# Aus dem Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Neue pharmakologische Therapieansätze bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Ruwwe-Glösenkamp aus Halle/Westf.

Datum der Promotion: .....05.12.2014

## **INHALTSVERZEICHNIS**

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore	1
1.2	Etablierte Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumore	2
1.3	Der PI3K-AKT-Signalweg	3
1.3.1	Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)	3
1.3.2	PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog)	5
1.3.3	AKT/ Proteinkinase B (PKB)	5
1.3.3.1	Einfluss von AKT auf den Zellmetabolismus	6
1.3.3.2	Einfluss von AKT auf die Proteinsynthese	6
1.3.3.3	Einfluss von AKT auf Zellzyklus und Zellüberleben	7
1.3.4	mTOR (mammalian target of rapamycin)	7
1.3.5	Der PI3K-AKT-Signalweg und seine Rolle bei der Karzinogenese	8
1.3.6	Der PI3K-AKT-Signalweg und seine Rolle	
	bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren	9
1.3.7	Pharmakologische Inhibition des PI3K-AKT-Signalweges	9
1.3.7.1	PI3K-Inhibitoren	9
1.3.7.2	mTOR-Inhibitoren	10
1.3.7.3	AKT-Inhibitoren	10
1.4	Hitzeschockproteine	11
1.4.1	Hitzeschockprotein 90	11
1.4.2	Hitzeschockprotein 90 und seine Rolle bei der Karzinogenese	13
1.4.3	Inhibitoren von HSP90	14
1.5	Ziel der Arbeit	14
2	MATERIAL & METHODEN	16
2.1	Material	16
2.1.1	Arzneistoffe	16
2.1.2	Antikörper	16
2 1 3	PCR_Primer	17

2.1.4	Chemikalien und Lösungen	17
2.1.5	Kommerziell erworbene Kit-Systeme	18
2.1.6	Zellmodelle	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Passagieren der Zelllinien	19
2.2.2	Untersuchungen zur Zellviabilität und Zellwachstum	19
2.2.2.1	Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	19
2.2.2.2	Zellquantifizierung mittels Kristallviolett-Methode	20
2.2.2.3	Impedanz-basierte Echtzeit-Zellproliferationsanalyse	21
2.2.2.4	Zytotoxizitätsnachweis durch Messung der LDH-Aktivität	21
2.2.3	Immunoblot	22
2.2.3.1	Gewinnung von Proteinlysaten	23
2.2.3.2	Proteinbestimmung	23
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.2.3.4	Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen	25
2.2.3.5	Immundetektion immobilisierter Proteine	25
2.2.4	Nachweis von Genexpressionen	26
2.2.4.1	RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion)	26
2.2.4.2	DNA-Microarray	27
2.2.5	Migrationsassay	29
2.2.6	Apoptoseuntersuchungen	29
2.2.6.1	Fluoreszenzmikroskopischer Apoptoseachweis mittels Annexin V-FITC Assay	,29
2.2.6.2	Nachweis der DNA-Fragmentierung	30
2.2.7	Apoptose/ Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie (Flowzytometrie)	31
2.2.9	Chorioallantoismembran-Assay (CAM)	32
2.2.10	Statistik	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	AKT-Inhibition bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren	34
3.1.1	Einfluss von Triciribine auf die AKT-Aktivierung bei	
	gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren	34
3.1.2	Antiproliferative Wirkung von Triciribine auf	
	gastrointestinale neuroendokrine Tumore	35

3.1.3	Triciribine-induzierte Zytotoxizität	36
3.1.4	Induktion von Apoptose durch Triciribine	37
3.1.4.1	DNA-Fragmentierung	37
3.1.4.2	Annexin V-FITC Assay zum Nachweis früher Apoptose	38
3.1.4.3	Apoptose als "SubG1"-Fraktion in der Durchflusszytometrie nach	
	Triciribine-Behandlung	40
3.1.5	Zellzyklusveränderungen unter Triciribine-Behandlung	40
3.1.6	Effekt von Triciribine auf die Expression	
	verschiedener Tumor-assoziierter Gene	41
3.1.7	Korrelation von PTEN-Expression und Wirksamkeit von Triciribine	43
3.1.8	Triciribine-induzierte Migration von GEP-NET Zellen	44
3.1.9.1	Triciribine-basierte Kombinationstherapie mit klinisch	
	etablierten Chemotherapeutika	46
3.1.9.2	Kombination von Triciribine mit anderen signalwegspezifischen Pharmaka	47
3.1.10	In-vivo Effekte von Triciribine auf das Wachstum von GEP-NETs	49
3.2	HSP-90 Inhibition bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren	50
3.2.1	Antiproliferative Wirkung von IPI-504	
	auf gastrointestinale neuroendokrine Tumore	50
3.2.2	Regulation des IGF-1 Rezeptors unter IPI-504-Behandlung	51
3.2.3	Apoptose als "SubG1"-Fraktion nach IPI-504-Behandlung	52
3.2.4	IPI-504-induzierte Zellzyklusveränderungen	53
3.2.5	Effekt von IPI-504 auf die Expression	
	verschiedener Tumor-assoziierter Gene	53
3.2.6	Änderung im Migrationsverhalten neuroendokriner Tumorzellen	
	durch HSP-90-Inhibition	55
3.2.7	Kombination von IPI-504 mit anderen signalwegspezifischen Pharmaka	55
3.2.8	In-vivo Evaluation der antineoplastischen Effekte von IPI-504 auf GEP-NETs	57
4	DISKUSSION	59
4.1	Neue Therapiestrategien bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumore	n59
4.2	AKT-Inhibition als eine vielversprechende Option in der Therapie	
	Gastrointestinaler neuroendokriner Tumore	60

4.2.1	Triciribine vermindert die Menge an aktiviertem AKT und Cyclin D1 in G		
4.2.2	NETs  Triciribine hemmt die Proliferation von gastrointestinalen neuroendokri  Tumoren	inen	
4.2.3	Unterschiedliche Sensibilität der Zelllinien gegenüber Triciribine		
4.2.4	Induktion von Apoptose durch Triciribine bei GEP-NETs		
4.2.5	Zellzyklusarrest durch AKT-Inhibition		
4.2.6	Migrationshemmung durch Triciribine bei GEP-NETs		
4.2.7	Kombination etablierter Chemotherapeutika mit Triciribine		
4.2.7	Kombination von Triciribine mit anderen signalwegspezifischen Pharmaka		
4.2.9	In-vivo Evaluation der antineoplastischen Effekte von Triciribine auf GEP-NET	67	
4.3	HSP-90-Inhibition bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren68		
4.3.1	Proliferationshemmde Effekte von IPI-504		
	bei verschiedenen GEP-NET-Zelllinien	68	
4.3.2	Einfluss von IPI-504 auf die Konzentration bestimmter Proteine	68	
4.3.3	IPI-504 induziert Apoptose bei GEP-NETs		
4.3.4	HSP90-Inhibition induziert einen Zellzyklusarrest bei GEP-NETs6		
4.3.5	Migrationshemmung von GEP-NETs durch HSP-90-Inhibition		
4.3.6	Kombination von IPI-504 mit anderen signalwegspezifischen Pharmaka7		
4.3.7	In-vivo Evaluation der antineoplastischen Effekte von IPI-504 auf GEP-NETs	71	
4.4	Abschließende Betrachtungen und Ausblick	71	
5	LITERATURVERZEICHNIS	73	
6	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	84	
7	LEBENSLAUF	86	
8	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	88	
9	DANKSAGUNG	89	

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

17-AAG 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin)

17-DMAG 17-dimethylamino demethoxygeldanamycin hydrochlorid

4E-BP1 eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

5-FU Fluorouracil

APAF1 apoptotic peptidase activating factor 1

BAD Bcl-2-associated death promoter BAX BCL2-associated X protein

BCA Bicinchoninsäure
BCL-2 B-cell lymphoma 2
BSA Bovines Serumalbumin

CDK cyclin dependent kinase

cDNA zirkuläre DNA

CI combination Index, Kombinationsindex

cRNA zyklische RNA

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

E2F1 E2F transcription factor 1

EB Ethidiumbromid

ECL enhanced chemiluminescence
EDTA Ethylendiamintetraacetat
EGF epidermal growth factor

EGFR epidermal growth factor receptor ELISA enzyme-linked-immunosorbent-assay

ERBB2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

FACS fluorescence activated cell sorting, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fetales Kälberserum FOXO Forkhead-Box O

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GEP-NET gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumor

GLUT4 Glukosetransporter 4

GSK3 Glycogen synthase kinase 3

HER2 human epidermal growth factor receptor 2

HSP Hitzeschockprotein

IC<sub>50</sub> inhibitory concentration, halbmaximale wachstumsinhibitorische

Konzentration

IGF-1 insulin like growth factor

IGF-1R insulin like growth factor receptor

IgG Immunglobulin G

kDa Kilodalton

LDH Laktatdehydrogenase

MDM2 murine double minute

MEN1 Multiple Endokrine Neoplasien Typ 1

MMP Martixmetalloproteinase

mRNA messenger RNA

mTOR mammalian target of rapamycin

mTORC1/2 mammalian target of rapamycin complex ½

NET neuroendokriner Tumor NSE neuronenspezifische Enolase NTP Desoxyribonukleosidtriphosphat

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

p-AKT phosphoryliertes AKT

PBS phosphate buffered saline, phosphatgepufferte

PCR Polymerase-Kettenreaktion
PDGF platelet derived growth factor

PDK1 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 PDPK1 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1

PI3K Phosphoinositid 3-Kinase

PIP2 Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphat PIP3 Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat

PKB Proteinkinase B

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

POD Peroxidase

PRAS40 proline rich AKT substrate, 40kDa PTEN Phosphatase und Tensin Homolog

PVDF Polyvinylidenfluorid

RAS Rat Sarcoma RB Retinoblastoma

RIPA Radio-Immunoprecipitation-Assay

RNA Ribonukleinsäure RTK Rezeptortyrosinkinase

RT-PCR Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktoin

SDS sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat

SEM standard error of mean, Standardfehler

TBS Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung

TNF tumor necrosis factor, Tumornekrosefaktor

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TSC2 Tuberöse Sklerose 2

UV Ultraviolett

VEGF vascular endothelial growth factor

WHO World Health Organization

#### **ABSTRAKT**

Die Behandlung von metastasierten gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GEP-NETs) ist weiterhin eine große klinische Herausforderung. Zusätzliche medikamentöse Interventionsmöglicheiten werden dringend benötigt. Die vermehrte Aktivierung des intrazellulären Phosphatidylinsositol-3-kinase (PI3K)-AKT Signalweg führt zu einem vermehrten Tumorwachstum und verhindert Apoptose bei verchiedenen Tumorarten. Weiterhin spielt der Signalweg eine wichtige Rolle in der Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika sowie bei der Angiogenese. Das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) ist ein wichtiger Regulator von AKT. Außerdem konnte bei vielen Tumoren eine Überexpression von HSP90 gezeigt werden. Auch hat die vermehrte Expression von HSP90 in Tumoren eine wichtige prognostische Bedeutung. Mittels Echtzeit-Proliferations-Assays untersuchten wir die Wirkung von Triciribine, einem AKT-Inhibitor, und IPI504, ein Inhibitor von HSP90, auf drei verschiedene gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumorzelllinien. Wir analysierten die Induktion von Apoptose und die Effekte der Substanzen auf verschiedene krebsassoziierte Genprodukte. Weiterhin untersuchten wir die Rolle des Enzymes PTEN als ein möglicher Prediktor für die Wirksamkeit einer AKT-Inhibition. Mögliche additive antineoplastische Effekte durch Kombination mit zytostatischen oder anderen enzymspezifischen Inhibitoren wurden untersucht. Auch die in vivo Effekte wurden Hühnermembranuntersuchung analysiert. Dabei zeigte sowohl die Inhibition von AKT, als auch die Hemmung von HSP90 einen antiproliferativen Effekt bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren. Die Kombination mit klassischen Zytostatika, also auch die anderen signalwegspezifischen Substanzen Kombination mit zeigten synergistische antiproliferative Effekte. In vivo Versuche bestätigten die antiproliferative Wirkung der beiden Substanzen. Die Expression von PTEN konnte als Prädiktor bezüglich der Sensitivität von GEP-NET-Zellen gegenüber einer AKT-Inhibition nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sowohl die AKT-Inhibition, als auch die HSP90-Inhibition in der Lage ist, das Wachstum von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumorzellen zu hemmen.

Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NET) is still unsatisfactory and innovative therapeutic approaches are urgently needed. Up-regulation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-AKT signaling facilitates tumor cell growth and inhibits cell demise. The AKT-pathway also plays an important role in cytostatic therapy resistance and response to hypoxia and angiogenesis. The Heat shock protein 90 (Hsp90) is an important regulator of AKT-activity. Furthermore, it is overexpressed in a wide range of tumors and an emerging target for the treatment of cancer. We therefore examined the potency of triciribine, an AKT inhibitor, and IPI504, a HSP90 inhibitor, in three distinct neuroendocrine gastrointestinal tumor cell lines, using real-time cell proliferation assays. Also, we investigated the induction of apoptosis and effects on a broad range of cancer-associated gene products. Furthermore, we characterized the role of PTEN as a possible predictor of sensitivity to triciribine in GEP-NETs. We looked for additive anti-neoplastic effects of the drugs when combined with conventional cytostatic drugs or other targeted drugs, affecting different molecules of the PI3K-AKT-pathway. We also assessed the potency of AKT- and HSP90 inhibition to slow tumor growth in vivo, by using the chick chorioallantoic membrane assay. Both, AKT- and HSP90 inhibition significantly suppressed growth in different neuroendocrine cell lines. Combinations with classic cytostatic drugs as well as drugs targeting other molecules of the PI3K-AKT-pathway led to synergistic anti-proliferative effects. Additional in vivoevaluations confirmed the anti-neoplastic potency of triciribine and IPI504. Expression of PTEN was shown to predict sensitivity of cells towards AKT inhibition. Thus, our data show that inhibition of the AKT-pathway as well as inhibition of HSP90 potently reduces the growth of GEP-NET cells alone or in combination therapies.

#### 1 EINLEITUNG

### 1.1 Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (*gastroenteropancreatic tumors* (GEP-NETs)) sind eine sehr heterogene Gruppe von Neoplasien des gesamten Magen-Darm-Traktes. Der allgemeinere Begriff "neuroendokrine Tumore" (NET) umfasst dagegen auch Tumore außerhalb des Gastrointestinaltraktes, z.B. der Lunge, die in ihrem biologischen Verhalten aber sehr ähnlich sind. Die ursprüngliche Bezeichnung "Karzinoid", 1907 zum ersten Mal von Oberndorfer beschrieben [2], findet heute immer noch uneinheitliche klinische Verwendung, wobei es zum Teil synonym für GEP-NETs benutzt wird, teilweise aber auch, um im engeren Sinne nur Serotonin-sezernierende Tumore zu beschreiben. Mutationsanalysen sowie zusätzliche klinische Daten haben zu neuen Klassifikation für GEP-NETs geführt, die von erheblicher prognostischer und therapeutischer Bedeutung sind [3-5].

Gemeinsame Eigenschaften der GEP-NETs sind die Expression von Antigenen, die sich auch bei Zellen des Nervensystems finden, wie z.B. die neuronenspezifische Enolase (NSE), Chromogranin A, B und C sowie Synaptophysin [6]. In ihrem klinischen Verhalten sind sie aber sehr unterschiedlich, von extrem langsam wachsenden, nicht metastasierenden Tumoren, bis zu sehr schnell wachsenden, schlecht differenzierten und metastasierenden, anaplastischen Neoplasien. Einige Tumore sezernieren dabei Hormone und biogene Amine, die sehr unterschiedliche Symptome auslösen können. So führt z.B. Serotonin beim "Karzinoidsyndrom" zu anfallsartiger Hautrötung, Atembeschwerden und Diarrhö, Gastrin bei Gastrinomen (Zollinger-Ellison-Syndrom) kann Ursache für Magenulzera sein, und Insulin beim Insulinom verursacht das rezidivierende Hypoglykämiesyndrom [7]. Insgesamt gibt es 13 verschiedene Zelltypen die unterschiedliche bioaktive Amine produzieren [8].

Mit einer Inzidenz von etwa 5:100.000 sind GEP-NETs eine relativ seltene Tumorentität [3, 9]. Allerdings ist ein Trend zu einer höheren Inzidenz in den letzten Jahrzehnten zu beobachten, der zwar zum Teil, aber nicht vollständig, durch eine verbesserte Diagnostik zu erklären ist [10]. Die meisten dieser Tumore treten sporadisch auf, doch gibt es einige, die im Zusammenhang mit familiären Syndromen vorkommen. So leiden Patienten mit dem MEN1-Syndrom vermehrt an Gastrinomen und anderen GEP-NETs [11]. Auch beim von Hippel-Lindau Syndrom, bei Neurofibromatose sowie der tuberösen Sklerose werden vermehrt Tumore dieser Entität beobachtet [12].

Die klinischen Symptome sind so unterschiedlich wie die Tumorentität selbst. Häufig stehen gastrointestinale Symptome und Obstruktionen durch die Tumormasse selbst im Vordergrund.

Was die GEP-NETs von anderen Tumoren unterscheidet, ist ihre Hormonproduktion, die, , zu sehr charakteristischen Symptomen führen kann. Am häufigsten kommt dabei das sog. "Karzinoidsyndrom" vor, das bei Serotonin-sezernierenden Tumoren entsteht. Durch die Lokalisation im Magen-Darm-Trakt läuft der venöse Abfluss häufig durch den Portalkreislauf zur Leber. Eventuell funktionsfähige Hormone werden dort inaktiviert, so dass es noch nicht zu systemischen Symptomen kommt. Mit dem Auftreten von Lebermetastasen ist dieser "first-pass"-Metabolismus umgangen, und es kann zu schwerwiegenden systemischen Symptomen durch die sezernierten Hormone kommen [13, 14].

## 1.2 Etablierte Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumore

Im europäischen Raum konnte im Jahr 2004 durch die Gründung der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) und der Herausgabe von therapeutischen Leitlinien eine gewisse Vereinheitlichung und Standardisierung der Therapie von GEP-NETs erreicht werden [15-30]. Therapeutisch werden lokalisierte Tumore v.a. chirurgisch entfernt (Kjell Oberg & Barbro Eriksson 2005; Norton 2006), wobei kleinere rektale und gastrale Neoplasien z.T. auch endoskopisch entfernt werden können [31]. Hierbei liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 70%. Leider ist es zum Zeitpunkt der Diagnose bei etwa 50-70% der Patienten bereits zu einer Leber- oder Lymphknotenmetastasierung gekommen, wodurch die 5-Jahres-Überlebensrate auf unter 35% bei gut- bis mitteldifferenzierten, bzw. auf unter 5% bei schlecht differenzierten Tumoren sinkt [3]. Bezüglich der Therapie bei fortgeschritteneren Erkrankungen gibt es eine ganze Reihe an Optionen. Bei gut differenzierten NET (G1/G2) die bei Diagnosestellung hepatisch metastasiert sind, wird in geeigneten Fällen eine chirurgische Resektion der Metastasen sowohl in kurativer als auch palliativer Intention empfohlen [32, 33]. Sogar eine Lebertransplantation kann in bestimmten Fällen in Betracht kommen [34]. Weitere therapeutische Optionen bieten sogenannte lokal-ablative oder loco-regionale Verfahren. Dazu zählen Radiofrequenzablation, Laserinduzierte Thermotherapie, selektive interne Radiotherapie, arterielle Chemoembolisation [30]. Dabei machen sich v.a. die selektiven internen Radiotherapien die spezifischen Eigenschaften von neuroendokrinen Tumoren zunutze [35]. Die "klassische" Chemotherapie spielt v.a. bei den schneller wachsenden, schlecht differenzierten Tumoren eine große Rolle. Je nach Therapieprotokoll und -studie sowie Lokalisation des Tumors variieren hierbei die Responderraten (Prozentsatz der Patienten die eine radiologische Reduktion der Tumormasse erfahren) zwischen 0-70% (Moertel et al. 1992; Kouvaraki et al. 2004; K. Oberg et al. 2009). Es kommen verschiedene Chemotherapeutika in

unterschiedlichen Kombinationen, je nach Tumorart, -lokalisation und -stadium zum Einsatz [29, 30, 36].

Um systemische Symptome wie beim Karzinoidsyndrom zu behandeln, kommen v.a. Somatostatin-Analoga zum Einsatz, da die fünf Subtypen des Somatostatinrezeptors in 80-100% aller GEP-NETs exprimiert werden [37]. Das langwirkende Somatostatin-Analogon Lanreotid braucht im Gegensatz zum schon länger verfügbaren Octreotid nur alle 10-14 Tage gegeben zu werden, und ermöglicht in den meisten Fällen eine gute Symptomkontrolle. Leider ist die Therapie mit Somatostatin-Analoga kaum in der Lage, eine Tumorregression zu erzielen, allerdings kann oft eine Waschtumsverlangsamung bzw. Wachstumshalt erreicht werden [38]. Eine weitere Therapiemöglichkeit besteht im Einsatz von Interferon-α. Wenn auch der genaue Wirkmechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, gibt es Hinweise, dass sowohl immunvermittelte Zytotoxizität als auch direkte Effekte auf die Tumorzellen eine Rolle spielen [39].

wie Ähnlich bei anderen Tumorerkrankungen gibt bei **GEP-NETs** starke es Forschungsbemühungen durch Medikamente, die an bestimmten, oft tumorspezifisch fehlregulierten Proteinen angreifen, und so das Wachstum stoppen oder verlangsamen. So wurden als erste Vertreter dieser Gruppe (wenn man Octreotid mit seiner nur geringen antiproliferativen Potenz außer Acht lässt) der mTOR (mammalian target of rapamycin)-Inhibitor Everolimus, sowie der Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib zur Behandlung des metastasierten pankreatischen NETs zugelassen [40-43].

## 1.3 Der PI3K-AKT-Signalweg

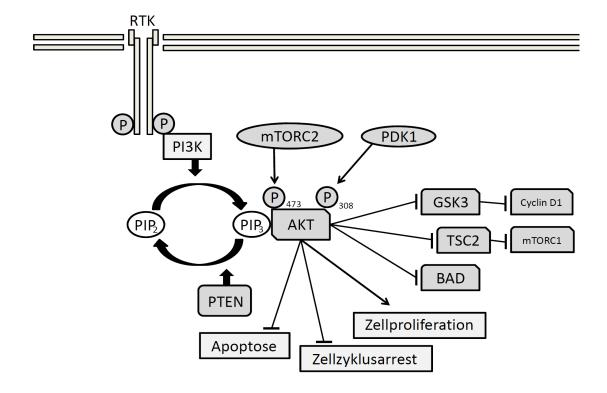
Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -AKT Signalweg gehört zu den wichtigsten und vielseitigsten Signalwegen in der menschlichen Zelle, und seine zentrale Rolle hat in den letzten Jahren zu einer Fülle an neuen Erkenntnissen und Forschungsergebnissen geführt. Er wird für sehr unterschiedliche Funktionen verantwortlich gemacht. So wird die Glukose-Homöostase in Verbindung mit Insulin darüber mitreguliert und eine Rolle bei Diabetes mellitus Typ 2 postuliert [44], Immunzellen werden hierüber beeinflusst [45], sowie Wachstum und Proliferation von Zellen gesteuert [46], (Abb.1-1).

## 1.3.1 Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)

Die PI3Ks sind heterodimere Lipidkinasen, die aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit bestehen. Ihre Hauptfunktion ist die Synthese des "second messenger" (intrazelluläre chemische Substanz, deren Konzentration als Antwort auf ein Primärsignal

verändert wird) Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), als Antwort auf Primärsignale [47]. Jene sind hier v.a. Rezeptortyrosinkinasen, die durch Wachstumsfaktoren, welche an Rezeptoren der Zelloberfläche gebunden haben, aktiviert werden. Wachstumsfaktoren wie der "epidermal growth factor" (EGF) und der "insulin like growth factor 1" (IGF1) sind bei Krebszellen häufig dereguliert, und so erfolgt z.B. durch eine autokrine Schleife ein ständiger Wachstumsreiz für die Zelle, dessen Signalkette dann über den PI3K-AKT-Weg abläuft [48]. Das membranständige PIP<sub>3</sub> funktioniert als Ligand, um Proteine mit Phosphatdomänen (PH-) zu rekrutieren. Das wichtigste Protein des Signalwegs ist die AKT (s.u.).

Die PI3K- Familie ist, basierend auf unterschieden in Sequenz-Homologien und Substrat-Spezifitäten, in drei Klassen eingeteilt. Während die Rollen der Klassen II und III noch nicht detailliert verstanden sind, ist die Klasse I wesentlich genauer untersucht, weil ihr u.a. eine bedeutende Rolle bei der Krebsentstehung zugeschrieben wird [49]. Die Klasse I wird wird in zwei Unterklassen (Ia, Ib) eingeteilt. Klasse Ia wird v.a. durch Rezeptortyrosinkinasen aktiviert, während Klasse Ib -Kinasen durch G-Proteine wie Ras gesteuert werden. Klasse Ia spielt die größte Rolle bei Krebsentstehung und bildet deshalb hier den Schwerpunkt.



**Abb.1-1:** Schematische Darstellung des PI3K-AKT-Signalweges und seine Wirkungen auf die Zelle (modifiziert nach [49]. Durch Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase (RTK) kommt es zur Phosphorylierung von PI3K mit nachfolgender Bildung von PIP3. Dieses bindet AKT an der Zellmembran. Es kommt zur Phosphorylierung von AKT. Daraus ergibt sich die Initiation verschiedener Zellprozesse, wie Zellproliferation und Eintritt in den Zellzyklus (Details siehe **Kap.1.3**).

### 1.3.2 PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog)

Die PIP<sub>3</sub>-phosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) gilt als der wichtigste Inhibitor des PI3K-AKT- Signalweges. Es handelt sich um eine Lipidphosphatase, die PIP<sub>3</sub> zurück in die inaktive Form Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) umwandelt. PTEN wurde ursprünglich als Tumor-Suppressorgen in Brustkrebs- und Glioblastomzellen identifiziert [50] und gilt mittlerweile als eines der wichtigsten fehlregulierten Proteine bei Tumorerkrankungen. Nach p53 ist es das am zweithäufigsten mutierte Protein bei allen Krebserkrankungen [51]. Angeborene Mutationen von PTEN liegen z.B. dem *Cowden-Syndrom* zugrunde, einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, bei der Patienten multiple Hamartome v.a. in der Haut entwickeln und bestimmte Krebserkrankungen wesentlich häufiger auftreten, allen voran Brust- und Schilddrüsenkarzinome [52].

Auch für therapeutische Optionen spielt der PTEN-Status eine Rolle. So ist bekannt, dass es bei Mammakarzinomen mit einer PTEN-Mutation zur teilweisen Resistenz gegen gezielte Rezeptorinhibitoren wie Trastuzumab (Antikörper gegen ErbB2, ein Wachstumsfaktorrezeptor der v.a. über den PI3K-AKT-Weg signalisiert) kommt [53, 54]. In solchen Fällen könnte eine Therapie erfogversprechend sein, die unterhalb von PTEN in die Signalkaskade eingreift [55].

### 1.3.3 **AKT/ Proteinkinase B (PKB)**

Die Proteinkinase B (PKB), oder wie sie mittlerweile häufiger genannt wird, AKT, wurde im Jahr 1991 von drei Gruppen unabhängig voneinander gefunden [56-58]. Der Name AKT ergibt sich aus dem Umstand, dass das Protein zum ersten Mal als retrovirales Onkogen des Retrovirus AKT8 beschrieben wurde [59]. Dieses Virus löst in Mäusen ein T-Zell-Lymphom aus.

Die Aktivierung der Proteinkinase erfolgt, indem sie mit ihrer PH-Domäne an PIP3 bindet und dadurch an die innere Zellmembran rekrutiert wird. Dort wird sie anschließend durch Phosphorylierung in eine aktive Konformation gebracht. Die Phosphorylierung kann hierbei an zwei unterschiedlichen Aminosäuren stattfinden, dem Threonin(308) oder dem Serin(473). Threonin(308) wird dabei durch die *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDPK1 oder nur PDK1) in Gegenwart von PIP3 phosphoryliert [60]. Lange Zeit war nicht klar, wodurch der Serin (473)-Rest phosphoryliert wird, bis die Gruppe um Sabatini 2005 mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) als verantwortliches Enzym entdeckte [61]. mTORC2 ist Teil des seit längerem bekannten Komplexes mTOR (mammalian target of rapamycin) und ist im Unterschied zu mTORC1 resistent gegenüber kurzen Anwendungen des mTOR-Inhibitors Rapamycin. Hingegen kann Rapamycin bei langfristiger Gabe zur AKT-Inhibition führen [62].

Es gibt drei Isoenzyme von AKT (AKT 1/2/3), deren Expressionsstärke u.a. vom Zelltyp abhängig ist [63]. Auch ihre Suppression hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle, wie man an Modellen von Knock-Out Mäusen herausgefunden hat. So können Mäuse sowohl ohne AKT2 als auch AKT3 überleben, sind aber Insulin- und Glukose-intolerant [64]. AKT1 Knock- out Mäuse sind stark hypotroph [65].

Die Rolle der einzelnen Isoformen kann zwischen einzelnen Krebsarten stark variieren [66], wobei die Beteiligung von AKT3 bei der Krebsentstehung am geringsten ist. Es gibt Hinweise darauf, dass eine AKT1-Überaktivierung bei Krebszellen v.a. zu einer verstärkten Proliferation und zu einem erhöhten Überleben führt, während AKT2-Überaktivierung eine stärkere Invasivität bedingt [67]. Da die Inhibition der einen Isoform zu einer Hochregulation der anderen führt, gibt es berechtigte Bedenken nur eine Isoform zu inhibieren, da dies zu verstärkter Proliferation bzw. Invasion führen könnte.

Das phosphorylierte und dadurch aktivierte AKT entfaltet unterschiedlichste Funktionen als Kinase, die auch vom jeweiligen Gewebe abhängig sind.

Die Literaturrecherche nach direkten AKT-Substraten führt zu über 100 möglichen Proteinen. Unter strengeren Kriterien, basierend auf den Aminosäuresequenzen, die als Ziel von AKT in Frage kommen, ergeben sich etwa 15 Proteine, die durch AKT direkt reguliert werden könnten [68](**Tab.1-1**).

#### 1.3.3.1 Einfluss von AKT auf den Zellmetabolismus

AKT-Aktivierung führt zu vermehrter Glukoseaufnahme durch Translokation des GLUT4-Transporters in die Zellmembran. Außerdem wird die Glykogen-Synthase aktiviert. Die Synthese von Fettsäuren wird durch die Aktivierung der *ATP-Citrat-Lyase* hochreguliert.

### 1.3.3.2 Einfluss von AKT auf die Proteinsynthese

AKT phosphoryliert das Tuberöse-Sklerose-Komplex 2 (*tuberous sclerosis complex 2*, TSC2)-Protein Tuberin. Über mehrere Zwischenschritte führt dies zur Phosphorylierung von 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), was wiederum zu einer erhöhten Proteinsynthese führt [69].

Direkte Zielprotein	regulatorischer Effekt
FOXO	Inhibierend
TSC2	Inhibierend
$GSK3\alpha/\beta$	Inhibierend
RAF1	Inhibierend
PRAS40	Inhibierend
AS160	Inhibierend
BAD	Inhibierend
MDM2	Aktivierend
Chk1	Inhibierend
eNOS	Aktivierend
ASK1	Inhibierend
ΙΚΚα	Aktivierend
p21CIP1	Inhibierend
p27KIP1	Inhibierend
Caspase 9	Inhibierend

Modifiziert **Tab.1-1** nach ohne Klammern: (Manning & Cantley 2007)): Auswahl direkten an Zielproteinen sowie von **AKT** nachfolgender Effekt durch AKT-Aktivierung, Nachweise sowohl invitro als auch in-vivo

## 1.3.3.3 Einfluss von AKT auf Zellzyklus und Zellüberleben

AKT fördert den G<sub>1</sub>-S-Phasen-Zellzyklusübergang, indem es die FOXO (*Forkhead-Box O*, )-vermittelte Transkription von Zellzyklusinhibitoren unterbindet [70]. Außerdem werden Zellzykluspromotoren wie c-Myc und Cyclin D1 durch die Inhibition von GSK3 (*Glykogen Synthase Kinase 3*) stabilisiert [49].

AKT phosphoryliert und inaktiviert auch das proapoptotische Protein BAD (*BCL2-antagonist of cell death*) und fördert so das Zellüberleben.

### 1.3.4 mTOR (mammalian target of rapamycin)

mTOR besteht aus zwei unterschiedlichen Komplexen, mTORC1 und mTORC2. Eine Aktivierung von mTOR führt zur Zellproliferation. Seit 2005 ist bekannt, dass mTORC2 dafür

verantwortlich ist, AKT zu phosphorylieren [61]. mTORC1 hingegen wird durch AKT reguliert. Dies geschieht über zwei Substrate, TSC2 (*tuberous sclerosis 2*) und PRAS40 (*proline rich AKT substrate, 40kDa*). Diese beiden Substrate hemmen im aktiven Zustand mTORC1, und werden durch AKT-Phosphorylierung inaktiviert. mTORC1 ist im Gegensatz zu mTORC2 akut durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin hemmbar. Die Rolle von TSC2 wird eindrucksvoll beim genetischen Syndrom der tuberösen Sklerose deutlich, bei dem TSC2 oder TSC1 mutiert sind. Bei den Patienten bilden sich in verschiedenen Geweben Hamartome und eine Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin zeigt in ersten Phase I/II Studien Erfolge [71]. Langzeitbehandlung von Zellen mit Rapamycin scheint schließlich auch zur Inhibition von mTORC2 zu führen [62].

## 1.3.5 Der PI3K-AKT-Signalweg und seine Rolle bei der Karzinogenese

Lange Zeit hat sich ein großer Teil der Forschung über gezielte molekulare Therapie bei Krebs auf Proteine der Gruppe RAS konzentriert, das bereits vor mehr als 25 Jahren das allerersteOnkogen identifiziert wurde [72]. Aus der Forschung um den *RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg* haben sich bis heute bereits einige wirksame Therapieansätze ergeben, wie z.B. der Tyrosinkinasehemmer Imatinib oder der monoklonale Antikörper Trastuzumab.

Seit einigen Jahren tritt nun der PI3K-AKT Signalweg immer mehr in das Interesse vieler Krebsforscher, denn es hat sich gezeigt, dass in einer ganzen Reihe von unterschiedlichen Krebserkrankungen dieser Signalweg fehlreguliert und überaktiviert ist, was zu verstärkter Proliferation und Abnahme von Apoptose führt [73]. Außerdem spielt die PI3K-AKT-Überaktivierung eine Rolle beim Metastasierungspotenzial von Tumoren. Durch die Veränderung des zellulären Phänotyps von epithelialen in stärker mesenchymale Zellen wird eine Metastasierung sowie größere Motilität begünstigt [74]. Aktiviertes AKT kann diese Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Zelltyp begünstigen [75].

Die Fortschritte im Verständnis über den PI3K-AKT-Signalweg haben bereits zur Entwicklung einiger Medikamente geführt, die zurzeit in klinischen Studien getestet werden [76]. Der mTOR-Inhibitor Everolimus wird z.B. seit einigen Jahren als Immunsuppressivum v.a. nach Organtransplantationen benutzt und etabliert sich zunehmend sowohl als Monotherapeutikum (z.B. Nierenzellkarzinome) als auch als Kombinationspartner (z.B. Mama-Karzinome) in der Krebstherapie [41, 77, 78]. Der Signalweg spielt auch eine wichtige Rolle bei Therapieresistenzen bestimmter Tumore. Insbesondere Mutationen des Proteins PTEN spielen dabei eine Rolle. Bei Brust- und Kolonkarzinomen zeigt der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) -Inhibitor Trastuzumab oft gute Wirkung. Wenn allerdings eine PTEN-Mutation bei

den Krebszellen vorliegt, wirkt Trastuzumab kaum antiproliferativ [53]. Inhibition von AKT könnte hier Resistenzen des Tumors überwinden und die Wirkung von Trastuzumab wiederherstellen [79]. Außerdem gibt es Hinweise, dass AKT-Inhibition bei PTEN-mutierten Krebszellen besonders wirksam ist [80].

# 1.3.6 Der PI3K-AKT-Signalweg und seine Rolle bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren

Auch bei GEP-NETs gibt es Hinweise auf Fehlregulationen im PI3K-AKT-Signalweg, was vielvesprechend für pharmakologische Interventionen an dieser Stelle ist. So ist PTEN häufig mutiert und inaktiv, besonders bei schlecht differenzierten Tumoren [81, 82]. Auch eine Überaktivität von AKT wurde bei GEP-NETs nachgewiesen [83, 84]. Bei der genetischen Untersuchung von neuroendokrinen Tumoren des Dünndarms wurde gezeigt, dass AKT-Autoaktivierung sogar die häufigste Mutation darstellte [85]. Weiterhin haben Untersuchungen von Gewebeproben bei Tumorpatienten gezeigt, dass das Verhältnis von aktiviertem AKT (p-AKT) zu PTEN, also der p-AKT/PTEN Quotient, ein Indikator für die Länge des Überlebens von Patienten ist. Je höher der Quotient, also je höher das Level an aktiviertem AKT, bzw. je niedriger die Menge an inhibitorischem PTEN, desto kürzer ist das Überleben von Patienten mit GEP-NETs [86].

Die Wirksamkeit des mTORC1-Inhibitors Everolimus wurde bei GEP-NETs bereits umfangreich untersucht. So zeigte eine Phase III-Studie eine signifikante Überlebensverlängerung bei Patienten mit metastasiertem pankreatischem NET [41]. Der IGF1-Rezeptor signalisiert zu einem großen Teil über den PI3K-AKT-Weg und die Inhibition dieses Rezeptors zeigte eine starke antiproliferative Wirkung bei GEP-NETs in vitro (Höpfner et al. 2006). Eine Phase II Studie für einen monoklonalen Antikörper gegen den IGF1-Rezeptor (Cixutumumab) bei GEP-NETs ist zur Zeit aktiv [87].

## 1.3.7 Pharmakologische Inhibition des PI3K-AKT-Signalweges

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl an Inhibitoren entwickelt worden, die an den unterschiedlichsten Stellen des PI3K-AKT-Signalweges angreifen. Auch die Entwicklung von Kombinationsinhibitoren, also Verbindungen die gleichzeitig mehrere Moleküle des Signalweges hemmen, sind in der Entwicklung (Ihle & Powis 2009).

#### 1.3.7.1 PI3K-Inhibitoren

Die bekanntesten Vertreter der PI3K-Inhibitoren sind Wortmannin und LY294002. Wegen ihrer schlechten Löslichkeit und hohen Toxizität sind beide Substanzen v.a. für in-vitro Studien im Einsatz. Allerdings zeigen sie keine Spezifität für die einzelnen Isoformen für PI3K. So ist bei vielen Studien, in denen diese Substanzen Verwendung fanden, fraglich, wie viel des beobachteten Effektes der Inhibition des PI3K-AKT-Signalwegs zuzuschreiben ist, und wie viel den zusätzlichen Funktionen und Wirkungen der PI3K- Isoformen. Isoformen-spezifische Inhibitoren mit besserem Nebenwirkungsprofil sind in der Entwicklung [88].

#### 1.3.7.2 mTOR-Inhibitoren

Seit längerer Zeit sind mTORC1-Inhibitoren bereits als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen im klinischen Einsatz. Durch die zusätzlichen Erkenntnisse über die Rolle von mTOR bei der Krebsentstehung werden sie zunehmende auch zur Tumortherapie erprobt. Der mTORC1-Inhibitor Everolimus wurde vor kurzem zur Behandlung des metastasierten pankreatischen NETs zugelassen [41]. Behandlung von Zellen mit einem mTORC1-Inhibitor in-vitro hat gezeigt, dass als Langzeiteffekt auch mTORC2 inhibiert wird [62].

#### 1.3.7.3 AKT-Inhibitoren

Wegen seiner zentralen Rolle im Stoffwechsel der Zelle gab es lange Zeit die Befürchtung, dass durch Inhibition es zu intolerablen Nebenwirkungen kommen könnte. Tatsächlich gab es bereits in den 90er Jahren eine Studie mit einem AKT-Inhibitor (von dem man damals die Wirkweise noch nicht kannte), bei der die Nebenwirkungen eine erfolgreiche Therapie verhindert hatten [89]. Fortschritte im Verständnis des Wirkmechanismus ermöglichen es aber, Tumoren zu identifizieren, die besonders empfindlich gegenüber einer AKT-Inhibition reagieren könnten. Dabei besteht die berechtigte Hoffnung, in solchen Fällen mit nicht-toxischen Dosierungen bereits eine Tumorreaktion zu erreichen.

Ähnlich wie bei den PI3K-Inhibitoren gibt es auch bei AKT die Möglichkeit Isoformenspezifisch zu hemmen. Allerdings, unterscheiden sich die Wichtigkeit der einzelnen Isoformen für das Zellwachstum je nach Tumorart. Deshalb scheint im Moment die gleichzeitige Hemmung von AKT1 und 2 als vielversprechende Strategie. Im Gegnsatz zu AKT1 und-2 spielt AKT3 bei Tumorwachstum eine untergeordente / unbedeutsame Rolle [66]. Grundsätzlich kann die Aktivierung von AKT durch das Blockieren der Phosphorylierungsstellen am Threonin(308)-oder Serin (473)-Rest verhindert werden, wobei die gebräuchlichen AKT-Inhibitoren beide

Stellen blockieren. Zurzeit gibt es mehrere AKT-Inhibitoren für die klinische Studien in Phase I/II angelaufen sind [90].

Für die vorliegende Arbeit wurde der AKT-Inhibitor Triciribine verwendet. Er wurde bei einer Datenbanksuche des "National Cancer Institute (NCI) Diversity Set" als möglicher Kandidat für die AKT-Inhibition entdeckt, und nachfolgend als solcher bestätigt [91]. Grund für die Wahl waren u.a. die gute theoretische Beschreibung der Wirkweise, die relativ weit fortgeschrittenen klinischen Studien für andere Tumorentitäten und die relativ häufige Verwendung in anderen Studien [92, 93]. Triciribine inhibiert dabei alle drei Isoformen von AKT und blockt sowohl die Phosphorylierung am Threonin(308)- als auch am Serin (473)-Rest. Allerdings funktioniert Triciribine nicht als ATP-Kompetitor an AKT [94]. Triciribine hemmt keine Proteine die weiter oberhalb in der Signalkette von PI3K-AKT stehen, was wichtig ist, um Effekte durch PI3K-Inhibition auszuschließen.

## 1.4 Hitzeschockproteine

Die Klasse der Hitzeschockproteine gehört zur Familie der hochkonservierten "Chaperone", also Moleküle, die in enger Interaktionen mit anderen Proteinen stehen, um die Ausbildung bzw. Stabilisierung von deren Sekundär- und Tertiärstruktur zu vermitteln, und die betreffenden Proteine so vor ihrem zellulären Abbau zu schützen. Der Name heat shock proteins ergibt sich daraus, dass eine Zelle durch Hitzestress zur Expression von Hitzeschockproteinen gebracht wird, die dabei helfen ansonsten letale Hitzedosen zu tolerieren. HSPs sind klassische "Stressproteine", die auch bei anderen Stressoren wie z.B. Hypoxie oder Azidose vermehrt exprimiert werden. Dabei besitzt die mRNA der HSPs keine Introns und kann so ohne ATP-abhängige posttranslationale Modifikationen in der gestressten Zelle transkribiert werden [95]. Aber auch unter physiologischen Bedingungen spielen diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung und -reifung. Dabei ist die Nomenklatur am Proteingewicht orientiert, d.h. dass das HSP 90 z.B. ein Gewicht von 90 kDa (Kilodalton) hat [96].

## 1.4.1 Hitzeschockprotein 90

Das Hitzeschockprotein 90 ist ein konstitutiv exprimiertes zelluläres Protein, das ca. 1-2% der gesamten Proteinmasse einer Zelle ausmacht. Um mit seinen Zielproteinen zu interagieren, muss HSP90 einen "*Multi-Chaperone*"-Komplex mit anderen Proteinen eingehen (**Abb.1-2**). Erst dadurch ist es in der Lage, Zielproteine zu aktivieren und vor proteasomalem Abbau zu schützen. HSP90 spielt bei mindestens 100 verschiedenen Proteinen eine wichtige Rolle für deren Faltung.

**Tabelle 1-2** zeigt dabei eine Auswahl derer, die für die Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen . Dabei gehören die Proteine zu ganz unterschiedlichen Signalwegen und dienen physiologisch der Regulation von Wachstum sowie Zellüberleben und –reifung [95, 97].

Für die vorliegende Arbeit ist HSP90 von besonderem Interesse, weil es ein wichtiger Regulator der AKT ist. So konnte bei Lymphomzellen eine Korrelation zwischen ihrer Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit einem HSP90-Inhibitor und der Höhe an zuvor intrazellulär vorliegender p-AKT Konzentration gezeigt werden [98]. Lymphomzellen, die eine geringe bzw. kaum eine AKT-Aktivierung aufwiesen, waren hingegen weitgehend resistent gegenüber HSP90-Inhibitionen. Die Menge an p-AKT nahm unter HSP90-Inhibition dosisabhängig ab.

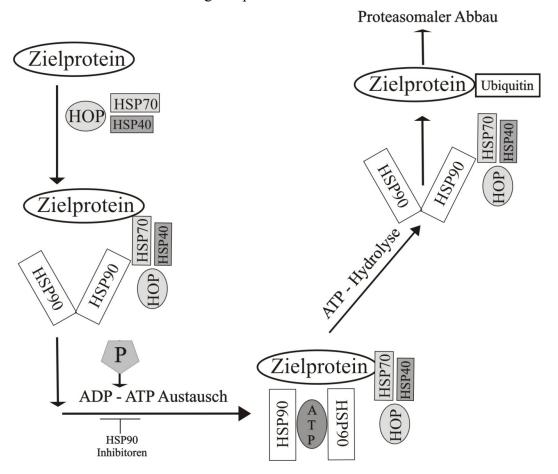


Abb.1-2: Schematische Darstellung der Interaktionen von HSP90 mit Kofaktoren und seinem Zielprotein (modifiziert nach Mahalingam et al. 2009). Das Binden eines Zielproteins an HSP90 erfordert die Kooperation mit HSP70 und dessen Kofaktor HSP40. HSP90 und HSP70 sind weiterhin über ein Adapterprotein, HOP, verbunden. Durch Bindung von ATP an HSP90 erfolgt ein Konformationswechsel der es ermöglicht Zielproteine zu binden und zu aktivieren. So wird u.a. die Phosphorylierung von AKT ermöglicht. Geldanamycin-Derivate als HSP90-Inhibitoren binden an die ADP-ATP-Domäne und verhindern so einen Konformationswechsel. Es folgt die Hydrolyse die die Abdissoziation des Zielproteins erwirkt. Dadurch kann das Zielprotein mit Ubiquitin markiert und so dem proteasomalen Abbau zugeführt werden.

Proteinklassen	Zielproteine
Rezeptor-	EGFR
Tyrosinkinasen	ErbB2/HER-2
	KIT
Signalmoleküle	AKT
	B-Raf
	MET
	ERK
Transkriptionsfaktoren	HIF-1α
	ERα-Rezeptor
	P53
	NF-κB
andere	Telomerase
	Apaf-1
	Bcl-2
	MMP2
	Survivin
	CDK 2/4/6
	Cyclin D/E

**Tab.1-2: Wichtige Zielproteinen von HSP90** (modifiziert nach Mahalingam et al. 2009).

EGFR= epidermal growth factor ErbB2/HER-2= Human receptor; Epidermal growth factor Receptor 2; ERK= Extracellular-signal Regulated Kinase; MET=mesenchymalepithelial transition factor; CDK2/4/6= cyclin dependent kinase 2/4/6; HIF- $1\alpha$ = Hypoxia induced factor  $1\alpha$ ; ER= estrogen receptor; NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'; Apoptotic Apaf-1= peptidase activating factor 1; BCL-2= B-cell lymphoma 2; MMP2= Matrix-Metalloproteinase 2

## 1.4.2 Hitzeschockprotein 90 und seine Rolle bei der Karzinogenese

Bei vielen Tumorentitäten ist die Expression von HSPs konstitutiv erhöht, unabhängig von externen Stressoren [99]. Eine Schlüsselrolle fällt dabei dem HSP90 zu, denn viele seiner Zielproteine sind Onkogene (**Tab.1-2**). Je höher die ATPase-Aktivität von HSP90 in Tumorzellen ist, desto höher sind auch die Konzentrationen an onkogenen Proteinen wie AKT1

und Cyclin D1 [97]. So konnte gezeigt werden, dass eine aktivierende Mutation von HSP90 als negativer prognostischer Marker z.B. bei Magenkrebs dienen kann [100]. Außerdem stellte sich heraus, dass je höher die Konzentration an p-AKT in einer Tumorzelle ist, desto sensibler reagieren diese auf pharmakologische Inhibition von HSP90 [98]. Bei Brustkrebs werden erworbene Resistenzen gegen Chemotherapeutika mit HSP90-Überaktivierung in Verbindung gebracht [101]. Außerdem wurde HSP90 auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen, wo es wahrscheinlich eine Rolle bei der Metastasierung und Invasion von Tumorzellen spielt [102].

#### 1.4.3 Inhibitoren von HSP90

Mittlerweile gibt es mehrere pharmakologische HSP90-Inhibitoren, die bereits in Phase I/II-Studien bei verschiedenen Tumorentitäten überprüft werden [103, 104].

Grundsätzlich werden die verschiedenen HSP90-Inhibitoren ihrer Wirkweise nach in vier verschiedene Gruppen unterteilt. Die Wirkung erfolgt entweder durch das Blockieren der ATP-Bindung an HSP90, durch die Blockierung der Interaktion mit den Kofaktoren, durch Antagonisieren der Bindung mit dem Zielprotein oder durch Störung der posttranslationalen Modifizierung von HSP90.

Die erste entdeckte Substanz die in der Lage ist HSP90 zu inhibieren, war Geldanamycin, ein natürlich vorkommendes Chemotherapeutikum, das zunächst aus dem Pilz Streptomyces hygroscopicus in den 70er Jahren isoliert wurde [105]. Geldanamycin ist ein kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindung an HSP90 und verhindert damit den nötigen Konformationswechsel, um ein Zielprotein zu binden [106]. Allerdings zeigte die Substanz ein sehr starkes Nebenwirkungsprofilmit hoher Hepatotoxizität. Das führte zur Weiterentwicklung von strukturverwandten Substanzen mit verbessertem Nebenwirkungsprofil wie 17-AAG (17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin), 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino demethoxygeldanamycin hydrochlorid) und IPI-504 [103].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein wasserlösliches 17-AAG Derivat, IPI-504 verwandt. Es zeigt eine sehr hohe Spezifität für HSP90 und wird zurzeit für verschiedene Tumorentitäten in klinischen Studien untersucht [107]. Bei GEP-NETs ist es bislang nicht untersucht.

#### 1.5 Ziel der Arbeit

Die bisherigen Therapieoptionen bei fortgeschrittenen GEP-NETs sind immer noch sehr unbefriedigend. Tumoransprechraten von ca. 30% bei konventionellen Chemotherapeutika sind wenig ermutigend für Patienten. Besonders die große Heterogenität der Tumore macht eine allgemein verbindliche Therapie schwierig. Erste Ergebnisse aus Versuchen mit

Wachstumsfaktorinhibitoren sind vielversprechend, der letztendliche klinische Erfolg aber noch ungewiss. Erste Erfolge konnten mit dem mTORC1-Inhibitor Everolimus erreicht werden, allerdings auch hier nur bei einer bestimmten Subpopulation. Berichte über die häufige Fehlregulation von p-AKT bei GEP-NETs machen dieses Molekül zu einem vielversprechenden Kandidaten für einen möglichen Therapieansatz.

In dieser Arbeit sollte an drei verschiedenen GEP-NET Zellmodellen unterschiedlicher Abstammung und mit sehr unterschiedlichen Wachstumscharakteristika untersucht werden, ob sich die folgenden drei neuartigen Ansätze zur pharmakologischen Therapie von GEP-NETs eignen:

- 1. Hemmung der AKT-Aktivität durch den isoformen-unspezifischen Inhibitor Triciribine.
- 2. Hemmung von HSP90 durch IPI-504 und damit verbunden eine indirekte Hemmung derAKT sowie anderen Zielproteinen.
- 3. Kombination der gennanten Therapeutika mit etablierten Chemotherapeutika bzw. mit anderen enzymspezifischen Inhibitoren

Dazu wurden die Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Zellen untersucht. Funktionelle Untersuchungen auf Veränderungen der Proteinexpression und Veränderungen der Genexpression wurden vorgenommen. Mögliche Induktion von Apoptose wurde betrachtet. Außerdem wurde untersucht, ob Kombinationen mit klassischen Chemotherapeutika effektiv sind. Wie in **Kap 1.3** beschrieben gibt es zahlreiche Interaktionen der einzelnen Proteine, die Teil des PI3K-AKT Signalwegs sind, untereinander und im speziellen mit AKT. Häufig kommt es bei Inhibition eines Proteins zur kompensatorischen Hochregulation anderer Moleküle. Deshalb wurden in dieser Arbeit auch Kombinationsversuche mit Medikamenten gemacht, die unterschiedliche Moleküle des gleichen Signalwegs inhibieren, um so derartige Effekte zu verhindern.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Material

### 2.1.1 Arzneistoffe

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Inhibitoren und Arzneistoffe sind in der nachfolgenden Tabelle (**Tab. 2-1**) aufgelistet.

Substanzklasse	Name	Bezugsquelle
AKT Inhibitor	Triciribine	Merck, Darmstadt, D
HSP-90 Inhibitor	IPI-504	Infinity Pharmaceuticals, Cambridge, USA
IGF-1	IGF-1 R3	Sigma, St Louis, USA
IGF-1 Rezeptor- Inhibitor	NVP-AEW541	Novartis, Basel, CH
mTORC1 Inhibitor	RAD-001	Novartis, Basel, CH
	Doxorubicin	Sigma, St Louis, USA
Zytostatika	5-FU	Sigma, St Louis, USA
	Campthotecin	Sigma, St Louis, USA

Tabelle 2-1: Liste der untersuchten Inhibitoren und Arzneistoffe

## 2.1.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Western Blot Analysen eingesetzt (Tab.2-2).

Zielprotein	Herkunft	Art des Antikörpers	Arbeitsverdünnung	Bezugsquelle
		Primärant	ikörper	
AKT	Maus	Monoklonal	1:1.000	Cell Signaling,MA,USA
p-AKT (Ser473)	Kaninchen	Monoklonal	1:1.000	Cell Signaling,MA,USA
β-Aktin	Maus	Monoklonal	1:10.000	Sigma, D
Cyclin D1	Maus	Polyklonal	1:2.000	Cell Signaling,MA,USA
IGF-1Rβ (C-20)	Kaninchen	Polyklonal	1:200	Santa Cruz, CA, USA
PTEN	Maus	Monoklonal	1:1.000	Cell Signaling,MA,USA
Sekundärantikörper				
Kaninchen-IgG- POD	Ziege	Polyklonal	1:10.000	Amersham, S
Maus-IgG-POD	Ziege	Polyklonal	1:10.000	Amersham, S

Tabelle 2-2: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

### 2.1.3 PCR-Primer

Die Primerpaare zur Durchführung von RT-PCR Untersuchungen wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, D) bezogen (**Tab. 2-3**).

Name des Gens	Sequenz (5'-3')	Gene bank Accession number	Produktgröße (bp)	Position in der mRNA
PTEN	F: CCAATGTTCAGTGGCGGA ACT R: GAACTTGTCTTCCCGTCG TGTG	NM- 000314	63	1641-1661 1745-1724
GAPDH	F: CCTGACCTGCCGTCTAGA AA R: TACTCCTTGGAGGCCATG TG	NM- 002046	276	834-853 1109-1090

Tabelle 2-3: Primerpaare für die RT-PCR.

F: "forward primer", R: "reverse primer"

## 2.1.4 Chemikalien und Lösungen

Salze und Puffersubstanzen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (St Louis, USA) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Lösungsmittel und Lösungen wurden in analytischer Qualität von Merck, Roth oder Sigma bezogen. Spezielle Substanzen wurden von nachfolgend aufgelisteten Firmen bezogen:

Artikel	Hersteller
aTaq DNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
Albumin Fraktion V	Merck, Darmstadt, D
Biotin-16-UTP	Roche, Grenzach, D
Bromphenolblau	Sigma, St Louis, USA
BSA	Sigma, St Louis, USA
Dithiothreitol	Sigma, St Louis, USA
DMSO	Sigma, St Louis, USA
dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethidiumbromid	Gibco BRL, Paisley, GB
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt, D

Glutaraldehyd	Sigma, St Louis, USA
Glycerin	Sigma, St Louis, USA
Kristallviolett	Sigma, St Louis, USA
Leupeptin	Sigma, St Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma, St Louis, USA
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, D
Trizma	Sigma, St Louis, USA
Nonidet P-40	Sigma, Deisenhofen, D
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen, D
PMSF	Sigma, Deisenhofen, D
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen, D
SDS	Sigma, Deisenhofen, D
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen, D
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, D
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, D

# 2.1.5 Kommerziell erworbene Assay-Kits

Nachfolgend werden die verwendeten Assay-Kits aufgelistet.

Artikel	Hersteller
Apoptosis detection kit	Pharmingen, CA, USA
Apoptotic DNA-Ladder Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
ArrayGrade cRNA cleanup kit	SABiosciences, Frederick, MD, USA
ArrayGrade Total RNA Isolation Kit	SABiosciences, Frederick, MD, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Uppsala, S
Oligo GEArray Human Cancer Pathway Finder array (OHS-033)	SABiosciences, Frederick, MD, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
Superscript RT kit	Qiagen, Hilden, Germany
True-Labelling AMP 2.0 amplification kit	SABiosciences, Frederick, MD, USA

#### 2.1.6 Zellmodelle

In dieser Arbeit wurden insgesamt drei unterschiedliche gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumorzellmodelle untersucht.

**CM Zellen** sind schnell wachsende humane Insulinomzellen [108] (Verdopplungsrate: 21+/- 1 Std.) und wurden in RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 10% FKS (fetales Kälberserum) (Biochrom, Berlin, D), 1% L-Glutamine und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

**BON Zellen** wurden aus humanen pankreatischen Karzinoidzellen etabliert [109] (Verdopplungsrate: 34 +/- 4h) und in einem 1 : 1 Mix aus DMEM und Ham's F-12 Medium versetzt mit 10% FKS (Biochrom Co., Berlin, Germany) 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

STC-1 Zellen sind langsam wachsende Cholezystokinin sezernierende Mauszellen aus einem Dünndarmkarzinoid [110] (Verdopplungsrate: 54 Std. +/- 6) und wurden ebenfalls in einem Mix aus DMEM und Ham's F-12 Medium versetzt mit 10%FKS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und befeuchteter Luft gehalten.

#### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Passagieren der Zelllinien

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren wurden die maximal zu 80% konfluent gewachsenen Zellen zuerst zum Entfernen von Mediumresten mit 5ml PBS gewaschen und dann für 5-10 Min. mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium wurde dann das Trypsin deaktiviert. Anschließend wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:10 in neuen Zellkulturflaschen ausgesät und mit frischem Kulturmedium versorgt. Zwischen den Passagierungen erfolgte im zweitägigen Rhythmus ein Austausch des Kulturmediums.

## 2.2.2 Untersuchungen zur Zellviabilität und Zellwachstum

## 2.2.2.1 Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

In einer Neubauer-Zählkammer wurden die mit Trypanblau (4%-ige Lösung) angefärbten Zellen auf Anzahl und Viabilität bestimmt. Bei dieser Färbung tritt der Farbstoff durch die poröse Membran toter Zellen in das Zytoplasma ein und färbt diese dunkelblau, während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und farblos bleiben.

## 2.2.2.2 Zellquantifizierung mittels Kristallviolett-Methode

Die für diese Arbeit durchgeführten Wachstumsstudien wurden mit der so genannten Kristallviolett-Methode durchgeführt [111]. Dabei wird der Farbstoff Kristallviolett (N-Hexamethyl-Pararosanilin), der sich nach Vorbehandlung der Zellen an deren DNA anlagert, photometrisch quantifiziert. Dafür wurden je nach Zelltyp 1.000-3.000 Zellen pro Loch auf einer 96-Loch-Platte ausgesät und nach 72Std. mit den jeweiligen Substanzen in Zehnfachansätzen inkubiert. Nach 48 bzw. 96Std. wurde das Medium abgenommen und die Löcher mit 200µl PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch 15-minütige Inkubation in 100µL Glutaraldehyd (1% in PBS) fixiert. Anschließend erfolgte, nach einem erneuten Waschschritt, eine 30-minütige Inkubation in einer Kristallviolett-Lösung (0,1% in PBS). Es folgte ein 30-minütiges Spülen in einem perfundierten Becherglas (Durchflussrate 500 ml H<sub>2</sub>O/min), um überschüssigen, ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach Entfernen des restlichen Wassers erfolgte eine 24stündige Inkubation mit 100 µl Triton X-100 (0,2% in PBS) im Brutschrank. Dadurch wurde das gebundene Kristallviolett wieder in Lösung gebracht und eine homogene Farblösung erreicht. Anschließend konnten photometrisch bei 570 nm in einem ELISA-Reader (MRX 2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) die Exstinktionen gemessen werden. Bei einer Zelldichte von 5.000-50.0000 Zellen/Loch ist die Absorption proportional zur Zellzahl (Abb.2-1).

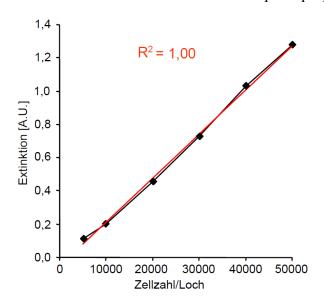


Abb.2-1: Repräsentative Kalibrierungsgerade der Kristallviolett-Methode

# 2.2.2.3 Impedanz-basierte Echtzeit-Zellproliferationsanalyse (Impedance-based real-time cell proliferation analysis)

Die Anwesenheit von Zellen auf einer speziellen Inkubationsplatte (E-Plate, Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany), deren Boden aus Elektroden besteht, beeinflusst die lokale Ionenspannung am Elektroden/Mediumübergang. Dies führt zu einer erhöhten Elektrodenimpedanz. Je mehr Zellen an den Elektroden haften, desto größer ist die Impedanz. Weiterhin kann die Impedanz je nach Zellviabilität und -ausbreitung variieren.

Die Zellviabilität und –proliferation wurde mittels des  $xCELLigence\ real\ time\ cell\ analsysis\ system$  (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany) untersucht. CM-Zellen (10.000) und BON-1 Zellen (20.000) wurden auf 96-loch E-Platten ausgesät. Zellanhaftung, -ausbreitung sowie –proliferation wurden initial alle 15 Minuten für 24 Stunden gemessen. Nach Behandlung mit dem Pharmakon erfolgte eine Messung jede Minute für 12 Stunden, dann alle 15 Minuten für weitere 55 Stunden. Die Zellproliferation wurde in einer frei wählbaren Einheit (Zellindex) bestimmt, definiert als (Rn-Rb)/15 $\Omega$ , wobei Rn die Impedanz am Zeitpunkt n und Rb die Hintergrundimpedanz der Lochplatten darstellt, die nur mit Wachstumsmedium gefüllt sind [112].

## 2.2.2.4 Zytotoxizitätsnachweis durch Messung der LDH-Aktivität

Mittels LDH-Assay kann überprüft werden, ob die Wirkweise der zu untersuchenden Substanz auf unspezifischer Toxizität beruht. Dabei kommt es zu einem Verlust der Integrität der Zellmembran, was wiederum zur Freisetzung zytosolischer Enzyme wie

der Laktatdehydrogenase (LDH), führt. Die Konzentration des Enzyms LDH kann dann im Zellkulturüberstand quantifiziert werden und stellt somit eine geeignete Methode da, um unspezifische Zytotoxizität eines Pharmakons zu untersuchen [113].

Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte in dieser Arbeit mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, D). Dieser enzymatische Test basiert auf der kolorimetrischen Bestimmung von Formazan, welches photometrisch quantifiziert wird. Die Formazanbildung erfolgt als LDH-abhängige Protonierung des schwach gelblichen Tetrazolium Salzes INT (Testprinzip siehe **Abb. 2-2**).

**Abb.2-2: Testprinzip der LDH-Messung** (modifiziert nach Roche Bioscience, Cytotoxicity Detection KitPLUS Product Instruction). Die LDH-katalysierte Umwandlung von Laktat zu Pyruvat resultiert in der Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH<sup>+</sup>H<sup>+</sup>. In der sich anschließenden durch Diaphorase katalysierten Redoxreaktion wird das schwach gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3 [4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu rotem Formazan reduziert, welches photometrisch quantifiziert wird.

Die Zellen wurden in einer 96-Loch-Platte für 72 Std. nach dem Aussäen mit den einzelnen Arzneistoffen inkubiert. Zur LDH-Bestimmung wurden dann jeweils 100μl aus dem Kulturüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten in eine neue 96-Loch-Platte überführt und mit 100μL des Reaktionsmix aus dem *Cytotoxicity Detection Kit* versetzt. Anschließend wurden die Ansätze im Dunkeln inkubiert um alle 5 Min. für 30 Min. die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader (MRX-2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) zu bestimmen. Die minimale LDH-Aktivität wurde im Überstand unbehandelter Kontrollzellen gemessen, die maximale wurde zu Kontrollzwecken durch Zusatz von 100μL Triton X-100 (2% in Kulturmedium) auf die Zellen erhalten. Aus der maximalen LDH-Aktivität eines Ansatzes nach Triton-Zugabe mit der im Überstand gemessenen LDH-Aktivität wurde durch Quotientenbildung die LDH-Freisetzung bestimmt. Die "Blankwerte" (nur Medium) wurden zuvor abgezogen.

#### 2.2.3 Immunoblot

Der Immunoblot wird zum Nachweis sowie der semiquantitativen Bestimmung spezifischer Proteine benutzt. Hierzu trennt man Proteine aus Zelllysaten mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe auf. Danach werden die Proteine entlang einer elektrischen

Spannung auf eine Membran transferiert (blotting) (**Kap. 2.2.3.4**). Mittels spezifischer Antikörper können dann die immobilisierten Proteine auf der Membran detektiert werden. Der Nachweis der Antikörper erfolgt wiederum durch einen zweiten Antikörper, der durch eine enzymatische Reaktion ein Chemilumineszenz-Signal erzeugt (**Kap. 2.2.3.5**). Um sicher zu stellen, dass bei den einzelnen Versuchen die gleiche Proteinmenge verwendet wurde, detektiert man in einem weiteren Schritt das Protein β-Aktin. Dieses gilt als "housekeeping" Protein, welches nicht der Regulation von den verwendeten Substanzen unterliegt.

## 2.2.3.1 Gewinnung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden die Zellen von Medium befreit und mit PBS gespült. Anschließend wurden sie mit 200μL RIPA-Puffer (*Radio-Immunoprecipitation-Assay-Puffer*: 1 % Nonidet P-40, 0,5 % Natriumdesoxycholinsäure, 0,1% SDS, 0,1 mM PMSF, 1 μg/ml Aprotinin, 1 μg/ml Leupeptin, 1μg/ml Pepstatin in PBS) behandelt und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Zellschabern abgelöst und in 1,5ml Eppendorff-Reaktiongefäße überführt und zentrifugiert (15.000 rpm, 15 Min., 4°C), was zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen wie Zellkerne, Zellmembranen und Zytoskelett dient. Schließlich wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

### 2.2.3.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt einer Probe wurde mit Hilfe des BCA-Tests durchgeführt [114]. Der Test basiert auf dem Prinzip, dass die Aminogruppen eines Proteins in alkalischem Medium Cu<sup>2+</sup> Ionen zu Cu<sup>+</sup> Ionen reduzieren. Die Cu<sup>+</sup> Ionen reagieren dann wiederum mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid, BCA) zu einem violetten Komplex, dessen Konzentration kolorimetrisch bestimmt werden kann.

Als Referenzproteine dient Rinderserumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0-2 mg/ml genutzt. Auf einer 96-Loch-Platte wird hierfür eine Verdünnungsreihe des BSA aufgetragen (20µl in einer Doppelbestimmung). Auf die gleiche 96-Loch-Platte werden dann je 20µl der Proteinlysate aufgetragen (auch Doppelbestimmung). Anschließend wird zu jedem Ansatz 100µl des Reaktionsmix aus dem *BCA Protein Assay Kit* hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die entstandene Farbstoffkonzentration in einem ELISA-Reader (MRX2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) bei 570nm gemessen.

Nach Erstellen einer Kalibrierungsgeraden (Abb. 2-3) wurde mit Hilfe der Gleichung der Regressionsgeraden die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

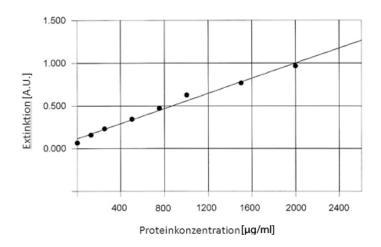


Abb. 2-3: Repräsentative Kalibrierungsgerade der Proteinbestimmung mittels BCA-Test

### 2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk (Acrylamid/Bisacrylamid) erzeugt, welches als Molekularsieb fungiert. Werden die Proteine zunächst denaturiert, so verteilen sie sich anschließend entlang des elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe. Den Proteinproben selbst als auch dem in dem sich dabei das Gel befindet, wird dabei "Laufpuffer", das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zugefügt. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten der Proteine, was zur Lösung von nicht-kovalenten Bindungen innerhalb der Proteine führt. Außerdem wird die Eigenladung eines Proteins dadurch überdeckt. Zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken wird noch β-Mercaptoethanol den Proteinproben hinzugefügt. Dadurch wird gewährleistet, dass Eigenladungen von Proteinen nicht deren Wanderungsgeschwindigkeit im Gel beeinflussen. Somit verteilen sich die SDS-Protein-Komplexe entlang ihrer Größe in Richtung des Plus-Pols im Gel. Für die hier beschriebenen Versuche wurden fertige Polyacrylamidgele der Firma Lonza (Basel, CH) verwendet. Die Durchführung erfolgte in einer Miniatur-Elektrophoresezelle (Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell, BioRad). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben mit RIPA-Puffer auf eine einheitliche Konzentration eingestellt und dann mit je 30µl 4x-Probenpuffer (250 mM Tris-HCl, 40 % Glycerol, 4 % SDS, 0,005% Bromphenolblau, 10 % β-Mercaptoethanol) versetzt. Anschließend erfolgte die Denaturierung für 5 Min. bei 95°C und nachfolgend das Einbringen in die einzelnen Geltaschen. Zusätzlich wurde ein Größenstandard als Marker aufgetragen (ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa), New England Biolabs, MA, USA). Die

elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte innerhalb des Sammelgels bei 80V, im Trenngel bei 100V.

## 2.2.3.4 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen

Die Detektion von Proteinen innerhalb eins Gels ist schwierig und kann höchstens einmalig durchgeführt werden. Deshalb folgt nach der elektrophoretischen Auftrennung ein weiterer Schritt, bei dem es zur Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (blotting) entlang einer elektrischen Spannung kommt. Hierfür wurde die Apparatur *Mini Trans Blot Cell* (Biorad, München, D) verwendet. Die PVDF-Membran (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA?) wurde dazu kurz in Ethanol gelegt. Elektrodenschwämme, Filterpapier (Whatman, Kent, UK) und die PVDF-Membran wurden dann für etwa 5 Min. in Transferpuffer (25 mM Tris, 50 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert und in die Blotkassette zusammen mit dem Gel auf der Membran als "Sandwich" eingesetzt. In die Blotkassette wurde noch ein Kühlaggregat eingebracht und das Ganze mit Transferpuffer aufgefüllt. Außerdem wurde die gesamte Blotkammer zur Kühlung auf Eis gestellt. Schließlich wurde eine Spannung von 100V für etwa 90 Min. angelegt. Abschließend wurde die Membran kurz mit Ponceau S-Lösung (0,1% Ponceau S mit 5% Essigsäure) (Sigma, St Louis, USA) gefärbt, wodurch reversible unspezifisch Proteinbanden dargestellt werden können und der Erfolg des Blottens überprüft wurde.

## 2.2.3.5 Immundetektion immobilisierter Proteine

Zur Visualisierung spezifischer Proteine auf der Membran benutzt man eine Antigen-Antiköperreaktion und daran gekoppelte enzymatische Reaktionen.

Vorbereitend wurde die Membran zunächst für eine Stunde entweder in 5% Magermilch in TBS-Tween (0,1% Tween in TBS (150mM NaCl, 7,7mM Tris-HCL, pH 7,5)) für monoklonale, nicht phosphorylierte Antikörper, bzw. in 5% BSA in TBS-Tween für polyklonale oder phosphorylierte Antikörper eingelegt. Danach wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper in TBS-Tween, evtl. mit zusätzlich 5% Milchpulver oder BSA, über Nacht bei 4°C bei konstantem Schwenken inkubiert (Verdünnungen siehe **Kap. 2.1.2, Tab. 2-2**). Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min. in TBS-Tween gewaschen und dann eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Peroxidase (POD)- gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (siehe **Kap.2.1.2, Tab.2-2**). Darauf folgte erneut dreimaliges Waschen in TBS-Tween für jeweils 10 Minuten. Zur Detektion der Immunreaktion wurde, nach trocknen zwischen Filterpapier, Chemilumineszenz-Substrat (ECL (Plus) Western Blotting

Detection Reagent, GE Healthcare, Uppsala, S) für 90 Sekunden (ECL) bzw. 5 Minuten (ECL Plus) auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran erneut zwischen Filterpapieren getrocknet und in eine Röntgenkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde dann ein Autoradiografiefilm (BioMax Light Film, Kodak, Sigma, Deisenhofen, D) für 30 Sek. bis maximal 60 Min. auf die Membran gelegt und so die Proteine visualisiert. Um weitere Proteine auf der selben Membran darzustellen, wurde dafür bei Primärantikörpern die einen Sekundärantikörper einer anderen Spezies hatten als der zuvor verwandte Sekundärantikörper, die Membran für 30 Min. in 1% Natriumazid (NaN<sub>3)</sub> in TBS-Tween inkubiert, um so die Peroxidaseaktivität zu beenden. Wenn der Sekundärantikörper für den nächsten Proteinnachweis für die gleiche Spezies spezifisch war, wurde die Membran für 10 Min. in "Stripping"-Puffer (0,2 M NaOH) inkubiert und dann dreimal für 10 Min. in TBS-Tween gewaschen. Anschließend konnte die Membran erneut mit einem anderen Primärantikörper inkubiert werden.

### 2.2.4 Nachweis von Genexpressionen

## 2.2.4.1 RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion)

Kary Mullis entwickelte die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR), die dann 1985 zum ersten Mal veröffentlicht wurde [115]. Mit dieser Methode ist es möglich, eine kurze, genau definierte Sequenz an DNA zu vervielfältigen. Bei der reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR) werden spezifische Sequenzen an RNA zunächst in DNA umgeschrieben, um dann wie bei der PCR vervielfältigt zu werden. Dadurch kann man untersuchen, ob und in welcher Menge eine Gensequenz in mRNA transkribiert wird.

Die Gesamt-RNA der Zellen wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, D) isoliert. Die Menge und Reinheit der isolierten RNA wurde mit Absorptions-Spektrophotometrie bei 260 und 280 nm gemessen (GeneQuant, Biochrom, Cambridge, UK). Die cDNA (zirkuläre DNA) wurde aus 2 μg der Gesamt-RNA mittels des *Superscript RT kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) laut Herstellerangaben hergestellt. Durch Erhitzen wird der DNA-Doppelstrang denaturiert und dann mit zwei kurzen Oligonukleotiden (Primer), welche für die gesuchte Sequenz spezifisch sind, hybridisiert und durch eine thermostabile DNA-Polymerase (aTaq-Polymerase) verlängert (für die Primer und Hybridisierungsbedingungen siehe **Tab. 2-3** und **Tab. 2-4**). Die RT-PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 50μl, mit 200 nM eines jeden Primers, 200μM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> und 2 U aTaq DNA-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) durchgeführt. Die PCR wurde in einem Peltier Thermocycler (PTC-200, MJ-Research, USA) durchgeführt. Glycerinaldehyd-3-

phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente dabei als Kontrolle für die eingesetzte Menge an RNA.

Name des	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation	Anzahl der
Gens	Temperatur & Zeit	Temperatur & Zeit	Temperatur & Zeit	Zyklen
PTEN	95°C (25 Sek)	60°C (60 Sek)	72°C (60 Sek)	35
GAPDH	94°C (15 Sek)	55°C (30 Sek)	68°C (60 Sek)	35

Tabelle 2-4: optimierte PCR-Bedingungen für die RT-PCR von PTEN und GAPDH

Im nächsten Schritt wurden die Proben mit Hilfe der Gelelektrophorese weiter analysiert. Dabei wurden die DNA-Fragmente in 2 %-igem Agarosegel (1% Seakem Gold (Lonza, Basel, CH)) bei 100V aufgetrennt und anschließend durch Ethidiumbromidfärbung dargestellt. Als Größenstandard wurde ein 100 bp Marker (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Die DNA wurde unter UV-Licht visualisiert und mit einer Digitalkamera (Polaroid, Offenbach, D) dokumentiert.

#### 2.2.4.2 DNA-Microarray

Microarrays sind Untersuchungsmethoden, die die parallele Analyse von sehr vielen Einzelnachweisen in einer geringen Menge biologischen Probenmaterials erlauben. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Array zur Analyse der Expression von 113 verschiedenen Genen, die im Zusammenhang mit Krebsentstehung stehen, benutzt. (Tabelle 2-5)

Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen mit dem *ArrayGrade Total RNA Isolation Kit* (SABiosciences, Frederick, MD, USA) isoliert. Die RNA wurde mit einem Spektrophotometer (GeneQuant, Biochrom, Cambridge, UK) quantifiziert. Das *True-Labelling AMP 2.0 amplification kit* (SABiosciences, Frederick, MD, USA) wurde für die Transkription der mRNA in cDNA benutzt. Diese wurde dann unter Verwendung von Biotin-16-UTP (Roche Diagnostics, Mannheim, D) durch in-vitro Transkription in Biotin-markierte cRNA (zyklische RNA), umgewandelt. Vor der Hybridisierung wurden die cRNA Proben mit dem *ArrayGrade cRNA* 

Funktion bei der Karzinogenese	Gene
--------------------------------	------

Zellzykluskontrolle & DNA Reparatur	ATM, BRCA1, BRCA2, CCND1 (cyclin D1), CCNE1 (cyclin E1), CDC25A, CDK2, CDK4, CDKN1A (p21Waf1), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16Ink4), CHEK2 (chk2 / Rad53), E2F1, MDM2, PRKDC (DNA-PK), PTEN, S100A4, RB1, TP53 (p53).
Apoptose und Zellzyklusarrest	APAF1, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1 (bcl-X), BIRC5 (Survivin), CASP8, CASP9, CFLAR (CASPER), GZMA, HTATIP2, TERT (telomerase), TNFRSF1A (TNF-a receptor), TNFRSF6 (Fas), TNFRSF10B (DR5), TNFRSF25 (DR3).
Signaltransduktionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren	AKT1, CTNNB1 (β-catenin), ERBB2, ETS2, FOS, JUN, MAPK14 (p38 MAPK), MAP2K1 (MEK), MYC, NFKB1 (NFκB), NFKBIA (IκBα), PIK3CB (PI3K p110b), PIK3R1 (PI3K p85α), RAF1, RASA1, SNCG, SRC.
Adhäsion	CD44, CDH1 (E-cadherin), ICAM1, ITGA1 (integrin a1), ITGA2 (integrin a2), ITGA3 (integrin a3), ITGA4 (integrin a4), ITGA5 (integrin a5), ITGA6 (integrin a6), ITGAV (integrin aV), ITGB1 (integrin ?1), ITGB3 (integrin ?3), ITGB5 (integrin ?5), MCAM, MICA (MUC18), MTSS1, NCAM1, PNN, SYK, UCC1.
Angiogenese	ANGPT1 (angiopoietin-1), ANGPT2 (angiopoietin-2), BAI1, COL18A1 (endostatin), EGF, EGFR, FGF2 (bFGF), FGFR2, FLT1 (VEGFR), HGF, IFNA1 (IFNa), IFNB1 (IFN?), IGF1, IL8, PDGFA, PDGFB, TEK (tie-2), TGFB1, TGFBR1 (ALK-5), THBS1 (thrombospondin-1), THBS2 (thrombospondin-2), TNF, VEGF.
Invasion und Metastasierung	KISS1, KAI1, MET, MMP1 (collagenase-1), MMP2 (gelatinase A), MMP9 (gelatinase B), MTA1, MTA2, NME1, NME4 (Nm23), PLAU, PLAUR, S100A4, SERPINB2 (PAI2), SERPINB5 (maspin), SERPINE1

(PAI1), TIMP1, TIMP3, TWIST1.

Tab.2-5: Übersicht über die beim DNA-Microarray untersuchten Gene.

cleanup kit (SABiosciences, Frederick, MD, USA) aufgereinigt. Die gereinigten cRNA Proben wurden dann mit den vorbehandelten *Oligo GEArray Human Cancer Pathway Finder array* (OHS-033, SABiosciences, Tab. 2-5) hybridisiert. Nach Waschschritten wurden die Array-Spots (Punkte, die durch cRNA-Bindung jeweils ein Genprodukt repräsentieren) durch die Chemilumineszenz-Methode detektiert. Für die Bilderfassung wurden Autoradiografiefilme (BioMax Light Film, Kodak, Sigma, Deisenhofen, D) und digitale Scanner benutzt. Die Spots wurden dann mit Hilfe der *GEArray Expression Analysis Suite Software* (SABiosciences, Frederick, MD, USA) analysiert und in numerische Werte umgewandelt. Die relative Menge eines bestimmten Gentranskripts wurde dabei durch Abzug der Hintergrundintensität sowie Normalisierung durch das β-Aktin Signal erreicht.

#### 2.2.5 Migrationsassay

Das Prinzip des Scratch- oder Migrations- Assays besteht in der Verletzung eines konfluent in der Zellkulturschale gewachsenen Zellrasens mit nachfolgender Quantifizierungder des Einwanderns von Zellen durch Migration in das zellfreie Areal [116]. Zellen wurden bis zur vollen Konfluenz in 6 Loch-Platten gezüchtet. Mit einer 10μL Pipettenspitze wurde eine zellfreie "Wunde" im Zellrasen geschaffen ("Scratch"). Frisches Wachstumsmedium wurde hinzugefügt und unterschiedliche Konzentrationen an Pharmaka dem Medium hinzugefügt. Nach 24 Std. Inkubation bei 37°C und hoher Luftfeuchtigkeit sowie 5% CO<sub>2</sub> wurden Bilder mit einer Kappa Digitalkamera (Argon SDC 312M, Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen, D) gemacht. Die Migration von Zellen wurde mit Hilfe der Software *Tscratch*® quantifiziert [117].

#### 2.2.6 Apoptoseuntersuchungen

Um nachzuweisen, ob die untersuchten Pharmaka Apoptose induzieren, wurden verschiedene Methoden angewendet , die das zelluläre Selbstzerstörungsprogramm zu unterschiedlichen Zeitpunkten identifizieren.

#### 2.2.6.1 Fluoreszenzmikroskopischer Apopsotsenachweis mittels Annexin V-FITC

Zur Erkennung und für den phagozytotischen Abbau apoptotischer Zellen innerhalb des Organismus verändert sich in frühen Stadien der Apoptose die Zelloberfläche. Dies führt zu einer Translokation des in vitalen Zellen in der Innenseite der Plasmamembran befindlichen Phosphatidylserin (PS) an die Außenseite und damit zu einer Änderung der Asymmetrie der Plasmamembran. Die nun an der Oberfläche der Zellen präsentierten negativ-geladenen Phosphatidylserinreste können hoch spezifisch durch das Ca<sup>2+</sup>-abhängige Annexin-V gebunden und fluoreszenzmikroskopisch durch gekoppeltes Fluoreszein (Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 518 nm) nachgewiesen werden. Um apoptotische von nekrotischen Zellen zu differenzieren, werden die Zellen zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) behandelt, der sich aufgrund des Membranintegritätsverlustes nekrotischer Zellen in den Zellkern eindringen kann und dort mit der nukleären DNA die DNA interkaliert. PI kann und fluoreszenzmikroskopisch bei einer spezifischen Anregungswellenlänge (488-540 nm) und einer Emissionswellenlänge von 617 nm detektiert werden, kann. Durch diese Doppelfärbung kann somit zwischen apoptotischen (Annexin-V-Fluoreszein positiv, PI negativ) und nekrotischen Zellen, die für beide Farbstoffe positiv sind, unterschieden werden. Für die vorliegenden Arbeit wurde das apoptosis detection kit (Pharmingen, CA, USA) benutzt. Die Zellen wurden auf Mikroskopie-Objektträgern gezüchtet und dann mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pharmakon für 48 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 30 Min. bei 22-25°C mit FITC-konjugiertem Annexin V Inkubationslösung (1µg/ml Annexin V-Biotin und 2µM Ethidiumbromid (EB)). Danach wurden die Zellen mit PBS erneut gewaschen, um ungebundene Inkubationslösung zu entfernen. Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Jena, D) wurden Fluoreszenzsignale von apoptotischen Zellen untersucht. Zellen, die weder durch Ethidiumbromid noch Annexin V angefärbt waren, wurden als vital gewertet. Ethidiumbromid-negativ aber Annexin V -gefärbte Zellen standen für frühe Apoptose; Zellen positiv sowohl für Ethidiumbromid als auch Annexin V wurden als sekundär nekrotisch definiert. (initial apoptotisch und dann nekrotisch) [118].

#### 2.2.6.2 Nachweis der DNA-Fragmentierung

Als ein später Schritt in der Apoptose-Kaskade erfolgt die Fragmentierung der DNA in Oligonukleosomen. Das Enzym Endonuklease schneidet dabei die DNA an Linkerregionen der Nukleosomen in Multimere bestehend aus ungefähr 180 Basenpaaren bzw. das Vielfache davon. Mittels des "Ladderings" kann man die charakteristische DNA-Leiter im Agarosegel darstellen. Mit dem Apoptotic DNA Ladder Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, D) wird die DNA der behandelten Zellen zunächst aufgereinigt. Es folgt eine Lyse (6 M Guanidin-HCl, 10 mM

Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, 20 % Triton X-100, pH 4,4) der Zellen. Das Lysat wird durch ein Filterröhrchen mit Glasfaser-Vlies zentrifugiert. Hierbei bindet sich DNA in Gegenwart des chaotropen Salzes Guanidin-HCl an die Oberfläche der Glasfasern. Die Aufreinigung der DNA der behandelten Zellen erfolgte mit dem *Apoptotic DNA Ladder Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, D). Nach der Lyse der Zellen wurde das Lysat in ein Filterröhrchen mit Glasfaser-Vlies übertragen und zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde die DNA von den restlichen Lysatkomponenten separiert, da sich DNA in Gegenwart eines chaotropen Salzes (Guanidin-HCl) an die Oberfläche der Glasfasern bindet (B Vogelstein & Gillespie 1979). Es folgte mehrfaches Waschen mit dem Waschpuffer (20 mM Nacl, 2 mM Tris-HCl, 80 % Ethanol, pH 7,5) wonach die DNA schließlich mit dem Elutionspuffer (40 mM Tris, pH 8,5) eluiert wurde. Nach photometrischer Bestimmung des DNA-Gehalts anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

#### 2.2.7 Apoptose/ Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die Zellzyklusanalyse wurde nach einer modifizierten Methode von Fried u.a. durchgeführt [119]. Der für die Bestimmung des Zellzyklus am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist Propidiumiodid, das an doppelsträngige DNA bindet und interkalierend wirkt. Die Anregungswellenlänge liegt bei 488 nm, die Emissionswellenlänge bei 600 nm. Da Propidiumiodid auch an doppelsträngige RNA unspezifisch binden kann, wird der Probe RNase zugesetzt.

Der DNA-Gehalt der Zellkerne verdoppelt sich während eines Zellzyklus, so dass je nach DNA Gehalt eine Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Zellzyklusphase möglich ist. Während in der  $G_0/G_1$ -Phase ein diploider Chromosomensatz vorliegt, besteht in der  $G_2/M$ -Phase ein tetraploider Chromosomensatz.

Die "Sub-G1"-Methode macht sich den verminderten DNA-Gehalt von apoptotischen Zellen zu nutze. Durch die Behandlung der Zellen mit Ethanol im Rahmen der Aufbereitung für die Durchflusszytometrie werden die Zellmembranen permeabel gemacht. Die kleinen DNA-Fragmente, die im Rahmen der Apoptose entstehen (vgl. **Kap. 2.2.6.1**) werden dann beim Waschen mit PBS z.T. gelöst. Dadurch haben Zellen in Apoptose einen niedrigeren DNA-Gehalt als nicht-apoptotische Zellen, sind also "hypoploid", binden weniger an Propidiumiodid-Farbstoff und erscheinen bei der Durchflusszytometrie vor dem "G1-Peak" [120]. Allerdings gibt es eine Reihe von Einschränkungen für diese Methode. Die DNA-Fragmentierung ist ein relativ spätes Ereignis der Apoptose und somit werden hierbei nur spätapoptotische Zellen

erfasst. Weiterhin werden Zellen, die aus der G<sub>2</sub>/M-Phase apoptotisch werden, kaum erfasst, da durch ihre 2-Chromatid-Chromosomen ein teilweiser Verlust an DNA-Gehalt sie eher im "G1-Peak" auftauchen lässt.

Zellen wurden in einer Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen/ml ausgesät und für 24 ??? mit dem Medikament in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und in 2% Formaldehyd in PBS für 30 Min. auf Eis fixiert. Es folgte die Inkubation in Ethanol/PBS (2:1) für 30 ??in. und die anschließende Zentrifugation für 5?? in. bei 1.200 rpm. Die Zellen wurden mit 40μg/ml RNase A in PBS resuspendiert und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert um dann mit 50μg/ml Propidiumiodid in PBS resuspendiert zu werden. Die Proben wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) gemessen und mit der Software FlowJo (Tree star, Ashland, Oregon) analysiert. Apoptotische Zellen können dabei als hypoploide Population (sog. "sub G1-Peak") identifiziert werden (Darzynkiewicz et al. 1992).

### 2.2.9 Chorioallantoismembran-Assay (CAM)

Das Chorioallantoismembran-Assay beschreibt eine Methode, bei der befruchtete und bebrütete Vogeleier durch spezielle Präparierung als "Nährboden" für die untersuchten Tumorzellen dienen können. Dabei wird bei den Eiern eine aus Chorion und Allantois gebildete Membran freigelegt, die mit Tumorzellen beimpft werden kann. Ein Immunsystem bildet sich erst nach einigen Wochen bei den Embryone aus, so dass hier keine Beeinflussung besteht.

Befruchtete Hühnereier (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, Germany) wurden bei 37°C und konstanter Luftfeuchtigkeit für 3 Tage bebrütet. Nach 3 Tagen wurde ein Fenster in die Eierschale geschnitten und 5ml Albumen wurden entfernt, um die Loslösung der sich entwickelnden Chorioallantoismembran von der Schale zu ermöglichen. Das Fenster wurde mit Klebeband verschlossen und die Eier wurden für weitere 7 Tage bebrütet. Am 10.Tag wurde das Klebeband entfernt. 2,5x10<sup>6</sup> CM-Zellen bzw. 5x10<sup>6</sup> BON-1 Zellen wurden in 20μl Wachstumsmedium resuspendiert und mit 30μl wachstumsfaktorreduziertem Matrigel (BD Biosciences) vermischt. Die Matrigel-Zellsuspension wurde auf die CAM an Tag 10 aufgebracht. Nach 2 Tagen entwickeln sich Tumorplaques mit Anschluss an das Gefäßsystem der CAM, die anschließend topisch mit PBS (Negativkontrolle), Triciribine (20μM) oder IPI-504 (2μM) für 72 Std. (Triciribine) bzw. 96 Std. (IPI-504) inkubiert wurden. Das Tumorwachstum sowie Intaktheit des Embryos wurden täglich mittels Stereomikroskopie kontrolliert und mit einer Digitalkamera (Kappa, D) dokumentiert.

#### 2.2.10 Statistik

Die Berechnung der statistischen Parameter erfolgte unter Verwendung der Software *Sigmaplot*<sup>®</sup> Version 11.0 (Systat Software, Chicago, USA). Alle Versuchsansätze waren voneinander unabhängig und wurden unter Annahme einer Normalverteilung der Messergebnisse mit dem ungepaarten, zweiseitigen *T*-Test verglichen. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte kleiner als 0,05 waren.

Bei den Berechnungen für Kombinationstherapien wurden mögliche synergistische oder additive Effekte der kombinierten Pharmaka mit der Software *Calcusyn*® (Biosoft; Ferguson, MO, USA) berechnet. Als wichtiger Parameter wird dabei der Kombinationsindex (combination index (CI)) angesehen, der nach folgender Formel berechnet wird:

$$CI_{A+B} = \frac{D_{A|A+B}}{D_{A}} + \frac{D_{B|A+B}}{D_{B}} + \frac{D_{A|A+B}D_{B|A+B}}{D_{A}D_{B}}$$

 $D_A$  bezeichnet die Dosis eines Medikaments A, die nötig ist um einen bestimmten Effekt zu erzielen.  $D_{A|A+B}$  beschreibt dabei die benötigte Dosis eines Medikaments A die nötig ist, um den gleichen Effekt wie  $D_A$  zu erzielen, wenn es in Kombination mit dem Medikament B benutzt wird. Werte für CI >1,1 zeigen dabei an, dass zwei Medikamente antagonistisch wirken, Werte zwischen 0,9-1,1 stehen für einen additiven Effekt. Werte <0,9 bezeichnen synergistische Wirkungen zweier Medikamente [121].

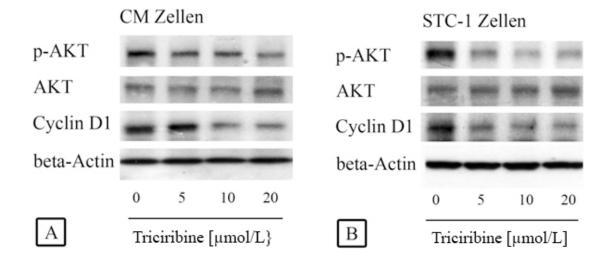
.

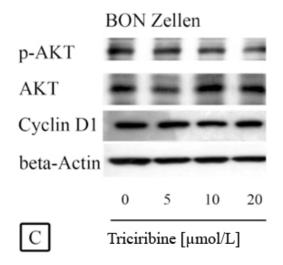
#### 3 ERGEBNISSE

### 3.1 AKT-Inhibition bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren

## 3.1.1 Einfluss von Triciribine auf die AKT-Aktivierung bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren

Um den Einfluss von Triciribine auf den Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivierung von AKT zu untersuchen, wurden an allen drei Zelllinien Western-Blot Analysen für p-AKT und AKT durchgeführt (**Kap. 2.2.3**). Außerdem wurde Cyclin D1 als eines der Effektorproteine von AKT untersucht. Nach 48 stündiger Inkubation serumfrei gehaltener Zellen mit steigenden Konzentrationen an Triciribine, folgte eine 30 minütige Stimulation mit dem Wachstumshormon IGF-1 (insulin-like growth factor 1) bevor die Zellen lysiert wurden. Es zeigte sich sowohl bei CM- als bei STC-1 Zellen eine dosisabhängige Abnahme der phosphorylierten AKT bei unveränderter Expression der Gesamtmenge an AKT (**Abb.3-1**, **A+B**). Die Expression von Cyclin D1 nimmt unter Triciribinebehandlung ebenfalls dosisabhängig ab. Anders verhält es sich bei BON Zellen. Selbst bei der maximalen Triciribinekonzentration von 20µM ist keine nennenswerte Inhibition der p-AKT bzw. Cyclin D1 Expression zu erkennen (**Abb.3-1**, **C**).

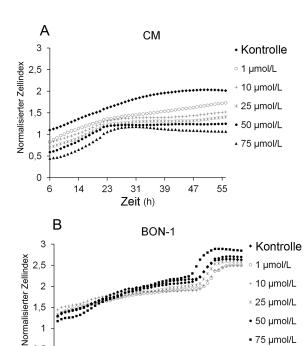




Triciribine-induzierte Abb.3-1: Regulation von AKT und Cyclin D1 bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzellen: 48 stündige Inkubation mit Triciribine führte bei CM-Zellen (A) sowie bei STC-1 Zellen (B) zu einer dosisabhängigen Abnahme an aktiver, phosphorylierter AKT sowie an Cyclin D1, einem Effektorprotein von AKT. Gesamtexpressionen an AKT blieben unverändert. Bei BON-Zellen (C) hat die Triciribine Behandlung mit keine nennenswerte Wirkung die Expression von p-AKT und Cyclin D1 (C). Exemplarische Western Blots von mindestens n=3unabhängigen Experimenten. β-Aktin diente Kontrolle gleichmäßigen einer Proteinbeladung.

## 3.1.2 Antiproliferative Wirkung von Triciribine auf gastrointestinale neuroendokrine Tumore

Nach 48- bzw. 96- stündiger Inkubation mit Triciribine wurde die Zelldichte mittels der Kristallviolett-Methode bestimmt (**Kap. 2.2.2.2**). Außerdem wurde zur Feststellung des Wachstumsverhaltens von CM- und BON-Zellen zusätzlich die Impedanz-basierte Echtzeit-Zellproliferationsanalyse eingesetzt (**Kap. 2.2.2.3**). Die Proliferationsstudien ergaben, dass Triciribine das Wachstum von CM und STC-1 Zellen zeit- und dosisabhängig um bis zu 60% inhibitert. (**Abb.3-2, A,C,E**). Die halbmaximale wachstumsinhibitorische Konzentration (*inhibitory concentration 50%*, IC<sub>50</sub>) für CM und STC-1 Zellen betrug 12,7 +/- 1,2μmol/L (CM) bzw. 7,1 +/- 0,8μmol/L (STC-1)(berechnet nach 96 Stunden). Demgegenüber konnte bei BON Zellen unter Triciribine-Behandlung (0-20μmol/L) keine Wachstumsinhibition festgestellt werden. Im Gegenteil, es kam sogar zu einem leichtenAnstieg der Zellzahl gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen (**Abb.3-2, D**).



34

Zeit (h)

41

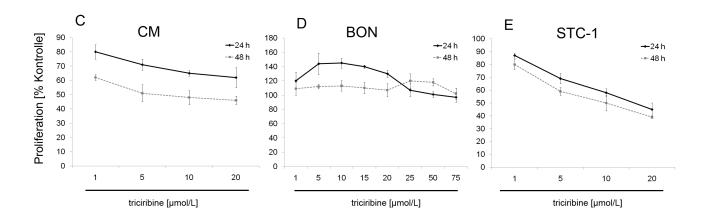
27

20

0,5 0 6 13

#### Abb.3-2: Antiproliferative Wirkung von

Triciribine. Zelluläres Wachstum von CM- und BON-Zellen wurde für mindestens 55 Stunden bestimmt. Triciribine bewirkte eine deutliche Wachstumsinhibition bei CM-Zellen (A), nicht jedoch bei BON Zellen (B). Wachstumsinihitorische Effekte von Triciribine wurden zusätzlich mittels Kristallviolettmethode bestimmt. Das Wachstum der CM-Zellen wurde um mehr als 60% nach 96 inhibiert (C). In BON Zellen sah man diesen Effekt nicht (D). In STC-1 Zellen ergab sich eine Wachstumsinhibition von bis zu 55% (E). Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen je Zelllinie berechnet.



• 50 µmol/L ■ 75 µmol/L

55

48

#### 3.1.3 Triciribine-induzierte Zytotoxizität

Als Surrogatparameter für die zytotoxische Wirkung des Medikaments untersuchten wir die Konzentration von LDH im Überstand (Kap. 2.2.2.4). Dabei zeigte sich bei bei den beispielhaft untersuchten CM Zellen unter Behandlung (8 bzw. 24 Std.) mit Triciribine kein signifikanter Anstieg an freigesetzter Laktatdehydrogenase. Dies legt den Schluss nahe, dass Triciribine keine unspezifischen, zytotoxische Effekte auf die Zellen ausübt und somit die beobachteten antiproliferativen Effekte ausfgrund spezifischer Signalwegbeeinflussungen induziert wurden.

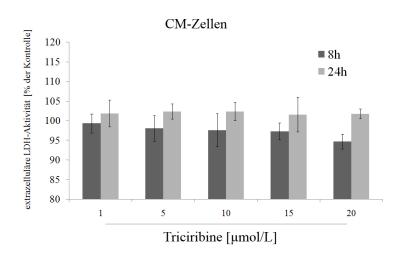


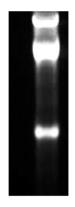
Abb.3-3: Triciribine-induzierte LDH-Aktivität bei GEP-Net Zellen. Bei CM Zellen führte die Behandlung mit Triciribine weder nach 8 noch nach 24h zu einem signifikanten Anstieg an extrazellulärer Aktivität Überstand des im Zellkulturmediums. Die LDH-Freisetzung der unbehandelten Kontrollansätze wurde auf 100 % gesetzt. Mittelwerte (+/- SEM) aus n=3 unabhängigen Versuchen.

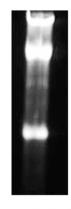
#### 3.1.4 Induktion von Apoptose durch Triciribine

Wie bereits beschrieben, ist AKT Teil der Regulation von Apoptose (**Kap.1.3.3.3**). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Triciribine in der Lage ist, Apoptose bei GEP-NET Zellen zu induzieren. Hierzu wurden drei verschiedene Nachweisverfahren eingesetzt, um das zelluläre Selbstmordprogramm zu unterschiedlichen Zeitpunkten und damit zweifelsfrei zu detektieren.

#### 3.1.4.1 DNA-Fragmentierung

Zum Nachweis von späten Ereignissen der Apoptose wurde die Fragmentierung der DNA untersucht. Sie stellt einen irreversiblen Schritt im apoptotischen Programm dar. Mittels Agarosegelelektrophorese konnte die charakteristische Auftrennung von DNA-Fragmenten bei CM-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 20µM Triciribine dargestellt werden (**Abb. 3-4**).





unbehandelt

20μM Triciribine

**Abb.3-4: DNA-Fragmentierung nach Triciribine-Behandlung.** Exemplarische Darstellung von n=3 Versuchen der Triciribine-induzierten Fragmentierung der DNA bei CM Zellen. Die Inkubation der Zellen für 48 Std. mit 20 μM Triciribine verursachte eine apoptosespezifische Fragmentierung der zellulären DNA.

#### 3.1.4.2 Annexin V-FITC Assay zum Nachweis früher Apoptose

Als ein frühes Ereignis der Apoptose gilt die Präsentation von negativ geladenem Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Dieses lässt sich durch einen Annexin V-FITC Assay nachweisen, bei dem sich Farbstoff kalziumvermittelt an das Phosphatidylserin anlagert (**Kap. 2.2.6.1**). Nach 48-stündiger Inkubation von CM Zellen mit Triciribine wurden die Zellen mit FITC-markiertem Annexin V gefärbt und anschließend die apoptosespezifische Anfärbung der äusseren Zellmembran fluoreszenzmikroskopisch detektiert. (**Abb.3-5**). Die Behandlung mit Triciribine führte zu einer dosis- und zeitabhängien Zunahme an plasmamembranärer Annexinfärbung. Bei Triciribinkonzentrationen unterhalb des ermittelten IC<sub>50</sub> Werts von ~ 13 μM wurde bei CM Zellen nach 48 Std. lediglich eine schwache Annexin-V Färbung festgestellt, während bei höheren Konzentrationen (20μM) ein deutliches Annexin-V Signal detektiert wurde (**Abb.3-5**) Zum Ausschluss falsch-positiver Anfärbungen intrazellulärer Phospatidylserinreste mit Annexin-V wurden die Zellen zu einer Rotfärbung des Zellkerns führt. Doppelfärbungen deuten daher auf nekrotische anstelle apoptotischer Zellen hin.

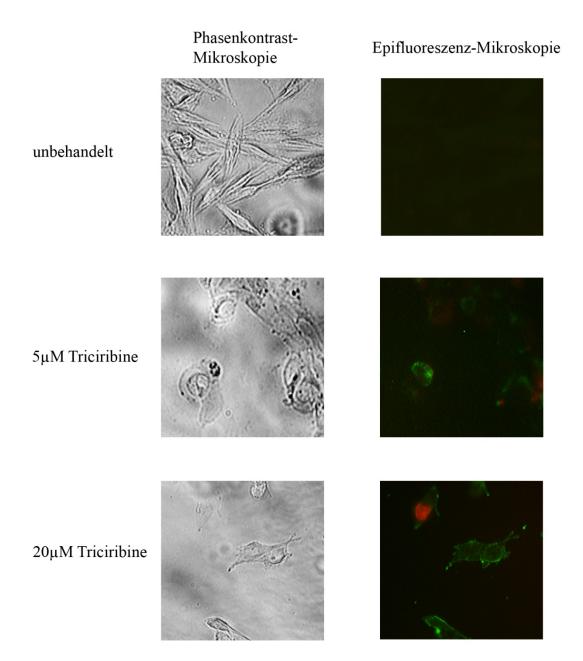


Abb.3-5: Apoptoseinduktion durch Triciribine am Beispiel von CM-Zellen.

Nach 48-stündiger Inkubation mit Triciribine wurde Apoptose mittels Annexin V-FITC Assay nachgewiesen. Bei 5μM und mehr noch bei 20μM Triciribine färbten sich einzelne Zellen mit Annexin V-FITC als Zeichen der Bindung an Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche. Bei 20μM waren auch vereinzelt Zellen sowohl positiv für Annexin V-FITC als auch Ethidiumbromid als Zeichen der späten Apoptose. Zellen die weder durch Ethidiumbromid noch Annexin V angefärbt waren, wurden als vital gewertet; Ethidiumbromid-negativ aber Annexin V-positiv gefärbte Zellen standen für frühe Apoptose; Zellen positiv sowohl für Ethidiumbromid als auch Annexin V wurden als sekundär nekrotisch definiert. (exemplarische Darstellung von n=3 Versuchen) (Kap.2.2.6.1)

## 3.1.4.3 Apoptose als "SubG1"-Fraktion in der Durchflusszytometrie nach Triciribine-Behandlung

Im Rahmen der Durchflusszytometrie zur Analyse der Zellzyklen wurde auch nach apoptotischen Zellen unter Triciribine-Behandlung gesucht. Das Prinzip der "Sub-G1"-Methode beruht auf dem verminderten DNA-Gehalt von apoptotischen Zellen (**Kap. 2.2.7**).

Unter Triciribinebehandlung (0-20μM) kommt es zu einem dosisabhängigen Anstieg um das bis zu 2,5-fache bei 20μM Triciribine verglichen mit unbehandelten Zellen (**Abb. 3-6**). In Verbindung mit den Ergebnissen aus der Zytotoxizitätsüberprüfung (**Kap. 3.1.3**) kann somit über die Art der zugrunde liegenden Wirkweise von Triciribine als einem durch AKT-Inhibition Apoptose-induzierenden Agenz ausgegangen werden.

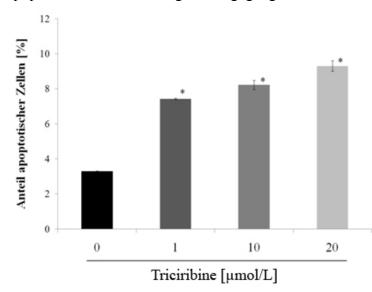


Abb. 3-6: Anteil der Zellen in der "Sub-G1"-Fraktion. CM wurden mit Tricirine inkubiert und mit Propidiumiodid gefärbt . Gezeigt ist der Anteil der Zellen in der "SubG1"-Phase Die "Sub-G1"-Fraktion wird zum großen Teil durch apoptotische Zellen gebildet. Mittelwerte **SEM** aus unabhängigen Versuchen. \* p<0,05

#### 3.1.5 Zellzyklusveränderungen unter Triciribine-Behandlung

Es wurde der Einfluss von Triciribine auf den Zellzyklus bei GEP-NETs untersucht. Nach 24stündiger Inkubation mit Triciribine zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme an Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase zeigte. Proportional nahm der Anteil an Zellen in der S- und  $G_2/M$ -Phase ab (**Abb.** 3-7). Das heisst, dass Triciribine bei GEP-NET-Zellen eine Arretierung des Zellzykus in der  $G_0/G_1$ -Phase induziert. Um zu überprüfen, welche Gene an der Arretierung beteiligt sind, wurden weiterführende Micro-Arrayuntersuchungen durchgeführt (siehe **Kap. 3.1.6**).

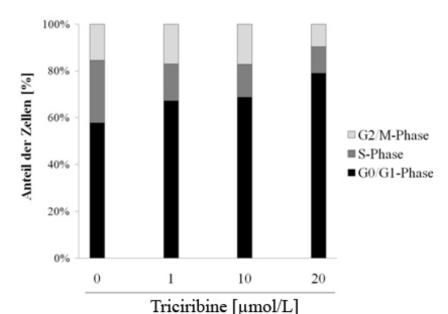


Abb. 3-7: Zellzyklusregulation durch Triciribine.

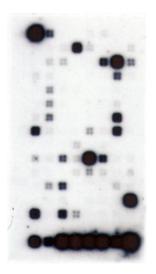
Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden Triciribinekonzentrationen (0-20µM) akkumulieren die CM Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Der Anteil der Zellen in der S- und der G2/M-Phase nimmt parallel dazu in allen untersuchten Zelllinien ab.

#### 3.1.6 Effekt von Triciribine auf die Expression verschiedener Tumor-assoziierter Gene

Zur Untersuchung des Einflusses von Triciribine auf die Genexpression wurde nach Veränderungen in der Expression von insgesamt 113 Genen geschaut, von denen bereits bekannt ist, dass sie bei verschiedenen Krebsarten häufig fehlreguliert sind und eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen [122]. Eine komplette Liste der dabei überprüften Gene enthält die **Tab.2-5**. Insgesamt konnte für 28 Gene eine erhöhte Expression durch Triciribine-Behandlung bei CM Zellen gezeigt werden. 20 Gene wurden supprimiert (**Tab. 3-2**).

Zellzyklusregulation: Die Expression von Cyclin E und die Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), beide wichtig für den G<sub>1</sub>/S-Phasenübergang, wurde inhibiert. CDK4, dase den G<sub>0</sub>/S-Phasenübergang fördert, wurde ebenfalls supprimiert. Demgegenüber wurde die Expression von p21, p27 und p16, die als Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen für den Phasenübertritt von der G0/G1- in die S-Phase verantwortlichen sind, induziert. Behandlung mit Triciribine führte auch zur Suppression von E2F1 (E2F transcription factor 1), ebenfalls ein wichtiger Regulator des Zellzyklus (Johnson & Walker 1999).

*Apoptose:* V-akt zeigte sich vermindert und PTEN, der Hauptinhibitor des PI3K-AKT-Wegs, wurde vermehrt exprimiert. Außerdem waren andere Apoptose-induzierende Gene wie APAF1 und BAX induziert und die anti-apoptotischen Gene BIRC5 und TIMP1 inhibiert.



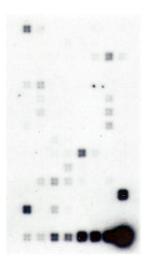


Abb. 3-6: Bildsignale behandelten Membrane mit einzelnen "Gen-Spots". Belichtungszeiten Verschiedene wurden benutzt, um auf der einen Seite Überstrahlungen einzelner Gen-Spots vermeiden, zu andererseits auch geringe Signale noch darzustellen. Normalisierung Vergleich der Membrane erfolgte mit GEArray Expression Analysis Suite Software (**Kap.2.2.4.2**).

Kontrolle

Triciribine 20µM

supprimierte Gene

supprimierie \	Jene	
Symbol	Verhältnis	Produkt
E2F1	0.04	E2F transcription factor 1
CCNE1	0.17	Cyclin E1
AKT1	0.18	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
PIK3R1	0.24	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)
BIRC5	0.30	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
EPDR1	0.43	Ependymin related protein 1 (zebrafish)
NCAM1	0.56	Neural cell adhesion molecule 1
CDK2	0.57	Cyclin-dependent kinase 2
NME4	0.65	Non-metastatic cells 4, protein expressed in
CDK4	0.68	Cyclin-dependent kinase 4
TNFRSF1A	0.68	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
NME1	0.69	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in
TIMP1	0.69	TIMP metallopeptidase inhibitor 1
ITGB1	0.70	Integrin, beta 1
TIMP3	0.71	TIMP metallopeptidase inhibitor 3
ITGB5	0.71	Integrin, beta 5
MAP2K1	0.72	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
PNN	0.76	Pinin, desmosome associated protein
MCAM	0.76	Melanoma cell adhesion molecule
ERBB2	0.79	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

### induzierte Gene

Symbol	Verhältnis	Produkt
IL8	33.59	Interleukin 8
MMP1	18.32	Matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)
BAX	13.52	BCL2-associated X protein

PDGFA	9.70	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
APAF1	8.84	Apoptotic peptidase activating factor 1
PDGFB	8.03	Platelet-derived growth factor beta polypeptide
THBS2	5.91	Thrombospondin 2
PTEN	5.56	Phosphatase and tensin homolog
CD44	4.98	CD44 molecule (Indian blood group)
PLAU	4.88	Plasminogen activator, urokinase
SNCG	4.87	Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)
KISS1	4.82	KiSS-1 metastasis-suppressor
TGFBR1	4.35	Transforming growth factor, beta receptor I
PLAUR	4.09	Plasminogen activator, urokinase receptor
CD82	4.09	CD82 molecule
IGF1	3.57	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
SRC	2.89	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
BRCA1	2.65	Breast cancer 1, early onset
FAS	2.56	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
THBS1	2.51	Thrombospondin 1
CDKN1A	2.33	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
MMP2	1.93	Matrix metallopeptidase 2
TP53	1.93	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
CDKN2A	1.84	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16,
NFKBIA	1.70	Nuclear factor of kappa light gene enhancer in B-cells
ITGA3	1.63	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3
TERT	1.49	Telomerase reverse transcriptase
CDKN1B	1.40	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)

Tab.3-2: Regulation von Zellzyklus- und Apoptose-relevanten Genen bei CM-Zellen nach Triciribine-Behandlung.

Analyse der Signalintensität eines jeden "Genspots" und Normalisierung wurde mit GEArray Expression Analysis Suite durchgeführt. Es wurde die Genexpression zwischen unbehandelten und Triciribineinkubierten CM Zellen verglichen. Das "Verhältnis" beschreibt Veränderungen in der Genexpression nach Triciribine-Behandlung. Von den 113 analysierten Genen waren 28 verstärkt exprimiert und 20 supprimiert.

#### 3.1.7 Korrelation von PTEN-Expression und Wirksamkeit von Triciribine

Um nach einer möglichen Korrelation zwischen der Wachstumsinhibition von Triciribine bei den drei untersuchten GEP-Net Zelllinien und der Expressionshöhe von PTEN zu suchen, wurde eine RT-PCR mit Primern für PTEN nach 48-stündiger Inkubation mit Triciribine durchgeführt (**Kap. 2.2.4.1**). Dabei zeigte sich, dass in den Triciribine-sensiblen CM-Zellen kaum PTEN exprimiert wird. In BON-Zellen, bei denen das Wachstum kaum durch Triciribine inhibiert wird, finden sich hingegen hohe Expressionslevel von PTEN. STC-1 Zellen, deren Wachstum durch Triciribine gut gehemmt werden kann, nehmen bezüglich der Expressionsstärke von PTEN eine Mittelstellung zwischen den beiden anderen Zelllinien ein. (**Abb. 3-7**).

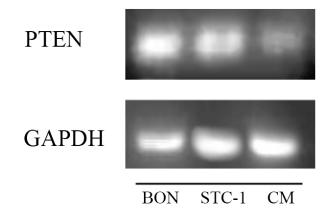


Abb.3-7: Expression von PTEN in neuroendokrinen gastrointestinalen oder auch GEP-NET Tumorzellen Nach 48-stündiger Inkubation mit Triciribine wurden die Zellen lysiert und die RNA extrahiert. RT-PCR mit einem PTEN-Primer wurde beschrieben durchgeführt (Kap. 2.2.4.1). **GAPDH** diente Beladungskontrolle. Dargestellt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.8 Triciribine-induzierte Migration von GEP-NET Zellen

Wichtige Malignitätseigenschaften von Tumorzellen sind deren Fähigkeit zur Migration und Invasion, die es dem Tumor ermögleihen, in andere Gewebe zu metastasieren [123]. Zur Überprüfung des Einfluss von Triciribine auf das Migrationsverhalten von GEP-NET Zellen wurde am Beispiel von CM-Zellen ein sog. Migrationsassay durchgeführt.

**Abb 3.8** zeigt die dosisabhängige Induktion der Migration von CM-Zellen nach Inkubation mit Triciribine. Im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen, zeigten die mit Triciribinebehandelten Zellen ein deutlich verlangsamtes/reduziertes Migrationsverhalten.

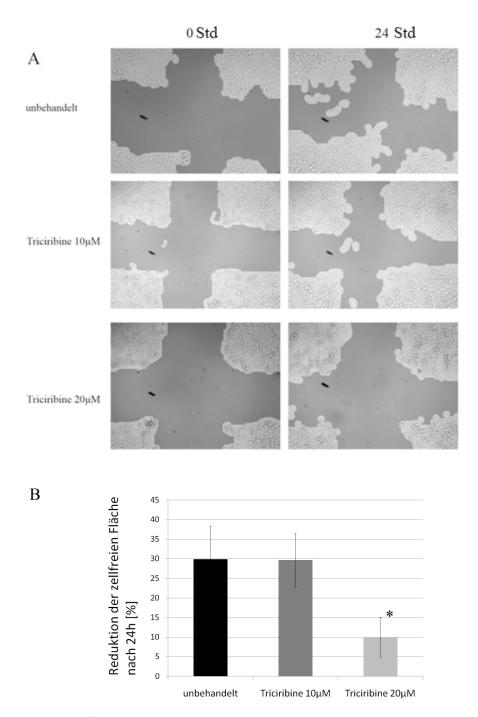


Abb.3-8: Änderungen im Migrationsverhalten von CM Zellen durch Triciribine. A: Dargestellt sind Aufnahmen des Zellrasens bei CM-Zellen, vor und nach 24h Inkubation mit Triciribine in ansteigenden Konzentrationen (10-fache Vergrößerung). Die nativen Bilder wurden dann mit der Software TScratch bearbeitet. Dabei erscheinen Regionen mit Zellbewuchs hellgrau, freie Flächen dunkelgrau. Die daraus resultierenden prozentualen Flächenangaben sind in **B** als Diagramm dargestellt. Mit hohen Konzentrationen behandelte CM-Zellen zeigten eine signifikant geringere Migration. Mittelwerte +/- SEM aus mindestens n=3unabhängigen Versuchen je Zelllinie. \* p<0,05

## 3.1.9.1 Triciribine-basierte Kombinationstherapie mit klinisch etablierten Chemotherapeutika

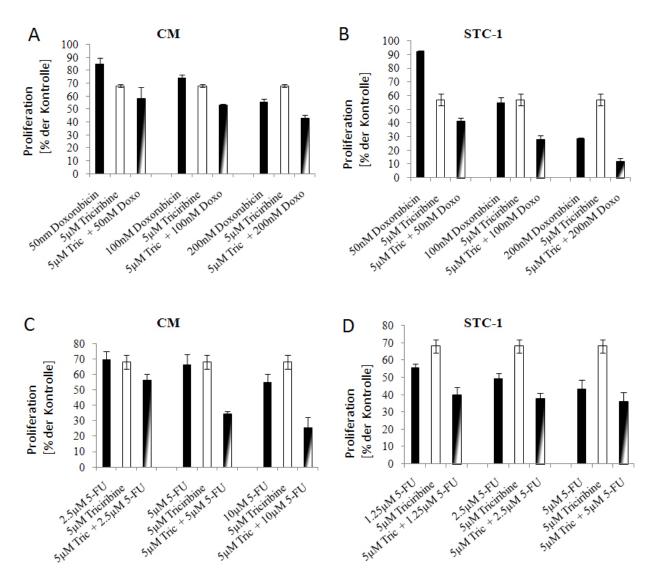
Um mögliche synergistische bzw. additive antiproliferative Effekte einer Kombinationtherapie aus Triciribine und Chemotherapeutika zu untersuchen, die klinisch bereits in der Therapie von GEP-NETs eingesetzt werden, wurden Wachstumsstudien durchgeführt.

Eine 48-stündige Monobehandlung von CM bzw. STC-1 Zellen mit dem DNA-interkalierenden Zytostatikum Doxorubicin (0-200 nM) führte zu einer dosisabhängigen Wachstumsinhibition von >40% (CM) und >55% (STC-1) (**Abb.3-9**).

Kombinationsbehandlungen aus Doxorubicin (0-200nM) zusammen mit einer sub-IC<sub>50</sub>-Konzentration von Triciribine ( $5\mu$ M) resultierte bei beiden Zelllinien in geringfügig synergistischen Wachstumsinhibitionen (**Tab.3-3**).

Bei CM Zellen führte die zweitägige Inkubation mit dem als Antimetabolit fungierenden Fluoropyrimidin 5-FU (0-10 μM) zu einer dosisabhängigen Wachstumsinhibition um 40%. Kombinationen aus 5-FU mit Triciribine (5μM) führten zu synergistischen wachstumsinhibitorischen Effekten von bis zu 75% (**Abb.3-9 C**) (**Tab.3-3**).

Bei den auf die Behandlung mit 5-FU sehr sensitiv reagierenden STC-1 Zellen wurde bereits bei  $2,5\mu M$  5-FU eine Wachstumsinhibition um >55% festgestellt (**Abb.3-9 D**). Demgegenüber ergab sich unter Kombinationsbehandlung mit Triciribine ( $5\mu M$ ) nur ein moderater Synergismus von 10% (**Tab.3-3**).



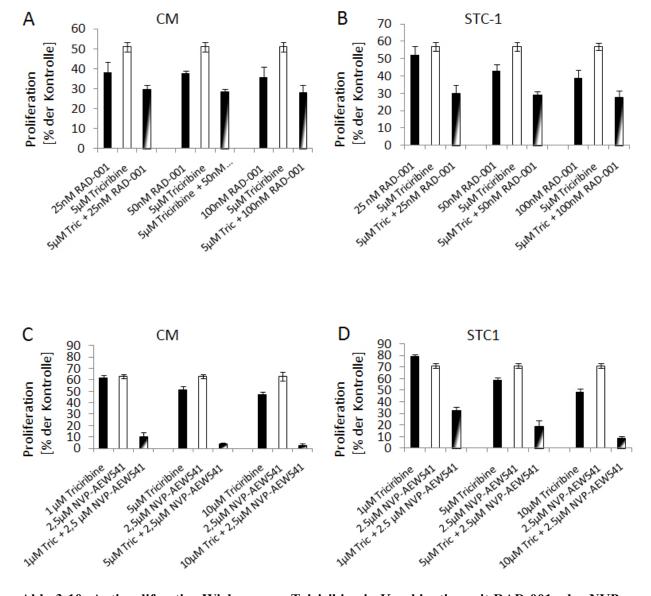
**Abb. 3-9:** Antiproliferative Wirkung von Triciribine in Kombination mit Doxorubicin und **5-FU.** Doxorubicin (0-200 nM) allein oder in Kombination mit Triciribine führt bei CM und STC-1 Zellen ( $\mathbf{A}+\mathbf{B}$ ) nach 48 stündiger Inkubation zu additiven- überadditiven Wachstumsinhibtionen. Auch bei Kombinationen von Triciribine mit 5-FU (0-10  $\mu$ M) wurden additive bis synergistische antiproliferative Effekte beobachtet. ( $\mathbf{C}+\mathbf{D}$ ). Daten sind angegeben als Prozent der unbehandelten Kontrolle, deren Wachstum im Inkubationszeitraum 100 % gesetzt wurde (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten).

#### 3.1.9.2 Kombinationen von Triciribine und anderen signalwegspezifischen Pharmaka

Um zu untersuchen, ob die gleichzeitige Inhibition verschiedener Elemente des PI3K-AKT-Signalweges wirkungsverstärkend ist, wurde Triciribine zum einen mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus), zum anderen mit dem IGF-1-Rezeptorinhibitor NVP-AEW541 kombiniert. 96-stündige Inkubation mit RAD-001 führte zu einer dosisabhängigen Inhibition von CM (**Abb.3-10 A**) und STC-1 Zellen (**Abb.3-10 B**) von > 60%. Kombinationen aus sub-IC<sub>50</sub>-

Konzentrationen von Triciribine (5μM) plus RAD-001 (Konz?) führte zu moderat synergistischen Wachstumsinhibitionen (**Tab.3-3**).

Die 96-stündige Inkubation mit NVP-AEW541 (2,5 $\mu$ M) führte zur Wachstumsinhibition von etwa 50% bei CM (**Abb.3-10 C**) und STC-1 Zellen (**Abb.3-10 D**). Kombinationen aus NVP-AEW541 mit steigenden Triciribine-Konzentrationen 1-10 $\mu$ M führte zu stark synergistischen Wachstumsinhibitionen von > 95% bei CM- und > 90% bei STC-1 Zellen (**Tab.3-3**).



**Abb. 3-10:** Antiproliferative Wirkung von Triciribine in Kombination mit RAD-001 oder NVP-AEW541. Effekte von RAD-001 (25-100 nM) als Monosubstanz oder in Kombination mit Triciribine bei CM und STC-1 Zellen (A+B) nach 96-stündiger Inkubation. Auch die Wachstumsinhibition durch NVP-AEW541 (2,5 μM) alleine, oder in Kombination mit Triciribine bei CM und STC-1 Zellen wurde untersucht (C+D). Daten wurden als Prozent einer unbehandelten Kontrolle angegeben (Mittelwerte ± S.E.M. aus n= 3 unabhängigen Experimenten).

	Doxorubicin (nmol/l)	Triciribine (µmol/l)	Fa	CI		5-FU(µmol/l)	Triciribine (µmol/l)	Ea	CI
CM Zellen	50	5	0.75	0.989	CM Zellen	2.5	5	0.69	0.256
	100	5	0.91	0.559		5	5	0.71	0.341
	200	5	0.93	0.845		10	5	0.73	0.463
STC-1 Zellen	5	5	0.58	0.734	STC-1 Zellen	1.25	5	0.6	0.349
	100	5	0.72	0.656		2.5	5	0.62	0.402
	200	5	0.88	0.705		5	5	0.64	0.496
	NVP-AEW54 (µmol/l)	1 Triciribin (μmοl/l)	e Fa	CI		Everolimus (nmol/1)	Triciribine (µmol/l)	Fa	CI
CM Zellen	2.5	1	0.89	0.388	CM Zellen	25	5	0.66	0.309
	2.5	5	0.95	0.285		50	5	0.78	0.325
	2.5	10	0.97	0.235		100	5	0.87	0.384
STC-1 Zellen	2.5	1	0.67	0.169	STC-1 Zellen	25	5	0.7	0.245
	2.5	5	0.81	0.095		50	5	0.7	0.341
	2.5	10	0.91	0.037		100	5	0.72	0.421

Tab.3-3: Synergistische Effekte von Triciribine in Kombination mit anderen Chemotherapeutika.

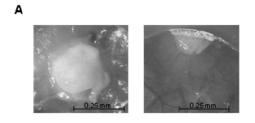
Fa: Fraktion der Zellen, die durch die Behandlung betroffen sind.

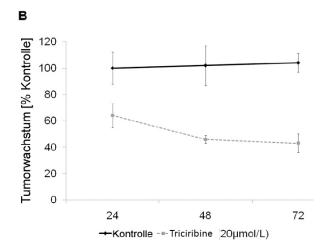
CI: Kombinationsindex (combination index).

Ein CI <0,9 steht für leicht synergistische Effekte von zwei Medikamenten, <0,7 für moderate synergistische Effekte, <0,3 für starke Synergie. Ein CI von 0,9-1,1 bezeichnet einen additiven Effekt. Ein CI > 1 steht für Antagonismus. Synergie wurde nach der Methode von Chou und Talaly mit dem Programm Calcusyn® berechnet (**Kap.2.2.7**). Daten aus mindestens n=3 unabhängigen Experimenten.

#### 3.1.10 In-vivo Effekte von Triciribine auf das Wachstum von GEP-NETs

Um die Effekte von Triciribine *in vivo* zu untersuchen, wurden Chorioallantoismembran(CAM)-Assays durchgeführt (**Kap. 2.2.9**). Matrigelplugs mit 2,5 Mio CM Zellen wurden auf der CAM von 10 Tage alten, befruchteten Hühnereiern aufgebracht und formten binnen 3 Tagen einen makroskopisch sichtbaren Tumor mit Anschluss an das versorgende Mirkogefäßnetzwerk der CAM. Nach topischer Behandlung mit Triciribine (20µmol/l) für 3 Tage wurde sowohl eine makroskopische Evaluation (**Abb.3-11 A**) als auch eine mathematische Berechnung des Tumorvolumens durchgeführt (**Abb.3-11 B**). Hierbei zeigte sich, dass das Wachstum von GEP-NETs durch die Behandlung mit Triciribine über 50% verringert wird.





**Abb.3-11:** Effekt von Triciribine auf neuroendokrine Tumoren (CM Zellen) im CAM-Assay. Tumore aus 2,5x10<sup>6</sup> Zellen wurden auf der CAM von 10 Tage alten befruchteten Hühnereiern aufgebracht. Nach Anwachsen der Tumore wurde mit 20µM Triciribine für 72 Std. behandelt. (A). Repräsentative Fotos der CM-Tumore nach 72-stündiger Behandlung. (B) Kalkuliertes Tumorvolumen der behandelten verglichen mit den unbehandelten Tumoren.

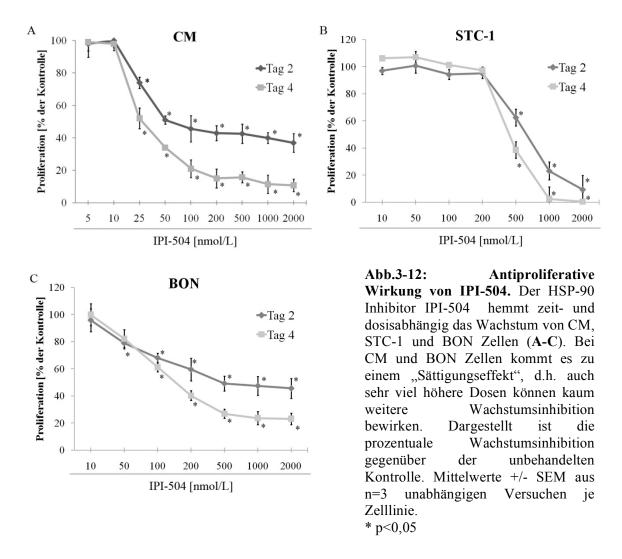
#### 3.2 HSP-90 Inhibition bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren

In einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer HSP-90 Inhibition auf GEP-NET Zellen untersucht. Ähnlich wie AKT spielt HSP90 eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Tumorzellen, beeinflusst die Zellzyklusregulation, und wurde bei einigen Tumorarten als fehlreguliert nachgewiesen. Effekte der Inhibition von HSP90 bei GEP-NETs wurde bisher noch nicht untersucht.

## 3.2.1 Antiproliferative Wirkung von IPI-504 auf gastrointestinale neuroendokrine Tumore

Nach 48- bzw. 96- stündiger Inkubation mit dem HSP-90 Inhibitor IPI-504 (0-2000nM) wurde das Wachstum mittels der Kristallviolett-Methode bestimmt (**Kap. 2.2.2.2**). Während sich bei CM und BON Zellen eine Sättigung der Wachstumsinhibition bei etwa 80% einstellt, kommt es bei STC-1 Zellen nach 96 Std. zu einem annähernd kompletten Proliferationsarrest unter hohen

Dosen von 1000 nM und mehr (**Abb.3-12 A-C**). Der nach 48 stündiger Inkubation berechnete IC<sub>50</sub>-Wert betrug 272 +/- 29 nmol/L für CM-Zellen653 +/- 39 nmol/L für BON-Zellen und Zellen 658 +/- 74 nmol/L für STC-1-Zellen..



#### 3.2.2 Regulation des IGF-1 Rezeptors unter IPI-504-Behandlung

Mittels Western-Blot wurden die Effekte von IPI-504 auf Proteinebene untersucht. Es wurde die Expression IGF-1R in GEP-NET Zellen unter Behandlung mit IPI-504 analysiert. Hierzu wurde ein Antikörper eingesetzt, der die intrazellulär lokalisierte,Tyrosinkinasendomäne tragende β-Kette des IGF1-R detektiert. Der IGF-1 Rezeptor signalisiert intrazellulär hauptsächlich über den PI3K-AKT-Weg und aktivierende Mutationen dieses Rezeptors wurden bei einigen Tumorarten nachgewiesen.

Unter Behandlung mit IPI-504 wurde bei CM und BON Zellen eine deutliche und konzentrationsabhängige Suppression der IGF-1R Expression festgestellt (Abb.3-13).

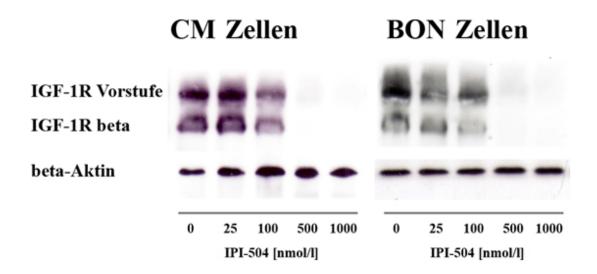


Abb.3-13: Regulationen der Proteinexpression von IGF1-R nach Behandlung mit IPI-504. Die 48 stündige Inkubation mit IPI-504 führte bei CM und BON Zellen zu einer dosisabhängigen Abnahme der IGF-1R Expression . β-Aktin diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung.

#### 3.2.3 Apoptose als "SubG1"-Fraktion nach IPI-504-Behandlung

Wie bereits zuvor beschrieben (vgl. **Kap. 2.2.6.1** und **Kap. 3.1.4.3**) kann durch die SubG1-Fraktion in der Durchflusszytometrie Rückschlüsse auf die Induktion bzw. das Vorliegen von Apoptose gezogen werden. Durch HSP90-Inhibition mit IPI-504 (0-1000nM) kommt es bei CM Zellen zu einem prozentualen Anstieg an apoptotischen Zellen um etwa das zehnfache (**Abb.3-14**)..

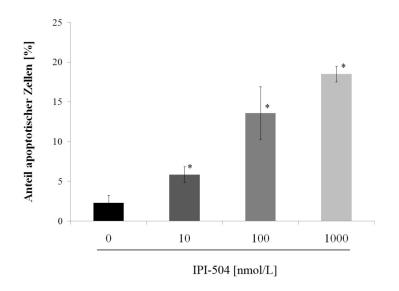
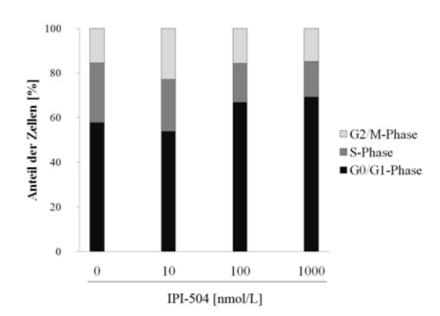


Abb. 3-14: Anteil der Zellen in der "Sub-G1"-Fraktion. CM vorbehandelt wurden und Propidiumiodid gefärbt (Kap. 2.2.7). Gezeigt wird der Anteil der Zellen, der in der "SubG1"-Fraktion liegt, verglichen mit Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>/M-Phase. Die "Sub-G1"-Fraktion wird zum großen Teil durch apoptotische Zellen gebildet. Mittelwerte  $\pm$  SEM n=3aus unabhängigen Versuchen, \* p<0,05

#### 3.2.4 IPI-504-induzierte Zellzyklusveränderungen

Nach 24 stündiger Inkubation mit IPI-504 (0-1000nM) wurden Veränderungen im Zellzyklus bei GEP-NETs am Beispiel von CM Zellen untersucht (vgl. **Kap.2.2.7** und **Kap. 3.1.5**). Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme an Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase mit proportionaler Abnahme an Zellen in der S- und  $G_2/M$ -Phase (**Abb.3-15**).



#### Abb. 3-15: Zellzyklusregulation durch IPI-504.

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit aufsteigenden Dosen IPI-504 akkumulierten die CM-Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Der Anteil der Zellen in der S- und der G2/M-Phase nahm parallel dazu in allen untersuchten Zelllinien ab. Bei 10nM zeigt sich dieser Effekt noch nicht, wobei anzumerken ist, dass bei dieser Konzentration in den Proliferationsversuchen noch zu keiner wachstumsinhibierenden Wirkung kam.

#### 3.2.5 Effekt von IPI-504 auf die Expression verschiedener Tumor-assoziierter Gene

Ähnlich wie bei Triciribine wurde auch für IPI-504 bei GEP-NETs ein Cancer Array untersucht (**Kap.3.2.2**). Dabei konnte für 36 Gene eine vermehrte Expression durch 48 Std.-Behandlung mit IPI504 bei CM-Zellen gezeigt werden. 17 Gene wurden supprimiert (**Tab.3-4**).

Zellzyklusarrest:. CDK2 und CDK4 als Zellzykluspromotoren wurden beide supprimiert (0,25 bzw 0,1-fache Expression der Kontrolle) Auch E2F1 (E2F transcription factor 1) zeigte sich nach IPI-504 Behandlung in der Expression stark vermindert (0,22fach). Retinoblastoma 1(RB1) inhibiert in der unphosphorylierten Form E2F1 und wurde vermehrt exprimiert (13,1fach). Weiterhin war die Expression von p16 (CDKN2A) als Inhibitor der Zellzyklusprogression induziert worden (16fach).

Apoptose: Die Inhibitoren von Apoptose, TIMP1, TIMP3 und Survivin (BIRC5) wurden in ihrer Expression supprimiert (0,01- bzw. 0,05- bzw. 0,3fach). Weiterhin waren V-akt und PDGFA (Teil des *platelet derived growth factor*) supprimiert. Proapoptotische Gene wie BAX, BAD, Caspase 9 und FAS wurden vermehrt exprimiert.

### supprimierte Gene

Symbol	Verhältnis	Produkt
TIMP1	0,01	TIMP metallopeptidase inhibitor 1
AKT1	0,03	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
TIMP3	0,05	TIMP metallopeptidase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy,
CDK4	0,10	Cyclin-dependent kinase 4
ERBB2	0,12	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
NME1	0,16	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in
TNFRSF10B	0,21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
E2F1	0,22	E2F transcription factor 1
CDK2	0,25	Cyclin-dependent kinase 2
BIRC5	0,30	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
ITGB5	0,30	Integrin, beta 5
S100A4	0,32	S100 calcium binding protein A4
MAP2K1	0,33	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
PDGFA	0,43	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
MMP2	0,44	Matrix metallopeptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase,
ITGB1	0,74	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide,
MCAM	0,79	Melanoma cell adhesion molecule

#### induzierte Gene

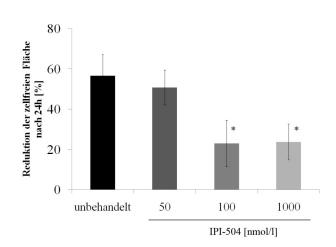
induzierte Gene	<u>e</u>	
Symbol	Verhältnis	Produkt
CCNE1	41,96	Cyclin E1
NFKBIA	41,9	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-
TWIST1	41,34	Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen
ITGA3	40,59	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3
FAS	40,34	Fas (TNF receptor superfam ily, member 6)
SYK	40,25	Spleen tyrosine kinase
JUN	39,59	Jun oncogene
BAI1	39,51	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
MDM2	38,05	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding
CCND1	36,81	Cyclin D1
IL8	36,53	Interleukin 8
TNFRSF25	35,85	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
SERPINE1	35,41	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen
SNCG	33,4	Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)
SERPINB5	32,35	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5
KISS1	32,32	KiSS-1 metastasis-suppressor
PNN	31,85	Pinin, desmosome associated protein
FOS	31,47	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CD44	30,29	CD44 molecule (Indian blood group)
BCL2L1	24,06	BCL2-like 1
HTATIP2	24,04	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa
GZMA	22,48	Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated
PLAUR	21,01	Plasminogen activator, urokinase receptor
MYC	17,37	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
SERPINB2	17,03	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
PIK3CB	16,17	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide

CDKN2A	15,93	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16,
BAD	15,87	BCL2-antagonist of cell death
MMP9	15,59	Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase,
NFKB1	14,4	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-
RB1	13,1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)
CDH1	11,41	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
BRCA1	10,76	Breast cancer 1, early onset
ITGAV	8,08	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide,
CASP9	6,77	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
BAX	5,43	BCL2-associated X protein

**Tab.3-4: Regulation von Zellzyklus- und Apoptose-relevanten Genen bei CM-Zellen nach IPI504-Behandlung.** Von den 113 analysierten krebsassoziierten Genen waren 36 überexprimiert und 17 supprimiert.

### 3.2.6 Änderung im Migrationsverhalten von GEP-NET Zellen durch HSP-90-Inhibition

Die Auswirkungen einer HSP-90 Inhibition auf die Migrationsfähigkeit von GEP-NETs wurde mittels eines "scratch assays" untersucht (**Kap. 2.2.5 und Kap. 3.1.8**). Bei konfluent gewachsenen CM Zellen lässt sich durch Inkubation mit Konzentrationen ab 100 nM eine signifikante Veränderung im Migrationsverhalten, d.h. zurückgelegte Strecke einzelner Zellen, im Vergleich zu unbehandelten Zellen feststellen (**Abb.3-16**). Eine weitere Konzentrationserhöhung führte zu keiner zusätzlichen Migrationshemmung.



Änderungen Abb.3-16: im Migrationsverhalten von GEP-NET Zellen durch IPI-504-Behandlung. Die prozentualen Veränderungen an zellfreier Fläche nach 24Std. sind in Prozent angegeben. Ab 100 nM IPI-504 kommt es zu einer signifikanten Abnahme Reduktion in der zellfreier Fläche. Mittelwerte +/- SEM aus mindestens n=3 unabhängigen Versuchen . \* p<0,05

#### 3.2.7 Kombination von IPI-504 mit anderen signalwegspezifischen Pharmaka

Es wurde untersucht, ob der Effekt einer HSP90-Inhibition durch Kombination mit Medikamenten, die am PI3K-AKT-Signalweg angreifen, verstärkt werden kann. 48-stündige

Inkubation mit IPI-504 zusammen mit dem IGF-1R Inhibitor NVP-AEW541 führte zu moderat synergistischen wachstumsinhibtiorischen Effekten bei BON-Zellen und zu nur additiven Effekten bei CM-Zellen (**Abb. 3-17** und **Tab. 3-5**). Kombination mit einem mTOR-Inhibitor (Everolimus) führte bei CM-Zellen zu additiven bis antagonistischen Effekten, während es bei BON-Zellen zu einer moderaten antiproliferativen Synergie kam.

Weiterhin untersuchten wir die Kombination einer AKT-Inhibition mit einem HSP90-Inhibitor, da für diese beiden Moleküle eine enge Interaktion nachgewiesen werden konnte (**Kap. 1.4.1**) HSP90 Inhibition mit gleichzeitiger AKT-Inhibition führte bei CM-Zellen lediglich zu additiven wachstumsinhibitorischen Effekten.

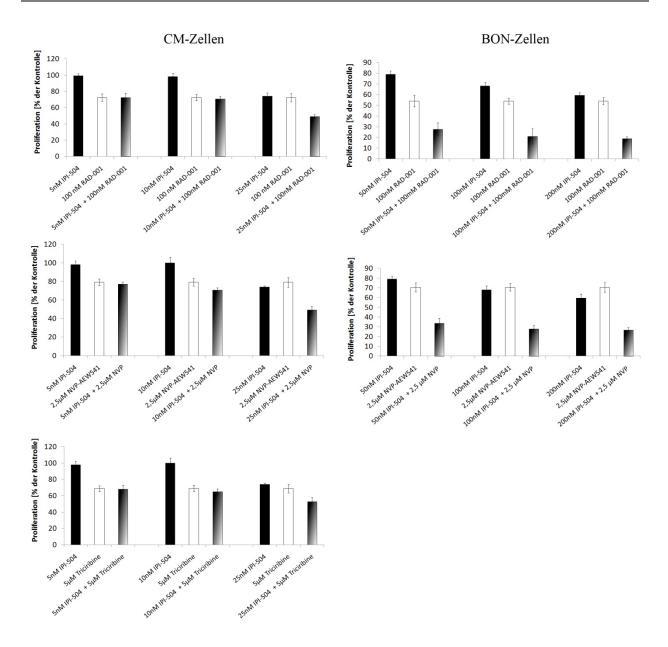
	IPI-504 (nmol/l)	NVP- AEW541 (µmol/l)	Fa	CI
CM Zellen	5 10 25	2.5 2.5 2.5	0.23 0.29 0.51	1.126 1.095 0.967
BON Zellen	50 100 200	2.5 2.5 2.5	0.66 0.72 0.73	0.335 0.298 0.357

	IPI-504 (nmol/l)	Triciribine (µmol/l)	Fa	CI
СМ	5	5	0.32	1.106
Zellen	10	5	0.35	1.098
	25	5	0.47	1.029

	IPI-504 (nmol/l)	RAD-001 (nmol/l)	Fa	CI
СМ	5	100	0.27	1.226
Zellen	10	100	0.29	1.290
	25	100	0.51	0.941
BON	25	100	0.72	0.521
Zellen	50	100	0.79	0.420
	100	100	0.81	0.421

Tab.3-5: Additive und synergistische antiproliferative Effekten von Triciribine in Kombination mit anderen Chemotherapeutika.

Fa: Fraktion der Zellen, die durch die Behandlung betroffen sind. CI: Kombinationsindex (combination index). Ein CI <0,9 steht für leicht synergistische Effekte von zwei Medikamenten, <0,7 für moderate synergistische Effekte, <0,3 für starke Synergie. Ein CI von 0,9-1,1 bezeichnet einen additiven Effekt. Ein CI > 1 steht für Antagonismus. Synergie wurde nach der Methode von Chou und Talaly (1984) mit dem Programm Calcusyn® berechnet (Kap.2.2.7). Die Daten ergeben sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

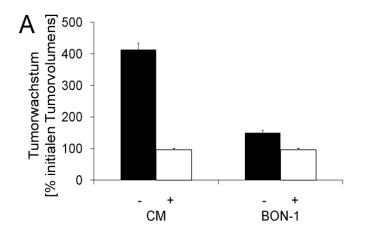


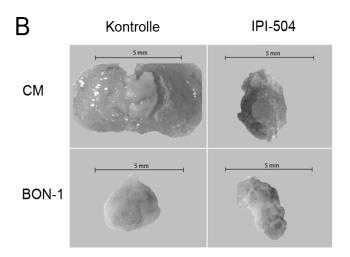
**Abb. 3-17:** Antiproliferative Wirkung von IPI-504 in Kombination mit RAD-001, NVP-AEW541 oder Triciribine. Gezeigt werden die wachstumsinhibierenden Effekte des mTOR-Inhibitors RAD-001 bzw. des IGF-1-R Inhibitors NVP-AEW541 allein und in Kombination mit IPI-504 bei CM und BON Zellen. Außerdem wird Triciribine bei CM Zellen als Monosubstanz oder als Kombination mit IPI-504 gezeigt. Alle Experimente wurden in serumhaltigem Medium durchgeführt. Daten wurden als Prozent einer unbehandelten Kontrolle angegeben (Mittelwerte ± SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten).

#### 3.2.8 In-vivo Evaluation der antineoplastischen Effekte von IPI-504 auf GEP-NETs

Um die wachstumsinhibitorische Potenz von IPI-504 bei GEP-NETs auch *in vivo* zu untersuchen, wurden CAM-Assays durchgeführt (**Kap. 2.2.9**). CM bzw. BON Zellen wurden resuspendiert und nach Mischung mit Matrigel auf eine CAM von 10 Tage alten Hühnerembryonen aufgebracht. CM-Zellen formten einen makroskopisch sichtbaren Tumor.

Nach topischer Behandlung mit IPI-504 (2µmol/l) für 72 Std. wurde sowohl eine makroskopische Evaluation (**Abb. 3-18 A**) als auch eine mathematische Berechnung der Veränderung des Tumorvolumens durchgeführt (**Abb. 3-18 B**). Hierbei zeigte sich, dass das Wachstum von GEP-NETs durch die Behandlung mit IPI-504 über 50% verringert wird.





**IPI-504** inhibiert Abb. 3-18: das Wachstum von GEP-NETs in vivo. Ein CAM-Assay wurde durchgeführt, um die Effekte von IPI-504 in vivo zu untersuchen. 2,5-5,0x10<sup>6</sup> CM oder BON-1 Zellen wurden in 20µL Medium and 30µL Matrigel Matrix resuspendiert und anschließend auf die befruchteten und über 10 Tage entwickelten Hühnereier aufgebracht. Nach 2 Tagen wurde die Tumor topisch mit entweder 100µl PBS (Negativkontrolle) oder PBS versetzt mit 2µM IPI-504 über behandelt. Am 14. Tag wurden die Tumoren präpariert. (A) zeigt die Veränderung des Tumorvolumens relativ zum Tumorvolumen. (B) zeigt makroskopische Bilder der Tumore. Eine deutliche Abnahme des Volumens ist zu erkennen.

#### 4 DISKUSSION

#### 4.1 Neue Therapiestrategien bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren

Die bisher zur Verfügung stehenden Therapieoptionen bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GEP-NETs) sind in ihrer Wirksamkeit oft sehr beschränkt. Insbesondere bei bereits metastasierten Tumoren stehen dem Kliniker nur wenige wirksame Alternativen zur Verfügung.

Die letzten Jahrzehnte zeichneten sich durch einen rasanten Anstieg an Verständnis und Wissen über die Tumorbiologie aus [124]. Zunehmend traten dabei einzelne molekulare Veränderungen in den Fokus des Forscherinteresses. Mittlerweile sind unzählige Moleküle und Proteine bekannt, die bei Tumoren verändert sein können, aber es ist schwierig,, diese Erkenntnisse in therapeutische Konzepte umzusetzen. Bei vielen Tumoren gibt es zwar bereits klinisch etablierte Medikamente, die gezielt veränderte Proteine und Rezeptoren beeinflussen [125]. Auch bei den GEP-NETs sind die Somatostatin-Analoga sowie der mTOR-Inhibitor Everolimus und der Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib erfolgreiche Beispiele dafür, dass durch die Erkenntnisse von molekularen Veränderungen eine gezielte Tumortherapie (targeted therapy) erfolgreich eingesetzt werden kann [42, 126].

Attraktive Ziele gezielter Therapien sind Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre nachgeschalteten Signalwege, da bei Tumorzellen diese häufig konstitutiv aktiviert sind und so Apoptose verhindern. GEP-NETs zeigen oft eine übermäßige Aktivierung von AKT sowie Mutationen von PTEN, dem wichtigsten Suppressorprotein des PI3K-AKT-Signalwegs [81, 82, 127]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von pAKT- zu PTEN-Expression die Prognose von Patienten mit GEP-NETs mitbestimmt [86].

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die Inhibition aller drei Isoformen des Proteins AKT als Teil des PI3K-AKT-Signalwegs ein vielversprechendes Konzept in der Behandlung von GEP-NETs darstellt. So konnte dadurch die Induktion von Apoptose erreicht, der Zellzyklus zum Arrest gebracht und die Migration von Tumorzellen verringert werden. Dabei korrelierte die Wirksamkeit der Inhibition mit dem PTEN-Status und der AKT-Aktivierung der untersuchten GEP-NET Modelle.

Neben der direkten Inhibition von Proteinen eines Signalweges bietet sich durch Hitzeschockproteine eine weitere, indirekte Möglichkeit zur Beeinflussung. Da Hitzeschockproteine essenziell für die Faltung sowie den Schutz vor dem Abbau von Proteinen sind, kann man durch Inhibition bestimmter Hitzeschockproteine eine ganze Reihe von

Zielproteinen beeinflussen. Dabei ist das Hitzeschockprotein 90 für Krebserkrankungen besonders interessant, da es bei vielen Tumoren überexprimiert ist (**Kap.1.4.2**).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gezielte Inhibition des Hitzeschockproteins 90 zur Auslösung von Apoptose und Zellzyklusarrest bei GEP-NET Zellen führt.und damit ein vielversprechendes Zielprotein für künftige Therapieansätze bei GEP-NETs spielen könnte.

# 4.2 AKT-Inhibition als eine vielversprechende Option in der Therapie gastrointestinaler neuroendokriner Tumore

### 4.2.1 Triciribine vermindert die Menge an aktiviertem AKT und Cyclin D1 in GEP-NETs

Sowohl bei mit Triciribine behandelten CM- als auch bei STC-1 Zellen konnte eine dosisabhängige Verminderung an aktiviertem, also phosphorylierter AKT nachgewiesen werden (Kap. 3.1.1). Korrelierend dazu nahm die Menge an Cyclin D1 bei beiden Zelllinien dosisabhängig ab. Cyclin D1 ist ein Protein, dessen Menge durch aktivierte AKT zunimmt [128], die nachgewiesene Verringerung der Menge an Cyclin D1 bestätigt somit , dass durch die Inhibition von AKT durch Triciribine auch die Effektorproteine beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu hatte Triciribine bei BON-Zellen in den verwendeten Konzentrationen kaum Einfluss auf die Menge an aktivierter AKT und verminderte auch die Menge an Cyclin D1 nicht signifikant. Betrachtet man die Menge an Gesamt-AKT im Vergleich zur Menge an phosphorylierter AKT ohne Triciribine-Behandlung in allen drei Zelllinien, so fällt auf, dass das Verhältnis von aktivierter AKT zu Gesamt-AKT bei BON-Zellen am geringsten war. Dies könnte ein Charakteristikum der Zelllinien sein, das die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber einer pharmakologischen AKT-Inhibition mitbeeinflusst.

## 4.2.2 Triciribine hemmt die Proliferation von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren

GEP-NETs sind eine sehr heterogene Tumorentität und es kommen sowohl sehr langsam wachsende als auch schnell wachsende, wenig differenzierte Tumore vor. Deshalb ist es wichtig, bei Untersuchungen von neuen Therapien für diese Gruppe auch mehrere Vertreter mit verschiedenen Charakteristika zu betrachten. Ich habe daher in meiner Arbeit drei GEP-NET Zelllinien mit unterschiedlichem Ursprung und Wachstumsraten untersucht: 1.) humane CM Zellen, die aus einem Insulinom isoliert wurden und die höchste Proliferationsrate der getesten GEP-NET Modelle aufwies (Verdopplungsrate: 21 Std.). 2.) humane BON Zellen, die aus den

Lebermetastasen eines Serotonin sezernierenden Karzinoids isoliert wurden (Verdopplungsrate: 34 Std.) und 3.) STC-1 Zellen, bei denen es sich um vergleichsweise langsam wachsende Cholezystokinin- sezernierendeDünndarmkarzinoidzellen mit einer Verdopplungsrate von 54 Std. handelt.

Die am schnellsten und langsamsten wachsenden Zelllinien CM und STC-1 sprachen sehr ähnlich auf die Behandlung mit Triciribine an. Der IC<sub>50</sub> von CM Zellen war dabei 12,7 +/-1,2μmol/L und sogar nur 7,1 +/- 0,8μmol/L für STC-1 Zellen. Ganz anders verhielt es sich bei moderat wachsenden BON-Zellen. Sie zeigten eine sehr geringe Empfindlichkeit gegenüber dem verwendeten AKT-Inhibitor. Bei den für die anderen Zelllinien benutzten Dosierungen kam es zu keinerlei Wachstumsinhibition, erst ab einer Dosis von 75 μmol/L konnte die Proliferation etwas gesenkt werden. Dabei ist davon auszugehen, dass derart hohe Mengen an Triciribine kaum *in-vivo* zu erreichen sein werden, berücksichtigt man die unerwünschten Nebenwirkungen von Triciribine, die sich bei hohen Dosierungen in klinischen Phase I/II Studien für andere Tumorentitäten gezeigt haben [129].

Wirkt ein Medikament antiproliferativ, gilt es abzuklären, ob dies auf einer eher unspezifischen, Substanz oder ob die zytotoxische Wirkung der beruht, beobachteten antiproliferativen/antineoplastischen Effekte aufgrund einer spezifische Wirkweise, im Sinne einer targeted therapy zurückzuführen ist. Im Falle einer unspezifischen Toxizität der Substanz kommt es zum auftreten von allg. Entzündungsreaktionen und es ist mit einem breiten Nebenwirkungsspektrum zu rechnen, da auch gesunde, v.a. schnell regeneriernde und proliferierende Zellen, stark betroffen sind. Die Folge sind z.B. Haarausfall, Diarrhö und Anämie. Mit einem Zytotxizitätsassay konnte in der vorliegenden Arbeit für Triciribine nachgewiesen werden, dass es in den untersuchten GEP-NET-Modellen nicht zur Induktion unspezifischer Zytotxizitätsreaktionen kommt. Hingegen wurde festgestellt, dass die antiproliferative Behandlung von GEP-NET Zellen mit Triciribine auf der spezifischen Induktion von Apoptose und/oder Zellzyklusarrest beruhen.

#### 4.2.3 Unterschiedliche Sensibilität der Zelllinien gegenüber Triciribine

Bei BON-Zellen ist eine konstitutive Aktivierung von AKT in der Literatur vorbeschrieben [82]. Weiterhin ist eine autokrine Aktivierung durch IGF-1 bei BON-Zellen als wichtiger Proliferationsreiz bekannt [48], wobei der IGF-1 Rezeptor u.a. über den PI3K-AKT-Weg signalisiert. Trotzdem zeigten sich BON-Zellen weitgehend unsensibel gegenüber einer Behandlung mit dem AKT-Inhibitor Triciribine..

Wie bereits in Kap. 4.2.1 kurz beschrieben korreliert die unterschiedliche Wachstumsinhibition mit der Menge an aktivierter AKT im Verhältnis zum Gesamt-AKT (**Kap. 3.1.1**). Dies könnte bedeuten, dass der PI3K-AKT-Signalweg bei BON-Zellen weniger aktiviert ist als bei den beiden anderen Zelllinien und somit eine Inhibition durch Triciribine weniger wirksam ist. Es konnte bereits für andere Zelllinien gezeigt werden, dass die Wirksamkeit von Triciribine mit der AKT-Aktivierung korreliert[91, 130].

Ein anderes Protein, das die Wirksamkeit von Triciribine beeinflussen könnte, ist PTEN. Es ist der wichtigste Inhibitor des PI3K-AKT-Signalweges (Kap. 1.3.2) und das bei Tumoren am zweithäufigsten mutierte Protein nach p53 [51]. So wurde z.B. beim Mammakarzionom dass nachgewiesen, Tumore durch PTEN-Mutationen resistent gegenüber Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibitoren werden können (z.B. gegenüber Trastuzumab) [54]). Bei derart mutierten und resistenten Tumoren scheint eine Therapie durch AKT-Inhibition besonders vielversprechend und wirksam zu sein [79]. Wegen dieser zentralen Rolle von PTEN in der Regulation von AKT wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von PTEN bei GEP-NETs überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass in CM Zellen, die sehr sensibel auf eine AKT-Inhibition reagieren, kaum PTEN exprimiert wurde, während in den Triciribine-insensitiven BON-Zellen eine hohe PTEN-Expression festgestellt wurde. (Kap. 3.1.6). Einen Sonderfall bilden die STC-1 Zellen, bei denen die Expression von PTEN nur geringfügig unter der von BON Zellen lag, trotzdem aber eine hohe Aktivierung von AKT im Vergleich zur Gesamt-AKT zeigen und dennoch sensibel auf Triciribine reagieren (Kap. 3.1.1 und Kap. 3.1.6).

#### 4.2.4 Induktion von Apoptose durch Triciribine bei GEP-NETs

Wichtige antiproliferative Mechanismen antineoplastischer Medikamente sind die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest. Sowohl die Unterdrückung von Apoptose als auch die Progression des Zellzyklus wird u.a. über den PI3K-AKT reguliert [47]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Triciribine Apoptose ausgelöst werden kann. Die Frühphase der Apoptose, in der das negativ geladene Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran präsentiert wird, konnte mit dem Annexin V-FITC Assay bei CM-Zellen nach Triciribine-Inkubation dargestellt werden (**Kap. 3.1.4.2**). Vereinzelt kamen hierbei auch schon spätapoptotische Zellen vor, was sich in der Anlagerung von Ethidiumbromid an die DNA der Zellen zeigte.

Als weitere Untersuchung eines spätapoptotischen Ereignisses wurde die Fragmentierung der DNA nach 48 Stunden durch Triciribine nachgewiesen (**Kap. 3.1.4.1**).

Einen ähnlichen Hinweis für Apoptose ergab sich aus den Ergebnissen der Durchflusszytometrie. Nach Behandlung mit Triciribine erhöhte sich die "SubG1"-Fraktion als Ausdruck apoptotischer Zellen signifikant (**Kap. 3.1.4.3**). Dies ist v.a. Ausdruck eines relativ späten Apoptoseereignisses, der DNA-Fragmentierung.

Auch der DNA-Microarray gab Hinweise auf Apoptoseinduktion durch Triciribine. So waren verschiedene proapoptotische Gene vermehrt exprimiert, und antiapoptotische supprimiert (**Kap. 3.1.5**). Der *apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF1) als wichtiger Initiator der Apoptose [131] ist nach AKT-Inhibition stark hochreguliert. Durch Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien als frühes Ereignis der Apoptose kommt es zur APAF1-Aktivierung, das dann zusammen mit Caspase 9 und Cytochrom C ein *Apoptosom* bildet.

Auch BAX (*BCL2-associated X protein*) wird durch Triciribine-Behandlung stark hochreguliert. Nach Aktivierung führt dieses Protein zur Cytochrom C- Ausschüttung aus den Mitochondrien indem es u.a. spannungsgesteuerte Anionenkanäle in der Mitochondrienmembran hilft zu öffnen. Über BAX ist bereits bekannt, dass es durch den PI3K-AKT-Signalweg reguliert wird [132].

Survivin (*Baculoviral IAP repeat-containing 5*) ist in normalen Zellen kaum, in Tumorzellen aber häufig sehr stark exprimiert und ist in der Lage, Apoptose zu unterdrücken [133]. Durch Triciribine-Behandlung konnte die Expression von Survivin verringert werden. Eine Regulation durch AKT wurde beschrieben [134].

Desweiteren zeigte sich *FAS* unter Triciribinebehandlung verstärkt exprimiert, ein Rezeptorprotein, das zur TNF-Rezeptorfamilie gehört [135]. Durch Aktivierung dieses Rezeptors wird der extrinsische Apoptoseweg induziert, u.a. durch Aktivierung von Caspase 8. Auch hier ist eine Regulation durch den PI3K-AKT-Signalweg beschrieben worden [136].

Die beschriebenen Ergebnisse bestätigen die in Studien für andere Tumorentitäten bereits beschriebene Induktion von Apoptose durch AKT-Inhibition [91]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine derartige Regulation nun erstmals auch für GEP-NET Zellen nachgewiesen werden.. In einer Studie von 2009 wurde der PI3K-Inhibitor *LY294002* bei BON Zellen untersucht. Allerdings wurden hierbei nur eine moderate Wachstumsinhibitionen bei hohen Dosierungen beobachtet [84]. Dabei kam es zu keiner Apoptose. Der beobachtete Effekt war allein auf die Induktion eines Zellzyklusarrest durch den PI3K-Inhibtor zurückzuführen. Vergleicht man die Ergebnisse mit der vorliegenden Arbeit, war auch Triciribine kaum in der Lage, das Wachstum von BON-Zellen zu inhibieren. Man könnte vermuten, dass Triciribine, ähnlich wie ein PI3K-Inhibitor, nicht in der Lage war, Apoptose bei BON-Zellen zu induzieren.

#### 4.2.5 Zellzyklusarrest durch AKT-Inhibition

Berücksichtigt man die Wachstumsinhibition von Triciribine, die bei CM- und STC-1 Zellen immerhin etwa 60% betrug, reicht die moderate Induktion von Apoptose kaum als alleinige Erklärung für die antiproliferative Wirkung aus. Ein Zellzyklusarrest würde eine weitere antiproliferative Wirkung entfalten.

Eine Reihe von Genprodukten, die an der Zellzyklussteuerung beteiligt sind, zeigten sich im Gene-Array reguliert. Cyclin E und CDK2 bilden zusammen einen Komplex, der, ähnlich wie Cyclin D1/CDK4/CDK6, den Transkriptionsfaktor E2F reguliert (Abb. 4-1). Sowohl die Expression von Cyclin E als auch die von CDK2 wurden durch Triciribine verringert. Der Hauptinhibitor dieses Komplexes, p21, wurde vermehrt exprimiert. Für den Transkriptionsfaktor E2F1 selbst konnte gezeigt werden, dass er eine wichtige Rolle beim kleinzelligen Bronchialkarzinom spielt, eine Tumorart, die den GEP-NETs sehr verwandt ist. Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom scheint er hingegen keine besondere Bedeutung zu haben [137]. Unter Triciribine-Behandlung zeigte sich E2F1 im Gene-Array supprimiert.

Neben den genannten molekularen Hinweisen auf Zellzyklusarrest wurde auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Wirkung einer AKT-Inhibition auf den Zellzyklus untersucht. So konnte ein dosisabhängiger prozentualer Anstieg an Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase als Ausdruck des Zellzyklusarrestes gezeigt werden (**Kap. 3.1.5**). Insbesondere die Kombination von etablierten Chemotherapeutika mit Medikamenten, die den Zellzyklus von Tumorzellen beeinflussen, gilt als ein möglicher Ansatz um die Anpsrechrate von Tumorzellen auf Therapieregime zu erhöhen, bzw. um mögliche Resistenzmechanismen zu umgehen [138]. Auch aufgrund dieser Überlegung wurden in der vorliegenden Arbeit die Kombinationen von Triciribine mit verschiedenen Chemotherapeutika untersucht (s.u.).

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die antiproliferative Wirkung von Triciribine sowohl auf Apoptose als auch auf einem Zellzyklusarrest beruht.

#### 4.2.6 Migrationshemmung durch Triciribine bei GEP-NETs

Bei der Metastasierungsfähigkeit eines Tumors spielt die Migration von Tumorzellen eine entscheidende Rolle [139]. Der PI3K-AKT-Signalweg übernimmt dabei eine wichtige Funktion. So zeigen Zellen mit inaktiviertem PI3K eine verminderte Migrationsfähigkeit, PTEN-negative Zellen eine verstärkte Migration [140].

Es wurde deshalb die Wirkung von Triciribine auf die Migrationsfähigkeit bei GEP-NETs untersucht. Der Migrations-Assay zeigte dabei eine dosisabhängige Verminderung von

Migration bei CM-Zellen (**Kap. 3.1.8**). Bei dem gewählten, recht einfach durchzuführendem Verfahren, ist eine vollständige Trennung der beiden Effekte bestehend aus Proliferation und Migration nicht gänzlich möglich. Dennoch erlaubt der gewählte kurze Beobachtungszeitraum von 24 Stunden die Schlussfolgerung, dass zusätzlich zur antiproliferativen Wirkung ein antimigratorischer Effekt durch Triciribine besteht.

## 4.2.7 Kombination etablierter Chemotherapeutika mit Triciribine

Fast alle derzeitigen Chemotherapieprotokolle bei Krebserkrankungen benutzen eine Kombination aus verschiedenen Medikamenten. Das hat v.a. zwei Gründe. Zum einen können so die einzelnen Medikamente niedriger dosiert werden, um Nebenwirkungen zu verringern, zum anderen werden so Resistenzentwicklungen bei den Krebszellen vermindert. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit bereits in der Therapie von GEP-NETs eingesetzte Chemotherapeutika mit Triciribine kombiniert. Dabei kann es grundsätzlich zu drei verschiedenen Effekten kommen:

- 1. Die beiden Medikamente wirken additiv, d.h. die Wirkung der Medikamente zusammen ist so groß wie die Wirkungen der einzelnen Medikamente bei gleicher Dosierung addiert.
- 2. Die beiden Medikamente wirken synergistisch, d.h. die Wirkung zusammen ist größer als aus den Einzelwirkungen zu erwarten gewesen wäre.
- 3. Die Medikamente wirken antagonistisch, d.h. die Wirkung ist zusammen kleiner, als die addierten Wirkungen der Einzelsubstanzen.

Dabei ist das erklärte Ziel synergistische Medikamente zu finden. Theoretische Überlegungen im Vorfeld können dabei helfen wahrscheinliche Kandidaten für einen synergistischen Effekt zu finden. So macht es wenig Sinn, zwei Medikamente mit dem gleichen Wirkmechanismus zu kombinieren, z.B. Medikamente die beide auf den Spindelapparat einer Zelle wirken.

Sowohl Doxorubicin als auch 5-FU sind Bestandteil aktuell benutzter Therapieschemata bei GEP-NETs. Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthrazykline und wirkt durch Interkalation von DNA sowie Inhibierung der Topoisomerase II. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Doxorubicin in Verbindung mit sub-IC<sub>50</sub> Konzentrationen von Triciribine zu additiven bis synergistischen Wachstumsinhibitionen bei CM- und STC-1 Zellen führte (**Kap. 3.1.9.1**). Der synergistische Effekt war aber, verglichen mit den anderen kombinationstherapeutischen Ansätzen mit Triciribine, vergleichsweise schwach ausgeprägt.

Fluorouracil (5-FU) ist ein Pyrimidin-Antimetabolit, der die DNA-Synthese stört, indem er anstelle von Cytosin oder Thymin in die DNA eingebaut wird und so zu Strangabbrüchen führt. Außerdem hemmt er die Thymidylatsynthase. Die Kombination von 5-FU mit Triciribine führte zu starken synergistischen Effekten, v.a. bei niedrigen von 5μM Konzentrationen 5-FU (**Kap.3.1.9.1**).

Beide untersuchten Kombinationspartner von Triciribine haben gemeinsam, dass sie zu DNA-Schäden führen. Die daraus resultierende gewünschte Apoptose wird u.a. über den Tumorsuppressor p53 vermittelt [141]. Auch AKT hat einen Einfluss auf p53. Wie in **Tab.1-1** beschrieben, wirkt AKT aktivierend auf MDM2. MDM2 kann direkt an p53 binden und so seine Ubiquitination und somit seinen nachfolgenden proteasomalen Abbau bewirken [142]. Eine Inhibierung von AKT führt also zu höheren Konzentrationen an p53, über die wiederum DNA-schädigende Medikamente Apoptose induzieren können. Dadurch kann die beobachtete synergistische Wirkung zwischen den beiden Medikamentengruppen erklärt werden [143].

## 4.2.8 Kombination von Triciribine mit anderen signalwegspezifischen Pharmaka

Die alleinige Inhibition eines Moleküls in einem Signalweg führt häufig zur kompensatorischen Hochregulation anderer proliferationsfördernder Enzyme, also zu einem sog. *escape*-Mechanismus [144].

Bei der Inhibition von mTORC1 wurde bereits beschrieben, dass es nachfolgend zu einer kompensatorischen Erhöhung von AKT kommt [145]. Deshalb wurde in dieser Arbeit Triciribine mit dem mTORC1-Inhibitor Rad-001 (Everolimus) kombiniert, um so die vermehrte AKT-Aktivierung zu unterbinden (**Kap. 3.1.9.2**).

Hierbei kam es zu moderaten bis starken synergistischen Effekten von Triciribine und Everolimus, die jedoch weniger ausgeprägt waren als z.B. bei dem ebenfalls getesteten IGF1-R Inhibitor.

Ein Grund für die relativ geringen Synergien von AKT- und mTOR-Inhibition könnte sein, dass es nach langdauernder Behandlung von Tumorzellen mit einem mTORC1-Inhibitor auch zusätzlich zu einer mTORC2-Inhibition kommen kann [62]. In der zitierten in vitro-Studie kam es bereits nach 24 stündiger Inkubation von HeLa Zellen mit Rapamycin (ein mTORC1-Inhibitor) zu einer Inhibition von mTORC2. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zur Synergiebestimmung wurden nach 48 stündiger Inkubation erhoben, und damit zu einem Zeitpunkt, an dem es schon zur mTORC2-Inhibition kommen könnte. Die mTORC2-Inhibition führt dann, wie in Kap. 1.3.3 beschrieben, zu einer verminderten Aktivierung von AKT. Eine

zusätzliche direkte Inhibition von AKT, wie in der vorliegenden Arbeit durch Triciribine erfolgt, würde also nur noch einen geringeren zusätzlichen Effekt ausüben.

Im Gene-Array zeigte sich, dass nach AKT-Inhibition der *insulin like growth factor 1* (IGF-1) 3,5-fach stärkere Expression aufwies. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch die kompensatorische Hochregulation des IGF-1 es zu einem *escape*-Mechanismus der Tumorzellen kommt. Kombinationen aus einer IGF-1R-Inhibition mit anderen Inhibitoren des PI3K-AKT-Signalweges wurden bereits bei anderen Tumorentitäten untersucht [146-148].

Es wurde deshalb die Kombination aus Triciribine und dem IGF-1 R-Inhibitor NVP-AEW541 untersucht, dessen ausgeprägte wachstumsinhibitorische Wirkung bei GEP-NET Zellen bereits belegt werden konnte [149].

Die Kombination aus Triciribine und NVP-AEW541 zeigte die stärkste synergistische Wirkung aller getesteten kombinationstherapeutischen Ansätze als möglicher Hinweis auf die erfolgreiche Unterdrückung eines escape-Mechanismus.

## 4.2.9 In-vivo Evaluation der antineoplastischen Effekte von Triciribine auf GEP-NETs

Die Effekte einer AKT-Inhibition bei GEP-NETs in vivo wurden mit Hilfe eines CAM-Assays untersucht. Mit Triciribine behandelte GEP-NET Tumore (CM-Zellen) wurden signifikant in ihrem Wachstum gehemmt (Kap. 3.1.10). CAM-Assays wurden bereits bei einigen anderen Tumorarten erfolgreich als in vivo Modell zur Untersuchung der Vitalität und Invasivität von Tumorzellen unter bestimmten Behandlungsregimen eingesetzt [150-152]. Auch in der vorliegenden Arbeit gelang es, GEP-NET Zellen auf einer Hühnermembran anzuzüchten und ein weiteres Wachstum zu beobachten. Triciribine führte nicht nur zu einer Wachstumsinhibition, sondern einer Abnahme des initialen Tumorvolumens. Neben der direkten Wachstumsinhibition der Tumorzellen können hierbei weitere Effekte eine Rolle gespielt haben, wie z.B. die Inhibition von Angioneogenese, die eine wichtige Voraussetzung für Tumorwachstum in vivo ist [153]. Für andere Inhibitoren des PI3K-AKT-mTOR Signalwegs konnte bereits gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, Tumor induzierte Angiogenese zu vermindern [154].

## 4.3 HSP-90-Inhibition bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren

# 4.3.1 Proliferationshemmende Effekte von IPI-504 bei verschiedenen GEP-NET-Zelllinien

Der HSP90-Inhibitor IPI-504 konnte im nanomolaren Konzentrationsbereich das Wachstum aller drei GEP-NET Zelllinien inhibieren.(**Kap. 3.2.1**). Dabei korrelierte die Sensibilität gegenüber IPI-504 mit der Replikationszeit der getesteten Zelllinien (**Kap.2.1.6**). CM-Zellen besitzen die schnellste Verdopplungsrate und der IC<sub>50 Wert</sub> von IPI-504 lag hier bei 26,4 +/-5,9 nmol/L. BON-Zellen mit ihrer etwas langsameren Verdopplungsrate hatten einen IC<sub>50</sub> von 163,8 +/- 12,4 nmol/L. Die am langsamsten wachsenden Zellen hatten auch den höchsten IC<sub>50</sub>-Wert von 489 +/-34,9 nmol/L.

## 4.3.2 Einfluss von IPI-504 auf den IGF1-Rezeptor

Die Wirkung von IPI-504 auf den IGF-1 Rezeptor wurde untersucht, da dieser bei GEP-NETs zu einem großen Teil über den PI3K-AKT-Weg intrazellulär signalisiert [155]. Es konnte in anderen Arbeiten bereits gezeigt weden, dass eine Inhibition des IGF-1 Rezeptors zu einer Wachstumshemmung von GEP-NET Zellen führt [149]. Weiterhin wird in klinischen Studien die Wirkung von IGF-1Rezeptorinhibitoren auf GEP-NETs derzeit untersucht [156].

HSP90-Inhibition führte bei den untersuchten GEP-NET Zellen zu einer dosisabhängigen Abnahme der Expression des IGF-1R (**Kap. 3.2.2**). Zumindest ein Teil der wachstumsinhibierenden Wirkung von IPI504 könnte dadurch erklärt werden.

Der Gene-Array lieferte Hinweise auf die vermutete Beeinflussung von AKT. So war die Expression von AKT1 um etwa das 30-fache nach HSP90-Inhibition supprimiert (**Kap. 3.2.5**). Zur genaueren Untersuchung wäre die Quantifizierung von p-AKT und HSP-90-Inhibition interessant gewesen. Leider gelang in der vorliegenden Arbeit keine aussagekräftige Darstellung der p-AKT-Menge bei GEP-NET Zellen unter Behandlung mit IPI-504.

## 4.3.3 IPI-504 induziert Apoptose bei GEP-NETs

Mittels Durchflusszytometrie wurde untersucht, inwieweit die IPI-504 vermittelte Wachstumsinhibition von GEP-Net Zelledurch die Induktion von Apoptose bewirkt wird. Dabei zeigte sich, dass IPI-504 in der Lage ist, den Anteil apoptotischer Zellen, gemessen als subG1-Fraktion, signifikant zu erhöhen (**Kap. 3.2.3**). Weiterhin bestätigten die Gene-Array Untersuchungen, dass IPI-504 apoptosespezifische Genregulation bei GEP-NET zellen

induzierte. (**Kap. 3.2.5**). Für den intrinsischen Apoptoseweg zeigte sich die Expression von Survivin stark runterreguliert. HSP90 fungiert als "*Chaperone*" von Survivin, schützt es also vor dem proteasomalen Abbau [157]. Inhibition von HSP90 führt demnach zu vermehrtem Abbau, wodurch die antiapoptotische Funktion von Survivin gehemmt wird. Survivin bildet in der gesunden Zelle einen Komplex mit Caspase-9 und kann so Caspase-9 vermittelte Apoptose verhindern (**Abb. 4-1**). Im Gene-Array zeigte sich eine erhöhte Caspase-9 Expression, was in Verbindung mit der verminderten Survivinexpression zu proapoptotischen Effekten führt.. Sowohl BAX als auch BAD, als wichtige Vermittler der Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien, wurden hochreguliert. Allerdings zeigte sich gegenläufig auch *BCL2-like 1* (*BCL2L1*), ein Gegenspieler der Aktivierung von BAX/BAD und Mitglied der BCL-2-Familie, hochreguliert.

Für den extrinsischen Apoptoseweg konnte eine sehr starke Expressionserhöhung von FAS, einem Rezeptorprotein als Bestandteil der sogenannten Todesrezeptoren, nachgewiesen werden. In der Vergangenheit konnte dazu bereits gezeigt werden, dass eine HSP90-Inhibition zur verstärkten Apoptose über den extrinsischen Apoptoseweg führt [158].

Die Expression von AKT war nach IPI-504 Behandlung stark vermindert. Auch dies unterstreicht die Verschiebung des zellulären Gleichgewichts in Richtung Apoptose.

#### 4.3.4 HSP90-Inhibition induziert Zellzyklusarrest bei GEP-NETs

HSP90 spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus, und ist entscheidend am  $G_0/G_1$ -S-Phasenübergang beteiligt [159].

Es konnte gezeigt werden, dass es unter HSP90-Inhibition zu einem dosiabhängigen  $G_0/G_1$ -S-Phasenarrest bei GEP-NETs kommt (**Kap. 3.2.4**).

Die verminderte Genexpression der für den G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-S-Phasenübergang wichtigen Proteine CDK2, CDK4 und E2F1 (**Abb.4-2**) deutet auf einen Zellzyklusarrest durch HSP90-Inhibition hin (**Kap.3.2.5**). Auch die vermehrte Expression des Zellzyklusinhibitors p16 passt zu einem Zellzyklusarrest (**Abb.4-2**) [160].

## 4.3.5 Migrationshemmung von GEP-NETs durch HSP-90 Inhibition

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition von HSP90 eine Migrationshemmung bei GEP-NETs erzielt werden kann (**Kap. 3.2.6**). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Studien an Endothelzellen, in denen gezeigt werden konnte, dass durch eine HSP90-Inhibition VEGF-vermittelte Migration verhindert werden kann [161]. Dabei wurde nachgewiesen, dass die

Migration v.a. über AKT vermittelt wird und HSP90-Inhibition eine AKT-Aktivierung verhindert.

HSP90 scheint auch extrazellulär die Migration von Tumorzellen zu beeinflussen [162, 163]. So wurde gezeigt, dass es zu einer extrazellulären Sekretion von HSP90 bei Tumorzellen kommen kann, die eine Zellmigration und –invasion begünstigen bzw. fördern. Die genaue Wirkweise ist noch nicht verstanden. Möglicherweise wirkt HSP90 extrazellulär als autokriner oder parakriner Faktor. Der in der vorliegenden Arbeit benutzte HSP90-Inhibitor könnte somit auch durch die extrazelluläre Inhibition von HSP90 die Migration von GEP-NET Zellen beeinflusst haben, ein besonders interessanter Aspekt für metastasierte GEP-NETs.

### 4.3.6 Kombination von IPI-504 mit anderen signalwegspezifischen Pharmaka

In der vorliegenden Arbeit sollte auch überprüft werden, ob die gleichzeitige Inhibierung weiterer Moleküle des PI3K-AKT-Signalwegs synergistische, wachstumsinhibitorische Effekte bringt. Ähnlich wie bei den Untersuchungen zu Triciribine wurde ein mTOR-Inhibitor (Everolimus) als Kombinationspartner für IPI-504 eingesetzt. Die Kombinationsexperimente ergeben bei CM-Zellen additive antiproliferative Effekte, während sich bei BON-Zellen sogar synergistische Effekte zeigten (*Kap.3.2.7*).

Inhibition von mTOR führt bei Tumorzellen zu einer verstärkten Aktivität u.a. von AKT, ERK und NfkB, vermittelt u.a. durch vermehrte Aktivität von mTORC2 [164]. Gleichzeitige Inhibition von HSP90 als Regulator der genannten Enzyme kann diese vermehrte Aktivität bremsen. Basierend auf diesen Überlegungen gibt es bereits eine klinische Studie, die die gleichzeitige Anwendung von IPI-504 und Everolimus beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom untersucht [165].

Bei der Kombination aus IPI-504 mit dem IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 zeigten sich ebenfalls synergistische Wachstumsinhibitionen. Auch hier zeigte sich bei BON-Zellen eine moderate Synergie, während bei CM-Zellen nur additive antiproliferative Effekte ausgelöst wurden.

Für Triciribine als Kombinationspartner wurden die BON-Zellen nicht betrachtet, da die Monotherapie mit Triciribine sich bereits als kaum wirksam zeigte. IPI-504 zusammen mit Triciribine bei CM-Zellen erzielte lediglich additive Effekte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die duale Inhibition von HSP-90 und anderer Enzyme des PI3K-AKT-Singalweges bei BON Zellen sehr vielversprechende Ergebnisse gezeigt hat. Die weitere klinische Untersuchung einer solchen Kombination sollte sicherlich verfolgt werden.

Die Wirkung einer doppelten Inhibition bei CM Zellen fiel dabei weit weniger ausgeprägt aus. Die zelltypspezifische Wirkung einer Kombinationstherapie sollte in vivo zukünftig weiter verifiziert werden.

#### 4.3.7 *In-vivo* Evaluation der antineoplastischen Effekte von IPI-504

Mit Hilfe eines CAM-Assays konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass IPI-504 in der Lage ist, das Wachstum von GEP-NETs (CM- und BON-Zellen) *in vivo* zu inhibieren (**Kap. 3.2.8**). Auch hier können andere Wirkungen als nur eine direkte Wachstumshemmung der Tumorzellen entscheidend sein. So wurde gezeigt, dass HSP90-Inhibition sowohl bei Tumorzellen direkt die VEGF-Expression vermindern kann, als auch direkt die Proliferation von Endothelzellen verhindert [166]. Bei Kolonkarzinomzellen konnte bereits eine Inhibition von Angioneogenese im CAM-Assay unter HSP90-Inhibition gezeigt werden [167].

## 4.4 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl die AKT-Inhibition als auch die Inhibition von HSP90 vielversprechende Ansätze für zukünftige Therapiestrategien bei GEP-NETs sind. Bei der AKT-Inhibition zeigt das Beispiel der wenig sensiblen BON-Zellen, dass eine genaue Auswahl geeigneter Patienten wichtig ist. Die derzeitigen Entwicklungen in der Krebstherapie deuten bereits immer mehr auf eine individuelle Charakterisierung von Tumoren bei Patienten hin, bei denen analysiert wird, welche molekularen Veränderungen vorliegen. So wäre auch bei der Therapie mit AKT-Inhibitoren eine solche vorherige molekulare Charakterisierung sinnvoll, insbesondere bezüglich des PTEN-Status und der Aktivierung von AKT. Die größte Rolle dürfte in Zukunft dabei der AKT-Inhibition als Kombinationspartner in der Therapie von GEP-NETs zukommen, da hier starke synergistische Effekte beobachtet wurden, während die Monotherapie nur bis zu einem gewissen Grad in der Lage war, das Zellwachstum zu unterbinden.

HSP90-Inhibition hat sich als außerordentlich wirksam zur Wachstumsinhibition von GEP-NETs gezeigt. Bereits sehr niedrige Konzentrationen im nanomolaren Bereich waren in der Lage, starke antineoplastische Wirkung bei allen untersuchten Zelllinien zu bewirken.

Aufgrund der hier erstmals gezeigten Eignung von Inhibitionen des AKT-Signalwegs bzw. des Regulatorproteins HSP-90 zur Wachstumsinhibition von GEP-NETs bin ich der Meinung, dass weiterführende *in vivo*-Untersuchungen sinnvoll und vielversprechend erscheinen. Ich hoffe,

dass meine Untersuchungen einen Anstoß und Beitrag dazu liefern konnten, diese beiden Signalwege als erfolgversprechende Ansatzpunkte zur dringend benötigten (Weiter-)Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte bei GEP-NETs zu verfolgen.

#### 5 LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Tetsu, O. and F. McCormick, *Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition*. Cancer Cell, 2003. **3**(3): p. 233-45.
- 2. Oberndorfer, S., *Karzinoide Tumoren des Dünndarms*. Frankf Z Pathol, 1907. 1: p. 425-432.
- 3. Yao, J.C., M. Hassan, A. Phan, et al., *One Hundred Years After "Carcinoid": Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States.* J Clin Oncol, 2008. **26**(18): p. 3063-3072.
- 4. Bosman FT, C.F., Hruban RH, Theise ND, *WHO Classification of Tumours of the Digestive System* 4th edition, 2010. **IARC, Lyon**.
- 5. Rindi, G., *The ENETS guidelines: the new TNM classification system.* Tumori, 2010. **96**(5): p. 806-9.
- 6. Klöppel, G., A. Couvelard, A. Perren, et al., ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification.

  Neuroendocrinology, 2009. 90(2): p. 162-166.
- 7. Scherübl, H., S. Faiss, and M. Zeitz, [Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract-diagnosis and therapy]. Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946), 2003. **128 Suppl 2**: p. S81-83-S81-83.
- 8. Modlin, I.M., K. Oberg, D.C. Chung, et al., *Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*. The Lancet Oncology, 2008. **9**(1): p. 61-72.
- 9. Garcia-Carbonero, R., J. Capdevila, G. Crespo-Herrero, et al., *Incidence, patterns of care and prognostic factors for outcome of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs): results from the National Cancer Registry of Spain (RGETNE)*. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2010. **21**(9): p. 1794-803.
- 10. Scherübl, H., S. Faiss, H.U. Jahn, et al., [Neuroendocrine tumors of the stomach (gastric carcinoids) are on the rise: good prognosis with early detection]. Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946), 2009. **134**(30): p. 1529-1535.
- 11. Carling, T., *Multiple endocrine neoplasia syndrome: genetic basis for clinical management.* Current Opinion in Oncology, 2005. **17**(1): p. 7-12.
- 12. Starker, L.F. and T. Carling, *Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Current Opinion in Oncology, 2009. **21**(1): p. 29-33.
- 13. Thorson, A., G. Biorck, G. Bjorkman, and J. Waldenstrom, *Malignant carcinoid of the small intestine with metastases to the liver, valvular disease of the right side of the heart (pulmonary stenosis and tricuspid regurgitation without septal defects), peripheral vasomotor symptoms, bronchoconstriction, and an unusual type of cyanosis; a clinical and pathologic syndrome.*American Heart Journal, 1954. **47**(5): p. 795-817.
- 14. van der Horst-Schrivers, A.N.A., A.N.M. Wymenga, T.P. Links, P.H.B. Willemse, I.P. Kema, and E.G.E. de Vries, *Complications of Midgut Carcinoid Tumors and Carcinoid Syndrome*. Neuroendocrinology, 2004. **80**(Suppl. 1): p. 28-32.
- 15. Akerstrom, G., M. Falconi, R. Kianmanesh, P. Ruszniewski, and U. Plockinger, *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: pre- and*

- perioperative therapy in patients with neuroendocrine tumors. Neuroendocrinology, 2009. **90**(2): p. 203-8.
- 16. Arnold, R., Y.J. Chen, F. Costa, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: follow-up and documentation.* Neuroendocrinology, 2009. **90**(2): p. 227-33.
- 17. Kwekkeboom, D.J., E.P. Krenning, R. Lebtahi, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: peptide receptor radionuclide therapy with radiolabeled somatostatin analogs.* Neuroendocrinology, 2009. **90**(2): p. 220-6.
- 18. Kwekkeboom, D.J., E.P. Krenning, K. Scheidhauer, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: somatostatin receptor imaging with (111)Inpentetreotide.* Neuroendocrinology, 2009. **90**(2): p. 184-9.
- 19. Oberg, K., D. Ferone, G. Kaltsas, U.P. Knigge, B. Taal, and U. Plockinger, *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biotherapy*. Neuroendocrinology, 2009. **90**(2): p. 209-13.
- 20. O'Toole, D., A. Grossman, D. Gross, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers*. Neuroendocrinology, 2009. **90**(2): p. 194-202.
- 21. Plockinger, U., B. Gustafsson, D. Ivan, W. Szpak, and J. Davar, *ENETS Consensus Guidelines* for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: echocardiography. Neuroendocrinology, 2009. **90**(2): p. 190-3.
- 22. Kianmanesh, R., P. Ruszniewski, G. Rindi, et al., *ENETS consensus guidelines for the management of peritoneal carcinomatosis from neuroendocrine tumors*. Neuroendocrinology, 2010. **91**(4): p. 333-40.
- 23. Kos-Kudla, B., D. O'Toole, M. Falconi, et al., *ENETS consensus guidelines for the management of bone and lung metastases from neuroendocrine tumors*. Neuroendocrinology, 2010. **91**(4): p. 341-50.
- 24. O'Toole, D., G. Rindi, U. Plockinger, and B. Wiedenmann, *ENETS consensus guidelines for the management of patients with rare metastases from digestive neuroendocrine tumors: rationale and working framework. Introduction.* Neuroendocrinology, 2010. **91**(4): p. 324-5.
- 25. Caplin, M., A. Sundin, O. Nillson, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Neoplasms: Colorectal Neuroendocrine Neoplasms*. Neuroendocrinology, 2011.
- 26. Delle Fave, G., D.J. Kwekkeboom, E. Van Cutsem, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Gastroduodenal Neoplasms*. Neuroendocrinology, 2011.
- 27. Falconi, M., D.K. Bartsch, B. Eriksson, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Neoplasms of the Digestive System. Well-Differentiated Pancreatic Non-Functioning Tumors.* Neuroendocrinology, 2011.
- 28. Jensen, R.T., G. Cadiot, M.L. Brandi, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Neoplasms: Functional Pancreatic Endocrine Tumor Syndromes.* Neuroendocrinology, 2011.

- 29. Pape, U.F., A. Perren, B. Niederle, et al., ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Neuroendocrine Neoplasms from the Jejuno-Ileum and the Appendix Including Goblet Cell Carcinomas. Neuroendocrinology, 2011.
- 30. Pavel, M., E. Baudin, A. Couvelard, et al., ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Liver and Other Distant Metastases from Neuroendocrine Neoplasms of Foregut, Midgut, Hindgut, and Unknown Primary. Neuroendocrinology, 2011.
- 31. Scherubl, H., R.T. Jensen, G. Cadiot, U. Stolzel, and G. Kloppel, *Management of early gastrointestinal neuroendocrine neoplasms*. World journal of gastrointestinal endoscopy, 2011. **3**(7): p. 133-9.
- 32. Sarmiento, J.M., G. Heywood, J. Rubin, D.M. Ilstrup, D.M. Nagorney, and F.G. Que, *Surgical treatment of neuroendocrine metastases to the liver: a plea for resection to increase survival.*Journal of the American College of Surgeons, 2003. **197**(1): p. 29-37.
- 33. Elias, D., P. Lasser, M. Ducreux, et al., *Liver resection (and associated extrahepatic resections)* for metastatic well-differentiated endocrine tumors: a 15-year single center prospective study. Surgery, 2003. **133**(4): p. 375-82.
- 34. Florman, S., B. Toure, L. Kim, et al., *Liver transplantation for neuroendocrine tumors*. Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract, 2004. **8**(2): p. 208-12.
- 35. King, J., R. Quinn, D.M. Glenn, et al., *Radioembolization with selective internal radiation microspheres for neuroendocrine liver metastases*. Cancer, 2008. **113**(5): p. 921-9.
- 36. Salazar, R., B. Wiedenmann, G. Rindi, and P. Ruzsinewski, *ENETS 2011 Consensus Guidelines* for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Tumors: An Update. Neuroendocrinology, 2011.
- 37. Reubi, J.C., Somatostatin and Other Peptide Receptors as Tools for Tumor Diagnosis and Treatment. Neuroendocrinology, 2004. **80**(Suppl. 1): p. 51-56.
- 38. Rinke, A., H.H. Muller, C. Schade-Brittinger, et al., *Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group.* Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2009. **27**(28): p. 4656-63.
- 39. Oberg, K., *Interferons in the management of neuroendocrine tumors and their possible mechanism of action.* The Yale Journal of Biology and Medicine, 1992. **65**(5): p. 519-529; discussion 531-536-519-529; discussion 531-536.
- 40. Pavel, M.E., J.D. Hainsworth, E. Baudin, et al., Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet, 2011. 378(9808): p. 2005-12.
- 41. Yao, J.C., M.H. Shah, T. Ito, et al., *Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors*. The New England Journal of Medicine, 2011. **364**(6): p. 514-23.
- 42. Raymond, E., L. Dahan, J.L. Raoul, et al., *Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. The New England Journal of Medicine, 2011. **364**(6): p. 501-13.

- 43. Raymond, E., L. Dahan, J.L. Raoul, et al., *Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med, 2011. **364**(6): p. 501-13.
- 44. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
- 45. Günzl, P. and G. Schabbauer, *Recent advances in the genetic analysis of PTEN and PI3K innate immune properties.* Immunobiology, 2008. **213**(9-10): p. 759-765.
- 46. Franke, T.F., *PI3K/Akt: getting it right matters*. Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6473-6488.
- 47. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism.* Nat Rev Genet, 2006. **7**(8): p. 606-619.
- 48. von Wichert, G., P.M. Jehle, A. Hoeflich, et al., *Insulin-like Growth Factor-I Is an Autocrine Regulator of Chromogranin A Secretion and Growth in Human Neuroendocrine Tumor Cells*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4573-4581.
- 49. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
- 50. Li, J., C. Yen, D. Liaw, et al., *PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer.* Science, 1997. **275**(5308): p. 1943-1947.
- 51. Trotman, L.C. and P.P. Pandolfi, *PTEN and p53: Who will get the upper hand?* Cancer Cell, 2003. **3**(2): p. 97-99.
- 52. Pilarski, R., *Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature*. Journal of Genetic Counseling, 2009. **18**(1): p. 13-27.
- 53. Pandolfi, P.P., *Breast Cancer Loss of PTEN Predicts Resistance to Treatment.* N Engl J Med, 2004. **351**(22): p. 2337-2338.
- 54. Berns, K., H.M. Horlings, B.T. Hennessy, et al., *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer.* Cancer Cell, 2007. **12**(4): p. 395-402
- 55. Yu, D., C.-H. Lu, S.L. Wyszomierski, et al., *Preclinical testing of clinically applicable strategies* for overcoming trastuzumab resistance caused by *PTEN deficiency*. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2007. **13**(19): p. 5883-8.
- 56. Bellacosa, A., J.R. Testa, S.P. Staal, and P.N. Tsichlis, *A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region*. Science (New York, N.Y.), 1991. **254**(5029): p. 274-277.
- 57. Coffer, P.J. and J.R. Woodgett, *Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families*. European Journal of Biochemistry / FEBS, 1991. **201**(2): p. 475-481.
- Jones, P.F., T. Jakubowicz, F.J. Pitossi, F. Maurer, and B.A. Hemmings, *Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily*.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. 88(10): p. 4171-4175.

- 59. Staal, S.P., Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(14): p. 5034-5037.
- 60. Toker, A. and A.C. Newton, *Cellular Signaling: Pivoting around PDK-1*. Cell, 2000. **103**(2): p. 185-188.
- 61. Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, and D.M. Sabatini, *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.* Science (New York, N.Y.), 2005. **307**(5712): p. 1098-1101.
- 62. Sarbassov, D.D., S.M. Ali, S. Sengupta, et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. Molecular Cell, 2006. **22**(2): p. 159-168.
- 63. Dummler, B. and B.A. Hemmings, *Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease*. Biochemical Society Transactions, 2007. **35**(Pt 2): p. 231-235.
- 64. Dummler, B., O. Tschopp, D. Hynx, Z.-Z. Yang, S. Dirnhofer, and B.A. Hemmings, *Life with a Single Isoform of Akt: Mice Lacking Akt2 and Akt3 Are Viable but Display Impaired Glucose Homeostasis and Growth Deficiencies.* Mol. Cell. Biol., 2006. **26**(21): p. 8042-8051.
- 65. Cho, H., J.L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, and M.J. Birnbaum, *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(42): p. 38349-38352.
- 66. Koseoglu, S., Z. Lu, C. Kumar, P. Kirschmeier, and J. Zou, *AKT1*, *AKT2* and *AKT3-dependent* cell survival is cell line-specific and knockdown of all three isoforms selectively induces apoptosis in 20 human tumor cell lines. Cancer Biology & Therapy, 2007. **6**(5): p. 755-62.
- 67. Irie, H.Y., R.V. Pearline, D. Grueneberg, et al., *Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of Cell Biology, 2005. **171**(6): p. 1023-1034.
- 68. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
- 69. Richardson, C.J., S.S. Schalm, and J. Blenis, *P13-kinase and TOR: PIKTORing cell growth.* Seminars in Cell & Developmental Biology, 2004. **15**(2): p. 147-159.
- 70. Burgering, B.M.T. and R.H. Medema, *Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty.* Journal of Leukocyte Biology, 2003. **73**(6): p. 689-701.
- 71. Sampson, J.R., *Therapeutic targeting of mTOR in tuberous sclerosis*. Biochemical Society Transactions, 2009. **37**(Pt 1): p. 259-264.
- 72. Rapp, U.R., M.D. Goldsborough, G.E. Mark, et al., *Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983. **80**(14): p. 4218-4222.
- 73. Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, et al., *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers*. Science (New York, N.Y.), 2004. **304**(5670): p. 554-554.
- 74. Larue, L. and A. Bellacosa, *Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3[prime] kinase//AKT pathways.* Oncogene. **24**(50): p. 7443-7454.

- 75. Grille, S.J., A. Bellacosa, J. Upson, et al., *The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines*. Cancer Research, 2003. **63**(9): p. 2172-2178.
- 76. Ciraolo, E., F. Morello, and E. Hirsch, *Present and future of PI3K pathway inhibition in cancer:* perspectives and limitations. Current medicinal chemistry, 2011. **18**(18): p. 2674-85.
- 77. Baselga, J., M. Campone, M. Piccart, et al., *Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer*. The New England Journal of Medicine, 2011.
- 78. Benjamin, D., M. Colombi, C. Moroni, and M.N. Hall, *Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors*. Nature Reviews. Drug Discovery, 2011. **10**(11): p. 868-80.
- 79. Lu, C.-H., S.L. Wyszomierski, L.-M. Tseng, et al., *Preclinical testing of clinically applicable strategies for overcoming trastuzumab resistance caused by PTEN deficiency*. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2007. **13**(19): p. 5883-8.
- 80. She, Q.-B., D. Solit, A. Basso, and M.M. Moasser, Resistance to Gefitinib in PTEN-Null HER-Overexpressing Tumor Cells Can Be Overcome through Restoration of PTEN Function or Pharmacologic Modulation of Constitutive Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Pathway Signaling. Clin Cancer Res, 2003. 9(12): p. 4340-4346.
- 81. Wang, L., A. Ignat, and C.A. Axiotis, *Differential expression of the PTEN tumor suppressor protein in fetal and adult neuroendocrine tissues and tumors: progressive loss of PTEN expression in poorly differentiated neuroendocrine neoplasms*. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry, 2002. **10**(2): p. 139-146.
- 82. Gaur, P. and G. van Buren, *Characterization of molecular targets in newly established human neuroendocrine tumor (NET) cell lines.* Annals of Surgical Oncology, 2009. **16**(0): p. 31-123.
- 83. Pitt S, Kloosterboer M, Kunnimalaiyaan M, and C. H, *Carcinoid tumor cell growth suppression by PI3 Kinase-Akt pathway inhibition*. Conference Of The Wisconsin Surgical Society, 2007. **October**.
- 84. Pitt, S., H. Chen, and M. Kunnimalaiyaan, *Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Suppresses Tumor Cell Proliferation and Neuroendocrine Marker Expression in GI Carcinoid Tumors*. Annals of Surgical Oncology, 2009.
- 85. Banck, M.S., R. Kanwar, A.A. Kulkarni, et al., *The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors*. J Clin Invest, 2013.
- 86. Pitt, S.C., R. Davis, M. Kunnimalaiyaan, and H. Chen, *AKT and PTEN expression in human gastrointestinal carcinoid tumors*. Am J Transl Res, 2009. 1: p. 291-299.
- 87. LLC, I., A Phase 2, Multicenter, Two Tier Study of IMC-A12 in Combination With Depot Octreotide in Patients With Metastatic, Well or Moderately Differentiated Carcinoid or Islet Cell Carcinoma. ClinicalTrials.gov [Internet], 2012. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US).
- 88. Tan, S., Y. Ng, and D.E. James, *Next-generation Akt inhibitors provide greater specificity: effects on glucose metabolism in adipocytes.* The Biochemical journal, 2011. **435**(2): p. 539-44.

- 89. Hoffman, K., F.A. Holmes, G. Fraschini, et al., *Phase I-II study: triciribine (tricyclic nucleoside phosphate) for metastatic breast cancer.* Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1996. **37**(3): p. 254-8.
- 90. Meuillet, E.J., *Novel inhibitors of AKT: assessment of a different approach targeting the pleckstrin homology domain.* Current medicinal chemistry, 2011. **18**(18): p. 2727-42.
- 91. Yang, L., H.C. Dan, M. Sun, et al., *Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt.* Cancer Research, 2004. **64**(13): p. 4394-9.
- 92. Tomillero, A. and M.A. Moral, *Gateways to clinical trials*. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 2009. **31**(2): p. 107-146.
- 93. Evangelisti, C., F. Ricci, P. Tazzari, et al., *Preclinical testing of the Akt inhibitor triciribine in T-cell acute lymphoblastic leukemia.* Journal of Cellular Physiology, 2011. **226**(3): p. 822-31.
- 94. Herlyn, M., S.M. Sebti, J.Q. Cheng, et al., *Akt/Protein Kinase B Signaling Inhibitor-2, a Selective Small Molecule Inhibitor of Akt Signaling with Antitumor Activity in Cancer Cells Overexpressing Akt.* Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4394-4399.
- 95. Mahalingam, D., R. Swords, J.S. Carew, S.T. Nawrocki, K. Bhalla, and F.J. Giles, *Targeting HSP90 for cancer therapy*. Br J Cancer, 2009. **100**(10): p. 1523-1529.
- 96. Young, J.C., V.R. Agashe, K. Siegers, and F.U. Hartl, *Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol*. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2004. **5**(10): p. 781-791.
- 97. Vali, S., R. Pallavi, S. Kapoor, and U. Tatu, *Virtual prototyping study shows increased ATPase activity of Hsp90 to be the key determinant of cancer phenotype*. Systems and Synthetic Biology, 2009.
- 98. Abramson, J.S., W. Chen, P. Juszczynski, et al., *The heat shock protein 90 inhibitor IPI-504 induces apoptosis of AKT-dependent diffuse large B-cell lymphomas*. British Journal of Haematology, 2009. **144**(3): p. 358-66.
- 99. Ehrenfried, J.A., B.E. Herron, C.M. Townsend, and B.M. Evers, *Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers*. Surgical Oncology, 1995. **4**(4): p. 197-203.
- 100. Giaginis, C., S.S. Daskalopoulou, S. Vgenopoulou, I. Sfiniadakis, G. Kouraklis, and S.E. Theocharis, *Heat Shock Protein-27*, -60 and -90 expression in gastric cancer: association with clinicopathological variables and patient survival. BMC Gastroenterology, 2009. **9**: p. 14-14.
- 101. Beliakoff, J. and L. Whitesell, *Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy*. Anti-Cancer Drugs, 2004. **15**(7): p. 651-662.
- 102. Sidera, K. and E. Patsavoudi, *Extracellular HSP90: conquering the cell surface*. Cell Cycle (Georgetown, Tex.), 2008. 7(11): p. 1564-1568.
- 103. Trepel, J., M. Mollapour, G. Giaccone, and L. Neckers, *Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer*. Nature Reviews. Cancer, 2010. **10**(8): p. 537-49.
- 104. Menezes, D., P. Taverna, M.R. Jensen, et al., *The Novel Oral Hsp90 Inhibitor Nvp-Hsp990 Exhibits Potent and Broad-Spectrum Anti-Tumor Activities in Vitro and in Vivo.* Molecular Cancer Therapeutics, 2012.

- 105. DeBoer, C., P.A. Meulman, R.J. Wnuk, and D.H. Peterson, *Geldanamycin, a new antibiotic*. The Journal of Antibiotics, 1970. **23**(9): p. 442-447.
- 106. Blagg, B.S.J. and T.D. Kerr, *Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation*. Medicinal Research Reviews, 2006. **26**(3): p. 310-338.
- 107. Siegel, D., S. Jagannath, D.H. Vesole, et al., *A phase 1 study of IPI-504 (retaspimycin hydrochloride) in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma*. Leukemia & lymphoma, 2011. **52**(12): p. 2308-15.
- 108. Baroni, M.G., M.G. Cavallo, M. Mark, L. Monetini, B. Stoehrer, and P. Pozzilli, *Beta-cell gene expression and functional characterisation of the human insulinoma cell line CM*. The Journal of Endocrinology, 1999. **161**(1): p. 59-68.
- 109. Evers, B.M., J. Ishizuka, C.M. Townsend, and J.C. Thompson, *The Human Carcinoid Cell Line, BON.* Annals of the New York Academy of Sciences, 1994. **733**(Molecular and Cell Biological Aspects of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor Disease): p. 393-406.
- 110. Chang, C.H., W.Y. Chey, Q. Sun, A. Leiter, and T.M. Chang, *Characterization of the release of cholecystokinin from a murine neuroendocrine tumor cell line, STC-1*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1994. **1221**(3): p. 339-347.
- 111. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, *Determination of cell number in monolayer cultures*. Analytical Biochemistry, 1986. **159**(1): p. 109-113.
- 112. Ke, N., X. Wang, X. Xu, and Y.A. Abassi, *The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability*. Methods Mol Biol, 2011. **740**: p. 33-43.
- 113. Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes, A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. Journal of Immunological Methods, 1988. 115(1): p. 61-69.
- 114. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
- 115. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science (New York, N.Y.), 1985. **230**(4732): p. 1350-1354.
- 116. Rodriguez, L.G., X. Wu, and J.L. Guan, *Wound-healing assay*. Methods Mol Biol, 2005. **294**: p. 23-9.
- 117. Gebäck, T., M.M.P. Schulz, P. Koumoutsakos, and M. Detmar, *TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays*. BioTechniques, 2009. **46**(4): p. 265-274.
- 118. Zhang, G., V. Gurtu, S.R. Kain, and G. Yan, *Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V.* BioTechniques, 1997. **23**(3): p. 525-531.
- 119. Fried, J., Z. Arlin, A. Alikpala, C.T. Tan, and B. Clarkson, *Kinetic response of human leukemic and lymphoma cells in vivo to combination chemotherapy using flow microfluorometry*. Cancer Treatment Reports, 1976. **60**(12): p. 1937-1946

- 120. Lizard, G., C. Miguet, S. Gueldry, S. Monier, and P. Gambert, [Flow cytometry measurement of DNA fragmentation in the course of cell death via apoptosis. New techniques for evaluation of DNA status for the pathologist]. Annales de pathologie, 1997. 17(1): p. 61-6.
- 121. Chou, T.C. and P. Talaly, *A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems*. J. Biol. Chem., 1977. **252**(18): p. 6438-6442.
- 122. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
- 123. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nature Reviews. Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
- 124. Macconaill, L.E. and L.A. Garraway, *Clinical implications of the cancer genome*. J Clin Oncol, 2010. **28**(35): p. 5219-28.
- 125. Tsai, C.J. and R. Nussinov, *The molecular basis of targeting protein kinases in cancer therapeutics*. Semin Cancer Biol, 2013.
- 126. Yao, J.C., M.H. Shah, T. Ito, et al., *Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med, 2011. **364**(6): p. 514-23.
- 127. Shah, T., D. Hochhauser, R. Frow, A. Quaglia, A.P. Dhillon, and M.E. Caplin, *Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Activation in Neuroendocrine Tumours*. Journal of Neuroendocrinology, 2006. **18**(5): p. 355-360.
- 128. Muise-Helmericks, R.C., H.L. Grimes, A. Bellacosa, S.E. Malstrom, P.N. Tsichlis, and N. Rosen, *Cyclin D Expression Is Controlled Post-transcriptionally via a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-dependent Pathway.* J. Biol. Chem., 1998. **273**(45): p. 29864-29872.
- 129. Farhad Ravandi, J.L., *Phase I Study of the Akt-Inhibitor Triciribine Phosphate Monohydrate in Patients with Advanced Hematologic Malignancy*. Oral and Poster Abstracts, 2008. **Poster Session: Acute Myeloid Leukemia Therapy, Excluding Transplantation Poster III**.
- 130. DeFeo-Jones, D., S.F. Barnett, S. Fu, et al., *Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members*. Molecular Cancer Therapeutics, 2005. **4**(2): p. 271-9.
- 131. Cecconi, F., G. Alvarez-Bolado, B.I. Meyer, K.A. Roth, and P. Gruss, *Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development*. Cell, 1998. **94**(6): p. 727-37.
- Tsuruta, F., N. Masuyama, and Y. Gotoh, *The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria*. The Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(16): p. 14040-7.
- 133. Altieri, D.C., *Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer.* Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8581-9.
- 134. Papapetropoulos, A., D. Fulton, K. Mahboubi, et al., *Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(13): p. 9102-5.
- 135. Scott, F.L., B. Stec, C. Pop, et al., *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering.* Nature, 2009. **457**(7232): p. 1019-22.
- 136. Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.

- 137. Eymin, B., S. Gazzeri, C. Brambilla, and E. Brambilla, *Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma*. Oncogene, 2001. **20**(14): p. 1678-87.
- Deep, G. and R. Agarwal, *New combination therapies with cell-cycle agents*. Curr Opin Investig Drugs, 2008. **9**(6): p. 591-604.
- 139. Tsuji, T., S. Ibaragi, and G.F. Hu, *Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis*. Cancer Research, 2009. **69**(18): p. 7135-9.
- 140. Iijima, M., Y.E. Huang, H.R. Luo, F. Vazquez, and P.N. Devreotes, *Novel mechanism of PTEN regulation by its phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding motif is critical for chemotaxis.* The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(16): p. 16606-13.
- 141. Longley, D.B., T. Latif, J. Boyer, W.L. Allen, P.J. Maxwell, and P.G. Johnston, *The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells*. Seminars in oncology, 2003. **30**(3 Suppl 6): p. 3-9.
- 142. Momand, J., H.H. Wu, and G. Dasgupta, *MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein*. Gene, 2000. **242**(1-2): p. 15-29.
- 143. Zhou, B.P., Y. Liao, W. Xia, Y. Zou, B. Spohn, and M.C. Hung, *HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation*. Nature cell biology, 2001. **3**(11): p. 973-82.
- 144. Alexander, S. and P. Friedl, *Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure.* Trends Mol Med, 2012. **18**(1): p. 13-26.
- 145. O'Reilly, K.E., F. Rojo, Q.-B. She, et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt.* Cancer Research, 2006. **66**(3): p. 1500-1508.
- 146. Naing, A., R. Kurzrock, A. Burger, et al., *Phase I trial of cixutumumab combined with temsirolimus in patients with advanced cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(18): p. 6052-60.
- 147. Naing, A., P. Lorusso, S. Fu, et al., *Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma*. Br J Cancer, 2013. **108**(4): p. 826-30.
- 148. Schwartz, G.K., W.D. Tap, L.X. Qin, et al., *Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial.* Lancet Oncol, 2013. **14**(4): p. 371-82.
- 149. Höpfner, M., V. Baradari, A. Huether, C. Schofl, and H. Scherübl, *The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(1): p. 135-149.
- 150. Subauste, M.C., T.A. Kupriyanova, E.M. Conn, V.C. Ardi, J.P. Quigley, and E.I. Deryugina, Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems. Clin Exp Metastasis, 2009. **26**(8): p. 1033-47.
- 151. Strojnik, T., R. Kavalar, T.A. Barone, and R.J. Plunkett, *Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains*. Anticancer Res, 2010. **30**(12): p. 4851-60.

- 152. Lokman, N.A., A.S. Elder, C. Ricciardelli, and M.K. Oehler, *Chick Chorioallantoic Membrane* (CAM) Assay as an In Vivo Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis. Int J Mol Sci, 2012. 13(8): p. 9959-70.
- 153. Carmeliet, P., Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature, 2005. 438(7070): p. 932-6.
- 154. Karar, J. and A. Maity, *PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 51.
- 155. von Wichert, G., U. Haeussler, F.R. Greten, et al., *Regulation of cyclin D1 expression by autocrine IGF-I in human BON neuroendocrine tumour cells*. Oncogene, 2004. **24**(7): p. 1284-1289.
- 156. (NCI), N.C.I., *Phase I Study of Cixutumumab and mTOR Inhibitor, Everolimus, in Advanced Low to Intermediate Grade Neuroendocrine Carcinoma*. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2013.
- 157. Fortugno, P., E. Beltrami, J. Plescia, et al., *Regulation of survivin function by Hsp90*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(24): p. 13791-6.
- 158. Vanden Berghe, T., M. Kalai, G. van Loo, W. Declercq, and P. Vandenabeele, *Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(8): p. 5622-9.
- 159. Burrows, F., H. Zhang, and A. Kamal, *Hsp90 activation and cell cycle regulation*. Cell cycle, 2004. **3**(12): p. 1530-6.
- 160. Stone, S., P. Dayananth, and A. Kamb, *Reversible, p16-mediated cell cycle arrest as protection from chemotherapy.* Cancer Res, 1996. **56**(14): p. 3199-202.
- Miao, R.Q., J. Fontana, D. Fulton, M.I. Lin, K.D. Harrison, and W.C. Sessa, *Dominant-negative Hsp90 reduces VEGF-stimulated nitric oxide release and migration in endothelial cells*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2008. **28**(1): p. 105-11.
- 162. Tsutsumi, S. and L. Neckers, Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. Cancer Sci, 2007. **98**(10): p. 1536-9.
- 163. Li, W., D. Sahu, and F. Tsen, Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(3): p. 730-41.
- 164. Stoeltzing, O., *Dual-targeting of mTOR and HSP90 for cancer therapy: facing oncogenic feed-back-loops and acquired mTOR resistance.* Cell Cycle, 2010. **9**(11): p. 2051-2.
- Infinity Pharmaceuticals, I., Phase 1b/2 Study of Retaspimycin HCl (IPI-504) in Combination With Everolimus in KRAS Mutant Non-small Cell Lung Cancer. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2013. Available from: http://clinicaltrials.gov/show/NCT01427946 NLM Identifier: NCT01427946.
- 166. Sanderson, S., M. Valenti, S. Gowan, et al., *Benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors modulate multiple functions required for tumor angiogenesis*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(3): p. 522-32.
- 167. Mahaseth, H., G.P. Nagaraju, R. Diaz, et al., *Abstract 2326: Antiangiogenic effects associated with the inhibition of HSP90 in colorectal cancer*. Cancer Research, 2012. **72**(8 Supplement): p. 2326-23

## 6 Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Christoph Ruwwe-Glösenkamp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Neue pharmakologische Therapieansätze bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum Unterschrift

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Christoph Ruwwe-Glösenkamp hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Gloesenkamp CR, Nitzsche B, Ocker M, Di Fazio P, Quint K, Hoffmann B, Scherübl H, Höpfner; AKT inhibition by triciribine alone or as combination therapy for growth control of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors; *Int J Oncol. 2012 Mar;40(3):876-88* 

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Mitgestaltung der Themefindung. Praktische Durchführung eines Großteils der Experimente. Hauptteil des Manuskripts mitverfasst.

Publikation 2: Gloesenkamp C, Nitzsche B, Lim AR, Normant E, Vosburgh E, Schrader M, Ocker M, Scherübl H, Höpfner M. Heat shock protein 90 is a promising target for effective growth inhibition of gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Int J Oncol. 2012 May;40(5):1659-67* 

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Mitgestaltung der Themefindung. Praktische Durchführung eines Großteils der Experimente. Hauptteil des Manuskripts mitverfasst.

Publikation 3: Nitzsche B, Gloesenkamp C, Schrader M, Ocker M, Preissner R, Lein M, Zakrzewicz A, Hoffmann B, Höpfner M. Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer.* 2010 *Jun* 29;103(1):18-28

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Praktische Durchführung und Auswertung von Teilen der Experimente. Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts (Material & Methoden und Ergebnisteil).

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

# 7 LEBENSLAUF

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

#### 8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Nitzsche, B, C Gloesenkamp, M Schrader, B Hoffmann, F Zengerling, S Balabanov, F Honecker, M Höpfner.

Anti-tumour Activity of Two Novel Compounds in Cisplatin-resistant Testicular Germ Cell Cancer." *Br J Cancer* 107, no. 11 (November 20, 2012): 1853–1863

Gloesenkamp C, Nitzsche B, Lim AR, Normant E, Vosburgh E, Schrader M, Ocker M, Scherübl H, Höpfner M.

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

Gloesenkamp CR, Nitzsche B, Ocker M, Di Fazio P, Quint K, Hoffmann B, Scherübl H, Höpfner

AKT inhibition by triciribine alone or as combination therapy for growth control of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Oncol. 2012 Mar;40(3):876-88*.

Nitzsche B, Gloesenkamp C, Schrader M, Ocker M, Preissner R, Lein M, Zakrzewicz A, Hoffmann B, Höpfner M.

Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*. 2010 Jun 29;103(1):18-28

#### 9 DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. Michael Höpfner danke ich sehr für die interessante Aufgabenstellung, die außerordentlich gute Betreuung und kontinuierliche Unterstützung und die konstruktiven Diskussionen. Es war eine große Freude in seiner Arbeitsgemeinschaft zu forschen.

Herrn Professor Dr. Scherübl gilt mein großer Dank für die Überlassung des Themas und seine Hilfe bei meinem Einstieg in die Forschung.

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.

Bei Bianca Nitzsche bedanke ich mich dafür, dass sie mir mit ihrer Erfahrung in molekularbiologischen Untersuchungen oft weitergeholfen hat.

Ich danke Björn Hoffmann für die sehr gute Zusammenarbeit und seine Geduld bei meinen holprigen Anfängen im Umgang mit Zellkulturen sowie für seinen sehr leckeren Kaffee.

Bei Kerstin Kapp bedanke ich mich für die Hilfe bei den FACS-Untersuchungen.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Anne Calaminus, die mich während der gesamten Doktorarbeit motiviert und mir enorm weitergeholfen hat.

... und schließlich danke ich meiner Familie, die mich in all meinen Unternehmungen immer unterstützt hat.