professor Dr. Pries möchte ich mich sehr bedanken für die Möglichkeit in den Laboren des Instituts für Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin arbeiten zu können.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden mit einem Graduiertenstipendium (GRK 276/3 „Signalerkennung und -umsetzung“) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und einem Stipendium der Sonnenfeld-Stiftung durchgeführt. Ich danke daher der DFG und der Sonnenfeld-Stiftung für die Förderung und ganz besonders dem Vorsitzenden der Sonnenfeld-Stiftung Herrn Professor Dr. Freiherr von Villiez für seine persönliche Betreuung.

Bei Herrn Dr. Michael Höpfner möchte ich mich vor allem für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die gute Betreuung meiner Arbeit im Labor bedanken. Seine Hilfsbereitschaft, sowie zahlreiche Anregungen und Diskussionen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke allen ehemaligen Mitgliedern der AG Scherübl, den Kardiologen aus dem Tibor-Diamantstein-Haus und allen neuen Kollegen aus der Physiologie für die gute Zusammenarbeit und die praktische Unterstützung im Laboralltag. Bei Antje Krahn bedanke ich mich für die RT-PCR-Untersuchungen und bei André Bosch, Benjamin Becker und Björn Hoffmann für ihre Unterstützung bei zellbiologischen Untersuchungen und der Datenverarbeitung. Weiterhin möchte ich mich auch bei Sylvia May und Sabine Hahn bedanken, die mir bei dem Umzug und der Einarbeitung im Institut für Physiologie sehr geholfen haben. Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Alexander Hüther, der mich in weiten Teilen dieser Arbeit sehr unterstützt hat, für die vielen nützlichen Tipps und Ratschläge, seine Hilfsbereitschaft und sein offenes Ohr.

Weiterhin danke ich meinen Freunden und meiner Schwester Stella für all die Aufmunterungen und den Rückhalt in guten wie in schlechten Zeiten. Bei Katja Zuther und Judith Hahn möchte ich mich außerdem noch für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, insbesondere meine Mutter, die mich während der ganzen Zeit sehr unterstützt haben und mich immer wieder motiviert und aufgebaut haben, wenn es mal nicht so gut lief.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gastrointestinale Tumore	1
1.1.1	Gastrointestinale neuroendokrine Tumore	1
1.1.2	Hepatozelluläre Karzinome	1
1.1.3	Cholangiozelluläre Karzinome	2
1.1.4	Kolorektale Karzinome	3
1.2	Zellzyklus und Apoptose und ihre Bedeutung bei der Karzinogenese	4
1.2.1	Tumorerkrankungen	4
1.2.2	Der Zellzyklus	5
1.2.3	Apoptose.....	6
1.3	Der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGF-1-Rezeptor) als Zielprotein der innovativen antineoplastischen Therapie	8
1.3.1	Wachstumsfaktoren	8
1.3.2	Das IGF-System	8
1.3.3	Der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGF-1R)	8
1.3.4	Die Bedeutung des IGF-1-Rezeptors in der Onkologie	11
1.3.5	Therapeutische Beeinflussung des IGF-1-Rezeptors	12
1.4	Histondeacetylasen (HDAC) als Zielstrukturen für innovative antineoplastische Therapien.....	15
1.4.1	Histone und ihre Bedeutung für die Genexpression.....	15
1.4.2	Die Rolle einer gestörten HDAC-Aktivität bei der malignen Transformation	16
1.4.3	HDAC-Inhibitoren – Biomodulatoren mit Antitumoraktivität.....	18
1.5	Ziel der Arbeit.....	20
2	MATERIAL & METHODEN	23
2.1	Material	23
2.1.1	Arzneistoffe	23
2.1.2	Antikörper	24
2.1.3	PCR-Primer	24
2.1.4	Chemikalien und Lösungen.....	25
2.1.5	Kommerziell erworbene Kit-Systeme	26
2.1.6	Zellmodelle.....	26
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Zellkulturverfahren.....	29
2.2.1.1	Passagieren der Zelllinien.....	29
2.2.1.2	Präparation von Primärzellkulturen aus Biopsaten von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren und kolorektalen Karzinomen.....	29
2.2.2	Nachweis der Rezeptorexpression.....	30

2.2.2.1	Nachweis der Genexpression mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)	30
2.2.2.2	Immunzytochemischer Nachweis der Rezeptorexpression	31
2.2.3	Untersuchungen zur Zellviabilität und Zellwachstum	32
2.2.3.1	Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität.....	32
2.2.3.2	Zellquantifizierung mittels Kristallviolett-Methode.....	32
2.2.3.3	Zytotoxizitätsnachweis durch Messung der LDH-Aktivität	33
2.2.3.4	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität	34
2.2.4	Apoptoseuntersuchungen	35
2.2.4.1	Semiquantitative Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials.....	35
2.2.4.2	Caspase-3-Aktivitätsbestimmung.....	36
2.2.4.3	Nachweis der DNA-Fragmentierung	37
2.2.5	Zellzyklusanalysen	38
2.2.6	Western Blot.....	38
2.2.6.1	Gewinnung von Proteinlysaten.....	38
2.2.6.2	Proteinbestimmung.....	39
2.2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.2.6.4	Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen	40
2.2.6.5	Immundetektion immobilisierter Proteine.....	40
2.2.7	Statistik	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Die Inhibition des insulinähnlichen Wachstumsfaktorrezeptors 1 (IGF-1R)	42
3.1.1	Expression des IGF-1R in humanen gastrointestinalen Tumorzellen	42
3.1.2	Nachweis der NVP-AEW541-induzierten Dephosphorylierung des IGF-1R	44
3.1.3	Antiproliferative Wirkung der IGF-1R-Inhibition bei gastrointestinalen Tumoren	44
3.1.4	Zytotoxische Effekte von IGF-1R-Inhibitoren.....	47
3.1.5	Apoptoseinduktion durch IGF-1R-Inhibition.....	49
3.1.6	Zellzyklusregulation durch IGF-1R-Inhibition	56
3.1.7	Regulation des Ras-Raf-MAPK- und des PI3-K-Signalwegs durch IGF-1R-Inhibition	59
3.1.8	Steigerung der antiproliferativen Effektivität von IGF-1R-Inhibitoren durch kombinationstherapeutische Ansätze	61
3.1.8.1	Wachstumshemmung durch IGF-1R-Inhibitoren in Kombination mit konventionellen Zytostatika oder Fluvastatin	61
3.1.8.2	Wachstumshemmung durch IGF-1R-Inhibitoren in Kombination mit EGFR-Inhibitoren.....	64
3.2	Die Inhibition der Histondeacetylaseaktivität	68
3.2.1	Antiproliferative Wirkung von HDAC-Inhibitoren bei gastrointestinalen Tumoren	68
3.2.2	Zytotoxische Effekte von HDAC-Inhibitoren	70
3.2.3	Apoptoseinduktion durch Hemmung der HDAC-Aktivität	72
3.2.4	Zellzyklusregulation durch HDAC-Inhibitoren	76

3.2.5	Steigerung der antiproliferativen Wirksamkeit von HDAC-Inhibitoren durch kombinationstherapeutische Ansätze	80
3.2.5.1	Wachstumshemmung durch HDAC-Inhibitoren in Kombination mit Somatostatinen oder Zytostatika	80
3.2.5.2	Wachstumshemmung durch HDAC-Inhibitoren in Kombination mit Sorafenib oder Bortezomib	83
4	DISKUSSION	85
4.1	Neue Therapieansätze zur Behandlung fortgeschrittener gastrointestinaler Tumore	85
4.2	IGF-1-Rezeptor-Inhibition als innovatives Therapiekonzept für gastrointestinale Tumore	87
4.2.1	Antiproliferative Wirkung des IGF-1-Rezeptor-Inhibitors NVP-AEW541 bei gastrointestinalen Tumorzelllinien	87
4.2.2	Effekte des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 auf die Apoptose.....	88
4.2.3	Zellzyklusmodulierende Wirkung durch IGF-1R-Inhibition	90
4.2.4	Regulation mitogener Signalwege durch IGF-1R-Inhibition	91
4.2.5	Der Einfluss einer IGF-1R-Inhibition durch NVP-AEW541 auf das Wachstum von Primärzellkulturen humaner gastrointestinaler Tumore.....	92
4.2.6	Kombinationstherapeutische Ansätze	92
4.2.6.1	IGF-1R Inhibition in Kombination mit konventionellen Zytostatika und Fluvastatin	92
4.2.6.2	Simultane Blockade des IGF-1-Rezeptors und des EGF-Rezeptors	95
4.3	Die Inhibition der Histondeacetylase-Aktivität als wirksames therapeutisches Prinzip bei gastrointestinalen Tumoren	96
4.3.1	Antiproliferative Wirkung von HDAC-Inhibitoren.....	96
4.3.2	Apoptoseinduktion durch HDAC-Inhibitoren.....	98
4.3.3	Zellzyklusmodulierende Wirkung durch HDAC-Inhibitoren	100
4.3.4	Kombinationstherapeutische Ansätze	102
4.3.4.1	HDAC-Inhibitoren mit Somatostatinen und konventionellen Zytostatika	102
4.3.4.2	HDAC-Inhibitoren in Kombination mit Sorafenib oder Bortezomib.....	103
4.4	Abschließende Betrachtungen und Ausblick	105
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	107
6	SUMMARY	110
7	LITERATURVERZEICHNIS	113
8	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	132
8.1	Originalarbeiten	132
8.2	Kurzveröffentlichungen und Posterabstracts.....	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ac-DEVD-AMC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methylcumarin
ADP	Adenosindiphosphat
AG1024	3-Brom-5- <i>t</i> -butyl-4-hydroxy-benzylidenmalonitril
AMP	Adenosinmonophosphat
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B cell lymphoma like protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CCC	<i>Cholangiocarcinoma</i> , Cholangiokarzinom
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CRC	<i>colorectal carcinoma</i> , kolorektales Karzinom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	fötales Kälberserum
HAT	Histonacetyltransferase
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i> , hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-2-ethan-sulfonsäure

IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IGF-1R	insulinähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor-1
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IgG	Immunglobulin G
JCRB	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
kD	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-) Ribonukleinsäure
n	Anzahl, Zahl
NaB	Natriumbutyrat
NET	neuroendokrine Tumore
Nonidet P-40	Octylphenolpolyethylenglycolether
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
POD	Peroxidased
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	<i>radio-immunoprecipitation-assay</i> Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TSA	Trichostatin A
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEN	Tris-EDTA-NaCl-Puff
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan
U	<i>unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolett