

1 EINLEITUNG

1.1 Gastrointestinale Tumore

1.1.1 Gastrointestinale neuroendokrine Tumore

Gastrointestinale neuroendokrine Tumore (NET) stellen eine relativ seltene und stark heterogene Tumorentität dar. Fast die Hälfte aller fernmetastasierter neuroendokriner gastrointestinaler Tumore setzt große Mengen an biogenen Aminen und Neuropeptiden frei, die ursächlich für die charakteristischen Hypersekretionssyndrome sind. Die Symptome der Hypersekretion, wie z.B. anfallsartige Hautrötung, krampfartige Bauchschmerzen, Durchfälle, Herzbeschwerden und Atembeschwerden können im Allgemeinen durch Somatostatinanaloga oder Interferon- α gut kontrolliert werden (Faiss et al., 1996; Öberg, 2001). Bisher gibt es aber nur unzureichende medikamentöse Behandlungsformen, die das Wachstum und die Metastasierung von neuroendokrinen Tumoren verhindern.

Das Wachstumsverhalten von neuroendokrinen Tumoren zeigt eine erstaunlich große Spannweite, die von sehr langsam über mäßig schnell bis zu sehr schnell wachsenden Tumoren reicht (Öberg, 1994). Bei Patienten mit anaplastischen und schnell wachsenden Tumoren ist eine zytoreduktive Chemotherapie indiziert und geht mit einem Überlebensvorteil einher. Bei Patienten mit langsam fortschreitenden neuroendokrinen Tumoren, z.B. des Dünndarms ist jedoch kein Überlebensvorteil durch Chemotherapie gesichert. Wegen der besonderen Biologie neuroendokriner Tumorerkrankungen sind neuartige Behandlungsstrategien wünschenswert, die zum einen wirksam und gut verträglich sind und zum anderen das Wachstum von neuroendokrinen Tumoren unabhängig von deren Proliferationsverhalten und Ausbreitung effektiv hemmen.

1.1.2 Hepatozelluläre Karzinome

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) macht ungefähr 80 % der primären malignen Lebertumore bei Erwachsenen aus und ist damit die häufigste Form des primären Lebertumors. Das HCC ist die fünfthäufigste Tumorentität weltweit und die dritthäufigste krebssbedingte Todesursache (Parkin, 2001). Jährlich erkranken mehr als 620.000 Menschen an primärem Leberkrebs und fast genauso viele (600.000) sterben daran. Die Inzidenz des HCC zeigt deutliche geographische Unterschiede. Das HCC ist vor allem in Asien und Subäquatorial-Afrika sehr verbreitet. Seit etwa 20 Jahren wird aber auch über steigende Inzidenzen in den Industrienationen, vor allem in den USA und Europa berichtet (Schurr et al., 2006).

Risikofaktoren für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms sind insbesondere virale Hepatitiden. Die chronische Hepatitis B mit HBs-Antigenpersistenz geht einher mit einem 200-fach erhöhten Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln. Untersuchungen zur chronischen Hepatitis C-Infektion weisen auf ein noch höheres HCC-Risiko hin. Weitere Risikofaktoren sind die Hämochromatose, chronische Lebererkrankungen durch Alkoholabusus, Aflatoxinexposition, Adipositas und Diabetes mellitus (Schurr et al., 2006). In westlichen Ländern ist die Leberzirrhose die wichtigste Grunderkrankung für die Entwicklung eines HCCs.

Die Prognose für Patienten mit fortgeschrittenem HCC ist sehr ungünstig. Die durchschnittliche Überlebenszeit symptomatischer Patienten beträgt meist nur wenige Monate. Kurative HCC-Resektionen, lokale ablativ Verfahren oder Lebertransplantationen sind nur bei einem geringen Teil der Patienten möglich. Die derzeitigen palliativen Therapieformen (Chemoembolisation, Chemotherapie und Hormontherapie) sind bei den meist fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen äußerst unbefriedigend und führten bislang zu keiner signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der betroffenen Patienten (El Serag et al., 2001). Neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen sind daher dringend notwendig.

1.1.3 Cholangiozelluläre Karzinome

Das cholangiozelluläre Karzinom (Synonym: Cholangiokarzinom, CCC) macht etwa 3 % aller gastrointestinalen Tumoren aus und ist der zweithäufigste primäre Lebertumor (Vauthey et al., 1994; Khan et al., 2002). Es handelt sich dabei um einen Tumor, der seinen Ursprung in den Gallengängen der Leber hat. Cholangiozelluläre Karzinome werden je nach Lokalisation in intrahepatische oder extrahepatische Karzinome unterteilt.

Cholangiokarzinome sind hoch maligne und haben eine sehr schlechte Prognose (Gores, 2003). Die Inzidenzrate für das intrahepatische CCC hat weltweit zugenommen (Khan et al., 2005), während die Inzidenz für das extrahepatische CCC abgenommen hat. Letzteres lässt sich wahrscheinlich auf die vermehrte Durchführung von Cholecystektomien in den letzten Jahrzehnten zurückführen (Taylor-Robinson et al., 2001; Khan et al., 2002).

Risikofaktoren für die Entwicklung eines cholangiozellulären Karzinoms sind vor allem die primär sklerosierende Cholangitis, chronische Gallengangsentzündung, Parasitenbefall (Leberegel) und Gallensteine (Khan et al., 2005). Für das intrahepatische

CCC wird außerdem angenommen, dass auch die chronische Hepatitis-B- und die chronische Hepatitis-C-Infektion, HIV und die nichtalkoholische Steatohepatitis Risikofaktoren darstellen (Shaib et al., 2005).

Die einzige kurative Therapieoption bei cholangiozellulären Karzinomen ist die chirurgische Resektion (Kubicka, 2004). Die Prognose von irresektablen Cholangiokarzinomen ist ungünstig. Die palliative Chemotherapie oder Radiotherapie zeigten bisher keine Verlängerung des Überlebens der Patienten (Patel, 2006). Daher ist eine Medikation, die das Tumorzellwachstum kontrollieren bzw. hemmen könnte, zur Behandlung von fortgeschrittenen cholangiozellulären Tumoren wünschenswert.

1.1.4 Kolorektale Karzinome

Krebserkrankungen des Dickdarms (Kolon) und Mastdarms (Rektum) werden zusammen als kolorektales Karzinom oder Darmkrebs bezeichnet. Das kolorektales Karzinom ist in den westlichen Industrieländern die zweithäufigste Krebserkrankung und zählt weltweit zu den vier häufigsten malignen Tumoren (Kullmann, 2001). Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts erkrankten allein in Deutschland im Jahr 2002 über 70.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom, und pro Jahr werden etwa 30.000 Todesfälle registriert. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit kolorektalen Karzinomen ist, in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium, sehr unterschiedlich. Während die Überlebensrate bei Patienten in frühen Erkrankungsstadien nach der operativen Entfernung des Tumors 83-93 % beträgt, sinkt die Überlebensrate von Patienten mit multiplen lokalen Lymphknotenmetastasen auf unter 45 %. Bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen fällt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 8 % (O'Connell et al., 2004).

Bei ca. 25 % der Fälle wird die Karzinomentstehung durch eine genetische familiäre Prädisposition hervorgerufen, dagegen treten ca. 75 % der kolorektalen Karzinome sporadisch, d.h. ohne familiäre Prädisposition, auf (Stephenson et al., 1991). Dabei steigt das Risiko einer Erkrankung an Dickdarmkrebs mit zunehmendem Alter. Auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen (z.B. Colitis ulcerosa) können das Risiko für ein kolorektales Karzinom erhöhen. Weitere allgemeine Risikofaktoren sind Adipositas ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$), Bewegungsarmut, eine ballaststoffarme und fleischreiche Ernährung, erhöhter Alkoholkonsum und möglicherweise auch Rauchen.

Die Therapie kolorektaler Karzinome erfolgt in Abhängigkeit vom Tumorstadium. Während in den frühen Stadien ein kurativer Ansatz durch Resektion des Tumors

einschließlich der lymphatischen Abflusswege erfolgt und bei Lymphknotenbefall postoperativ durch adjuvante Chemotherapie unterstützt wird, werden im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium palliative chemotherapeutische Maßnahmen eingesetzt. Für Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom im fortgeschrittenen Stadium gibt es mit den bislang verfügbaren Behandlungsmethoden meist keine Aussicht auf Heilung. Die chemotherapeutische Behandlung hat in diesem Fall das Ziel, die Dauer der verbleibenden Lebenszeit bei größtmöglicher Lebensqualität zu verlängern. Daher sollten die hierzu einzusetzenden Therapeutika neben einer hohen Wirksamkeit besonders nebenwirkungsarm sein.

1.2 Zellzyklus und Apoptose und ihre Bedeutung bei der Karzinogenese

1.2.1 Tumorerkrankungen

Krebs ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die durch Deletion, Mutation oder epigenetische Veränderungen verursacht wird und durch eine gestörte Signaltransduktion in der Tumorzelle gekennzeichnet ist (Ponder, 2001; Hahn und Weinberg, 2002; Klausner, 2002). Ein charakteristisches Merkmal von malignen Tumoren im Gegensatz zu benignen Tumorerkrankungen ist, dass maligne Tumoren im mehrstufigen Prozess der Karzinogenese schließlich die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung gewinnen. Trotz der Diversität der verschiedenen Tumorerkrankungen weisen maligne Tumoren charakteristische Veränderungen in fundamentalen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Zellzyklusregulation, Apoptose, Angiogenese und Invasion auf, die autonomes Wachstum über die Grenzen der normalen Gewebemöostase hinaus ermöglichen. So besitzen Tumorzellen die Fähigkeit, sich unabhängig von exogenen Wachstumsfaktoren autonom zu vermehren. Weiterhin ist das Replikationspotenzial von Tumorzellen unbegrenzt, während normale Zellen ein begrenztes Teilungspotenzial besitzen und nach einer definierten Anzahl von Zellteilungen in einen Ruhezustand übergehen. Die Tumorentstehung und Progression wird nicht nur durch unkontrollierte und unbegrenzte Proliferation begünstigt, sondern auch dadurch, dass sich die Tumorzellen dem intrinsischen Zelltodprogramm, das als Apoptose bezeichnet wird, entziehen.

1.2.2 Der Zellzyklus

Unter Zellzyklus werden die Vorgänge zwischen zwei Zellteilungen (Mitosen) verstanden. Der Ablauf des Zellzyklus ist durch verschiedene Phasen charakterisiert (G1-, S-, G2- und M-Phase). Unter dem Einfluss exogener Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, treten ruhende Zellen aus der G₀-Phase in die G₁-Phase, einer Vorbereitungsphase für die anschließende Synthesephase (S-Phase), in der die Zelle anfängt zu wachsen und die für die DNA-Synthese notwendigen Enzyme zu synthetisieren. In der Synthesephase (S-Phase) erfolgt die Replikation der DNA. Ist die S-Phase abgeschlossen, dann gelangt die Zelle nach Durchlaufen der G₂-Phase, in der die DNA-Replikation kontrolliert wird und DNA-Schäden repariert werden, in die Mitose (M-Phase). In der M-Phase teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen, die dann entweder erneut den Zellzyklus durchlaufen oder aber zur Ausdifferenzierung in die G₀-Phase eintreten.

An den Übergängen von einer Phase zur nächsten befinden sich Kontrollpunkte, an denen eine „Qualitätskontrolle“ der Zelle stattfindet, bevor der Zyklus weiterläuft. Ein wichtiger Kontrollpunkt des Zellzyklus befindet sich am Ende der G₁-Phase (G₁-Restriktionspunkt), an dem entschieden wird, ob der Replikationsprozess weiter läuft oder der Zellzyklus angehalten wird und/oder Mechanismen zur Auslösung von Apoptose aktiviert werden.

Die Zellzyklusprogression wird durch cyclinregulierte Proteinkinasen kontrolliert (Morgan 1995; Sherr und Roberts 1999). Diese Proteinkinasen setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen, den kurzlebigen Cyclinen und den cyclinabhängigen Kinasen (*cyclin-dependent-kinases* CDKs). Die Konzentration der Cycline steuert die Aktivität der CDKs. Die aktiven Cyclin/CDK Komplexe regulieren die entscheidenden Kontrollpunkte des Zellzyklus, indem sie Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktivieren und somit die Expression verschiedener zellzyklusrelevanter Proteine bewirken. Die Aktivität der CDKs wird durch spezifische Inhibitoren negativ reguliert. Diese Inhibitoren werden als CDKI (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) bezeichnet.

Der Ausfall von negativen Regulatoren des Zellzyklus durch Mutation oder Deletion der Gene oder gestörter Genexpression ist ein entscheidender Schritt bei der malignen Transformation von Zellen (Sherr, 2000). So ist z.B. das Tumorsuppressorgen p53, das eine Schlüsselfunktion für den Zellzyklusarrest am G₁/S-Kontrollpunkt hat, das am häufigsten mutierte Gen bei Tumoren (Vogelstein und Kinzler, 2001, Vousden und Lu, 2002). Um zu verhindern, dass geschädigte DNA repliziert wird, führt DNA-Schädigung

zum raschen Anstieg der Konzentration von p53, welches die Transkription des CDK-Inhibitors p21^{Waf1/Cip1} aktiviert und mit verschiedenen Cyclin/CDK-Komplexen interferiert. Diese Vorgänge bewirken einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase und DNA-Schäden können repariert werden. Ein Verlust der Funktion des p53 führt somit zu unkontrollierter Zellproliferation.

1.2.3 Apoptose

Die Form des genetisch festgelegten Programms zur entzündungsfreien Eliminierung von Zellen wird als Apoptose bezeichnet. Die Apoptose stellt für den Organismus einen lebenswichtigen Regulator hinsichtlich der Entwicklung und Funktionsfähigkeit von Organen und Geweben dar. Bei der malignen Transformation von Zellen kommt es häufig zum Verlust regulativer, apoptoseauslösender Mechanismen, und damit zur ungehemmten Proliferation der Zellen (Thompson, 1995; Lowe und Lin, 2000).

Bereits 1972 beschrieben Kerr und Mitarbeiter elektronenmikroskopische Beobachtungen einer morphologisch definierten Form des Zelltods (Kerr et al., 1972). Die Apoptose ist durch die Abrundung der Zellen und Chromatinkondensation entlang der nukleären Membran, begleitet von einer Schrumpfung der Zelle, charakterisiert. Eine spezifische, internukleosomale DNA-Fragmentierung, die Auflösung der Zelle in einzelne membranumhüllte Vesikel („*apoptotic bodies*“), sowie Phagozytose durch Makrophagen und andere umliegende Zellen kennzeichnen den weiteren Verlauf der Apoptose.

Seit einigen Jahren wird zunehmend deutlicher, dass die Mitochondrien eine zentrale Position in der Apoptose-Signalkaskade einnehmen (Zamzami et al., 1996). Infolge eines Zusammenbruchs des inneren Mitochondrienmembranpotenzials kann es zu einer transienten Schwellung der mitochondrialen Matrix kommen, die zum mechanischen Reißen der äußeren Mitochondrienmembran und/oder zur Permeabilisierung der Membran durch die Öffnung großer proteindurchlässiger Poren („*permeability transition pore*“, PTP) führt. Pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Proteinfamilie regulieren die Öffnung der mitochondrialen „*permeability transition pore*“ (Kroemer, 1997; Porter 1999). Durch die Öffnung der PTP gelangen lösliche Proteine des intramembranären Spalts wie z.B. Cytochrom C oder der „*apoptosis-inducing factor*“ AIF in das Zytoplasma. Das in das Zytoplasma freigesetzte Cytochrom C bildet zusammen mit ATP, Procaspase-9 und dem Adapterprotein APAF-1 („*apoptotic protease activating factor*“) das so genannte Apoptosom, welches für die Aktivierung der Caspase-9, einer

Initiatorcaspase, notwendig ist. Caspase-9 aktiviert proteolytisch so genannte Effektorcaspasen, wie z.B. Caspase-3. Caspasen sind Cysteinproteasen, die für die Apoptoseinduktion und -exekution von großer Bedeutung sind. Zielproteine der Effektorcaspasen sind beispielsweise DNA-Reparaturenzyme, DNase-Inhibitoren und Zytoskelettfilamente. Als Folge der Proteolyse von DNase-Inhibitoren kommt es zur Aktivierung von Endonukleasen, die eine Fragmentierung der DNA in Nukleosomen bewirken (Schutte und Ramaekers, 2000). Im Gegensatz zum Cytochrom C induziert AIF direkt und caspasenunabhängig die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung.

Neben der mitochondrienvermittelten Apoptose („*intrinsic death pathway*“), gibt es auch die extrinsische, rezeptorvermittelte Apoptose („*extrinsic death pathway*“), die durch die Bindung von extrazellulären Liganden der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie an ihre membranständigen Rezeptoren vermittelt wird (Ashkenazi 2002; Walczak und Kramer 2000).

Die Signaltransduktion von Apoptose kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden (Igney und Kramer, 2002). Bei der mitochondrienvermittelten Apoptose spielen vor allem die Bcl-2-Proteine eine wichtige Rolle. Zur Bcl-2-Familie gehören Moleküle mit antiapoptotischer (z.B. Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) oder mit proapoptotischer Funktion (Bad, Bak, Bax etc.) (Cory und Adams, 2002). Bcl-2-Proteine modifizieren Apoptosesignale, indem sie die Aktivierung von Caspasen regulieren. Die Balance zwischen Apoptose und Überleben scheint dabei vom Zellgehalt an proapoptotischen und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinkomplexen bestimmt zu sein.

Tumorzellen weisen häufig eine Störung dieses Gleichgewichts auf, die entweder auf der Überexpression von antiapoptotischen Molekülen oder auf der verminderten Expression von proapoptotischen Molekülen beruht (Igney und Kramer, 2002). So zeigen diverse humane Tumorzellen eine Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2 Protein (Campos et al., 1993; Coustan-Smith et al., 1996), wogegen bei einer Vielzahl von Tumoren der Verlust des proapoptotischen Bax-Proteins nachgewiesen werden kann (Rampino et al., 1997; Prokop et al., 2000).

1.3 Der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGF-1-Rezeptor) als Zielprotein der innovativen antineoplastischen Therapie

1.3.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die durch die Bindung an spezifische Membranrezeptoren die Zellproliferation und Zelldifferenzierung fördern. Infolge Ligand-Rezeptor-Interaktionen kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die intrazellulär nachgeschaltete Signaltransduktionen auslöst, über die es zur Aktivierung oder Abschaltung von Genen kommt. Wichtige humane Wachstumsfaktoren, die auch in der Tumorbilogie eine Rolle spielen, sind:

- die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-1 und IGF-2 (*insulin-like growth factor*), die Vermittler der Somatotropin-Wirkung und damit für das normale Längenwachstum des Menschen verantwortlich sind,
- der epidermale Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*), der das Wachstum epidermaler Gewebe fördert,

1.3.2 Das IGF-System

Das System des insulinähnlichen Wachstumsfaktors IGF (*insulin-like growth factor*) umfasst drei Rezeptoren, drei Liganden und sechs so genannte IGF-Bindungsproteine (IGFBPs). Die drei Rezeptoren setzen sich aus dem IGF-1-Rezeptor, dem IGF-2-Rezeptor und dem Insulinrezeptor zusammen und IGF-1, IGF-2 und Insulin repräsentieren die Liganden (Baserga et al., 1997).

Der IGF-1-Rezeptor ist in diesem System für das proliferative Wachstum am bedeutsamsten und kann durch alle drei Liganden aktiviert werden. Er bindet mit größter Affinität IGF-1, aber auch IGF-2 (ca. 10-fach geringere Aktivität) und Insulin (100- bis 1000-fach geringere Affinität). Die Wirkung der IGFs wird durch die IGF-Bindeproteine moduliert (Baxter, 2000; Mohan und Baylink, 2002).

Neben dem IGF-System spielt der IGF-1-Rezeptor auch eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion weiterer Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF (Baserga et al., 1997).

1.3.3 Der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGF-1R)

Der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGF-1R) gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und ist ein heterotetrameres Glykoprotein, bestehend aus zwei

extrazellulären α -Untereinheiten sowie zwei transmembranären β -Untereinheiten (Abb. 1-1).

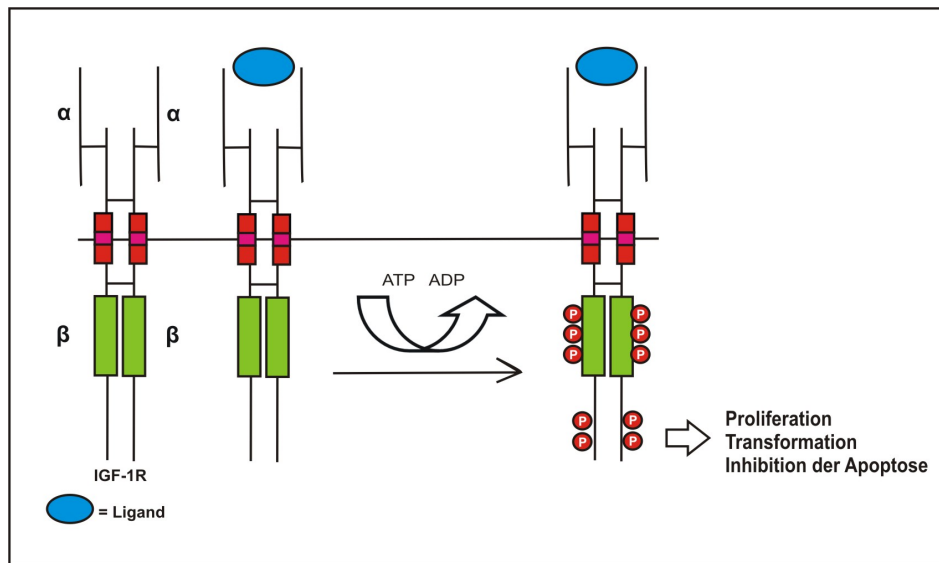


Abbildung 1-1: Aktivierung des IGF-1-Rezeptors (modifiziert nach Hofmann und Garcia-Echeverria, 2005). Der IGF-1-Rezeptor ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, bestehend aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Die extrazellulären α -Untereinheiten sind zuständig für die Ligandenbindung (IGF-1 oder IGF-2), welche die Aktivierung der intrazellulären Kinase-Domäne der β -Untereinheiten triggert. Die Kreuzphosphorylierung der β -Untereinheiten triggert wiederum die nachgeschalteten Signalkaskaden, die zu vermehrter Proliferation und der Verhinderung von Apoptose führen und die Transformation der Zelle auslösen.

Durch Ligandenbindung an die α -Untereinheiten des IGF-1-Rezeptors kommt es zur Konformationsänderung und Kreuzphosphorylierung der β -Untereinheiten, die eine Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase des IGF-1R bewirken und zur Autophosphorylierung weiterer Tyrosinreste innerhalb der katalytischen Domäne der β -Untereinheiten führen. Über die aktivierte katalytische Domäne der β -Untereinheiten erfolgt die Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats IRS (Kellerer et al., 1999), das als Bindungsstelle zum Andocken zyttoplasmatischer Botenstoffe fungiert und für die Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden notwendig ist. Zu den induzierten Signalwegen gehören der Ras-Raf-mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Weg (Ras-Raf-MAPK-Weg), der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K)-Signalweg, sowie der STAT-Signalwege (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Endpunkte dieser Kaskaden sind Änderungen im Expressionsmuster von Genen, die z.B. die Regulierung des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, aber auch der Metastasierung und Angiogenese steuern.

Signaltransduktion des IGF-1-Rezeptors

Der Ras-Raf-mitogen-aktivierte Proteinkinase (Ras-Raf-MAPK)-Signalweg

Für mitogene Wachstumsfaktoren wird der Ras-Raf-MAPK-Signaltransduktionsweg als einer der wichtigsten beschrieben (Rubin und Baserga, 1995). Durch ihn kommt es über die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) zu verschiedenen biologischen Aktivitäten, unter anderem zur Regulierung der Genexpression (Stewart und Rotwein, 1996). Eine Subgruppe der MAPK bilden die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK). Es handelt sich hierbei um zytoplasmatische Proteinkinasen, die ihren Namen aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen wirkende Liganden tragen. Neben Wachstumsfaktoren (Grimberg 2003; Yarden und Sliwkowski 2001) kann die extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2) aber auch durch Zytokine oder Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert werden (Johnson und Lapadat, 2002). Die Aktivierung von ERK1/2 führt zur Zellzyklusprogression und Hemmung der Apoptose (Cross et al., 2000; Wilkinson und Millar, 2000; Rubinfeld und Seger, 2005).

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)-Weg

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung mitogener und antiapoptotischer Signale der Zelle. Die Bindung von Liganden (z.B. Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen) an ihren Rezeptor führt zu einer intrazellulären Anlagerung und Aktivierung der PI3-K (Skolnik et al., 1991). Als Lipidkinase katalysiert die PI3-K die Phosphorylierung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Dabei entsteht Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), welches u.a. von der Proteinkinase B (PKB bzw. Akt) als Anker genutzt wird. Das Andocken der PKB/Akt an die Membran setzt eine Signaltransduktionskaskade in Gang, die letztendlich die Hemmung verschiedener apoptoseauslösender Effektorproteine bewirkt (Mitsui et al., 2001).

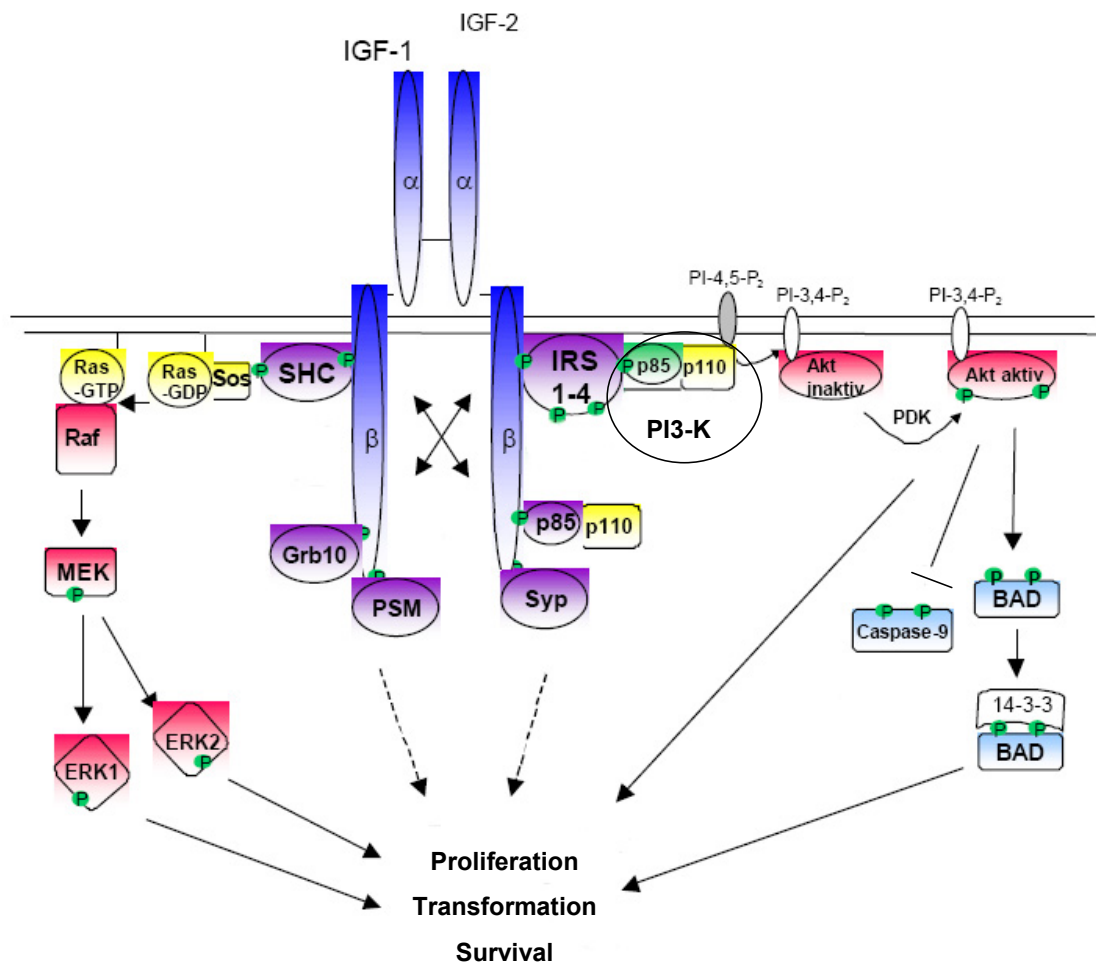


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege des IGF-1-Rezeptor-Systems (modifiziert nach Ligensa, 2002). Durch die Bindung der Liganden an den IGF-1-Rezeptor kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, wie z.B. des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs und des PI3-K-Signalwegs. Durch die Aktivierung der Signalkaskaden kommt es zu einer gesteigerten Zellproliferation und Transformation und die Auslösung von Apoptose wird verhindert („Survival“).

1.3.4 Die Bedeutung des IGF-1-Rezeptors in der Onkologie

Erhöhte IGF-Spiegel sind bei einer Vielzahl von Tumoren mit einer aggressiven Tumorbilologie assoziiert, u.a. in Prostata-, Brust-, Kolon- und Lungenkarzinomen (Pollak et al., 2004). Die IGF-1-induzierten, stark mitogenen und antiapoptotischen Effekte werden über den IGF-1-Rezeptor vermittelt. Eine Überexpression des Rezeptors erhöht daher signifikant die Wahrscheinlichkeit für die Tumorentstehung und verstärkt die Metastasierung bereits bestehender Tumore (Yu und Rohan, 2000). Änderungen, welche das Gleichgewicht zwischen der IGF/IGF-1-Rezeptor-Aktivität gegen die Funktion der IGF-Bindeproteine (IGFBPs) verschieben, sind ebenfalls an der Entstehung und dem Fortschreiten von Neoplasien in verschiedenen Zelltypen beteiligt (Grimberg und Cohen, 2000).

Der IGF-1-Rezeptor spielt aber nicht nur bei der Tumorentstehung und Metastasierung eine kritische Rolle, sondern ist auch hinsichtlich der Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps von herausragender Bedeutung (LeRoith et al., 1999). So konnte durch die Behandlung mit antisense-Oligonukleotiden, antisense-mRNA exprimierenden Plasmiden oder auch dominant-negativen IGF-1-Rezeptor-Varianten eine Revision des transformierten Phänotyps bei verschiedenen Tumorzellen erreicht werden (Trojan et al., 1992; Trojan et al., 1993; Prager et al., 1994). Darüber hinaus ist auch die eindeutige Korrelation zwischen Expressionsstärke des IGF-1-Rezeptors und der Apoptosefähigkeit von Tumorzellen belegt, wobei die Apoptoserate in dem Maße zunimmt, in dem die IGF-1-Rezeptor-Expression supprimiert wird (Resnicoff et al., 1995).

Aus der aufgezeigten Bedeutung des IGF-1-Rezeptors und seiner Liganden für die Tumorentstehung und -wachstum könnten daher künftige krebstherapeutische Ansätze viel versprechend sein, bei denen die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche verhindert wird, die Interaktion des Rezeptors mit seinen Liganden blockiert wird oder die IGF-1-Rezeptor-Signalkaskaden spezifisch inhibiert werden (Pietrzkowski et al., 1993; Neuenschwander et al., 1995; LeRoith et al., 1999; Jiang et al., 1999).

Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass der IGF-1-Rezeptor in der Lage ist, die Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors zu transaktivieren (Gilmore et al., 2002). Somit entfalten sich mitogene IGF-Effekte zumindest teilweise unter Zuhilfenahme des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)-Signalwegs, der offenbar einen entscheidenden Mechanismus für IGF-vermitteltes Wachstum von Tumorzellen darstellt (Ahmad et al., 2004).

Durch die beschriebene Konvergenz der IGF-1-R- und EGFR-Signalwege könnte daher auch die Hemmung der EGF-Rezeptors zur Inhibition von IGF-stimulierten Tumorstadium beitragen.

1.3.5 Therapeutische Beeinflussung des IGF-1 Rezeptors

Das Konzept einer Wachstumsfaktorrezeptor-basierten Inhibierung zur Antitumorthherapie ist in den vergangenen Jahren besonders anhand des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) entwickelt und untersucht worden, und es haben bereits zwei Klassen von Arzneistoffen Eingang in die Therapie gefunden:

- Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), welche die intrazellulären Tyrosinkinase von Wachstumsfaktorrezeptoren hemmen
- monoklonale Antikörper, die gegen die extrazelluläre Liganden-bindende Domäne des Rezeptors gerichtet sind

Zunehmend wird auch die besondere Bedeutung des IGF-1-Rezeptors für innovative und zielgerichtete Therapieansätze in der Onkologie bekannt. Die Entwicklung spezifischer Anti-IGF-1-Rezeptor-Wirkstoffe ist allerdings noch nicht so weit fortgeschritten wie beim EGFR. Daher gibt es bislang keine zugelassenen Arzneistoffe zur IGF-1R-basierten Tumorthherapie.

Dies hängt unter anderem mit der Befürchtung zusammen, dass Inhibitoren gegen den IGF-1 Rezeptor aufgrund einer starken Homologie des IGF-1-Rezeptors mit dem Insulinrezeptor zumindest teilweise auch eine Wirkung auf das Insulin-System ausüben könnten und damit zu unerwünschten Nebenwirkungen wie z.B. Insulinresistenzen führen (Garber, 2005).

Mittlerweile sind jedoch insbesondere im Bereich der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und der monoklonalen Antikörper sehr spezifische Substanzen synthetisiert worden und befinden sich derzeit in der (prä-) klinischen Testung (Hofmann und Garcia-Echeverria, 2005).

Die bisherigen *in vivo* Studien zur IGF-1-R-Inhibition ergaben bei allenfalls geringer Toxizität sowie dem Ausbleiben befürchteter Insulinresistenzen eine sehr gute Verträglichkeit und Wirksamkeit (Hofmann und Garcia-Echeverria, 2005; Scotlandi et al., 2005; Burtrum et al., 2003).

IGF-1-Rezeptor-Inhibitoren

Für die hier vorgestellten Untersuchungen stand neben dem für Laboruntersuchungen seit langem bekannte, selektive IGF-1-Rezeptor-TKI AG1024 (Parizzas et al., 1997), der hochspezifische IGF-1-Rezeptor-TKI NVP-AEW541 zur Verfügung. NVP-AEW541 ist ein Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) mit einem niedrigen Molekulargewicht (MW: 439,57) und gehört zu der Gruppe der so genannten „*small molecule*“-Inhibitoren. Es ist ein oral verfügbarer Arzneistoff aus der Klasse der Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidinderivate (Scotlandi et al., 2005).

Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass NVP-AEW541 spezifisch und hochselektiv die Tyrosinkinase des IGF-1R inhibiert, während es weitgehend unwirksam

gegenüber dem eng verwandten Insulinrezeptor sowie anderen Tyrosin- oder Serin/Threoninkinasen ist (Garcia-Echeverria et al., 2004).

Die ausgeprägte antineoplastische Potenz und Selektivität sowie die gute Verträglichkeit von NVP-AEW541 konnte *in vivo* bereits für einige Tumore wie z.B. Fibrosarkome, Brustkrebs und muskuloskeletale Sarkome gezeigt werden (Garcia-Echeverria et al., 2004). Untersuchungen zur antineoplastischen Potenz von NVP-AEW541 bei gastrointestinalen Tumoren wurden jedoch bislang nicht durchgeführt.

EGF-Rezeptor-Inhibitoren

Für Kombinationsversuche zur simultanen Blockade des IGF-1R und des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR standen die nachfolgend aufgeführten EGFR-Inhibitoren zur Verfügung.

Der EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (TarcevaTM) ist ein oral verfügbares Chinazolinderivat, welches hochspezifisch mit der intrazellulären Tyrosinkinase des EGFR interagiert und dadurch die Signaltransduktion nach Ligandenbindung unterbricht. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien belegen die Wirksamkeit von Erlotinib (Harari, 2004). Erlotinib zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit und gute Bioverfügbarkeit aus und ist seit 2004 zur Zweit- und Drittlinientherapie bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten nichtkleinzelligem Lungenkrebs zugelassen.

Cetuximab (ErbixTM) ist ein chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper gegen den EGFR, der bisher als einziger Vertreter dieser Gruppe, Einzug in die Therapie gehalten hat. Er bindet an den EGFR mit einer 5 bis 10-fach höheren Affinität als die endogenen Liganden. Cetuximab wurde ebenfalls 2004 sowohl in den USA als auch in Europa für die Behandlung von EGFR-positiven kolorektalen Karzinomen in der Zweit- und Drittlinientherapie zugelassen. (Harari et al., 2004)

Neben Cetuximab wurde als ein weiterer monoklonaler EGFR-Antikörper, der Ab-3103 (Vergarajauregui et al., 2006) verwendet.

1.4 Histondeacetylasen (HDAC) als Zielstrukturen für innovative antineoplastische Therapien

1.4.1 Histone und ihre Bedeutung für die Genexpression

Histone sind kleine basische Proteine im Zellkern von Eukaryoten. Sie sind von wesentlicher Bedeutung dafür, wie sich die zelluläre DNA in Form des Chromatins organisiert. Das Chromatin ist ein makromolekularer Komplex bestehend aus DNA, Histonen und Nicht-Histon-Proteinen, dessen Hauptaufgabe es ist, die DNA so zu verpacken, dass sie in den Zellkern passt. Gleichzeitig muss aber gewährleistet sein, dass die DNA-Funktionen wie Transkription und Replikation dennoch ablaufen können.

Das Chromatin liegt im Zellkern in zwei unterschiedlichen Formen vor, dem dicht gepackten, kondensierten Heterochromatin und dem eher lockeren, offenen Euchromatin. Allgemein wird kondensiertes Chromatin mit einer Repression der Transkription in Verbindung gebracht, während transkriptionell aktive Gene mit einer als „offenen“ bezeichneten Chromatinkonformation assoziiert sind (Jenuwein und Allis 2001). Die Ursache liegt in der sterischen Anordnung von kondensiertem Chromatin, welche den Zugang von Transkriptions- und Initiationsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen erschwert und damit einen generell repressiven Effekt auf die Transkription von Genen ausübt.

Kovalente Modifikationen an den „*histone tails*“, die eine Änderung der Chromatinkondensation zur Folge haben, stellen daher einen dynamischen Regulationsmechanismus zur Steuerung der transkriptionellen Aktivität dar. Sie erfolgen posttranslational und umfassen Acetylierungs-, Methylierungs- und Phosphorylierungsprozesse, die als Histon-Code bezeichnet worden sind (Wu und Grunstein 2000, Jenuwein und Allis 2001).

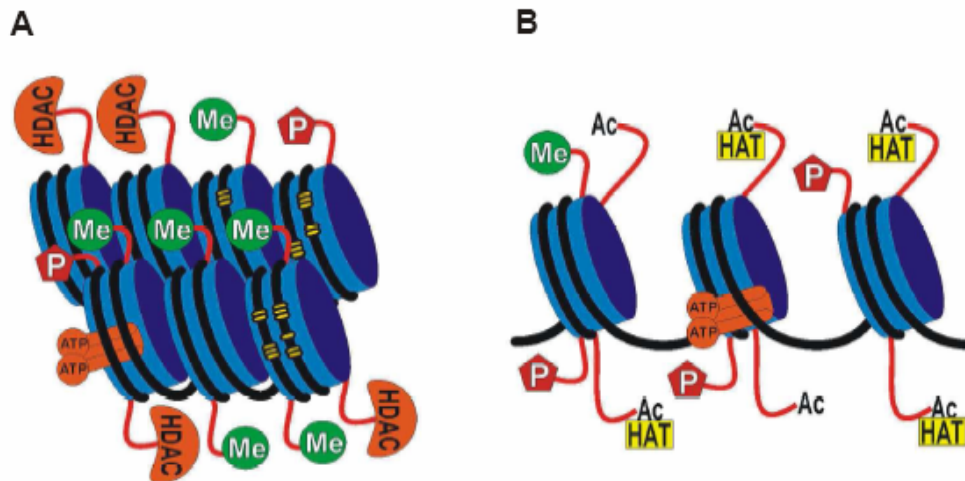


Abbildung 1-3: Posttranslationale Modifikationen an Histonproteinen.

Methylierungs-(Me), Phosphorylierungs-(P) oder Acetylierungsvorgänge (Ac) führen zu einer Veränderung der Nukleosomenstruktur. **A:** DNA-Methylierung und Histondeacetylierung induzieren eine kompakte Chromatinstruktur und transkriptionelle Repression. **B:** Histonacetylierung und DNA-Demethylierung relaxieren das Chromatin und erlauben transkriptionelle Aktivierung. HDAC = Histondeacetylase; HAT = Histonacetyltransferase.

Die Acetylierung ist die am besten untersuchte Modifikation, die die Gentranskription beeinflusst, und spielt eine Rolle in der kurzfristigen Regulation der Expression spezifischer Gene, mit der die Zelle auf Botenstoffe reagiert. Das dynamische Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung von Histonen wird von zwei kompetitiven Enzymfamilien reguliert, den Histonacetyltransferasen (HATs) und den Histondeacetylasen (HDACs) (Acharya et al., 2005). Sie werden von spezifischen Transkriptionsfaktoren an die jeweils zu regulierenden Gene rekrutiert.

1.4.2 Die Rolle einer gestörten HDAC-Aktivität bei der malignen Transformation

Fehler in der Steuerung der Acetylierung und Deacetylierung von Histonen, spielen bei der Entstehung von Krebs eine große Rolle. So können Genmutationen, welche in funktionell inaktiven HATs, überexprimierten HDACs oder einer fehlerhaften Rekrutierung von HAT- und HDAC-Enzymen zu bestimmten Zielstrukturen (Promotoren etc.) resultieren, durch epigenetische Veränderungen, an der Tumorentstehung maßgeblich beteiligt sein (Jacobson und Pillus, 1999; Kouzandes, 1999; Esteller und Herman, 2002).

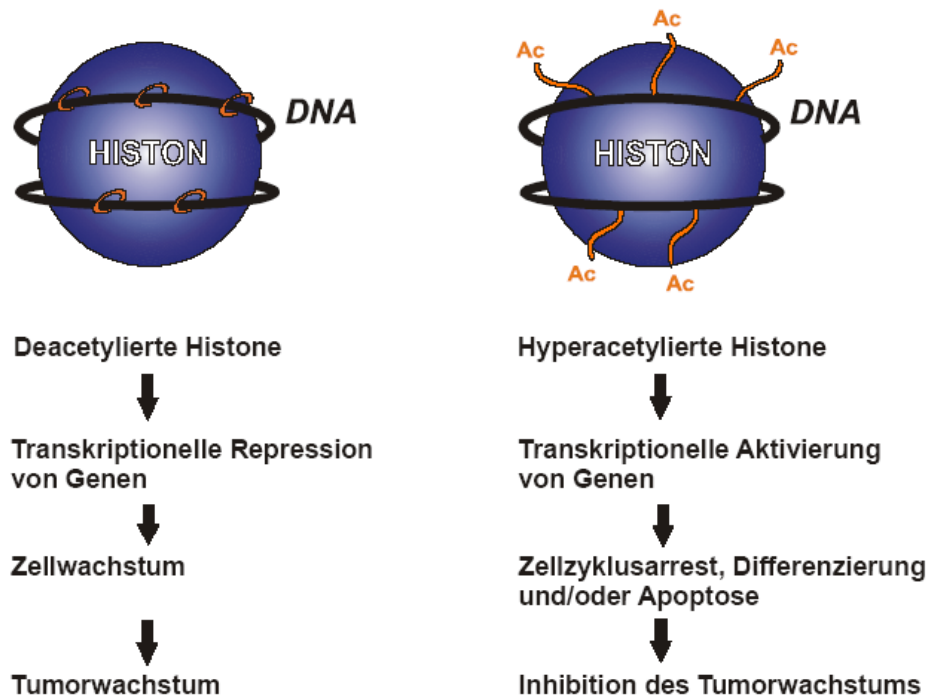


Abbildung 1-4: Die Rolle der Chromatinstruktur bei der malignen Transformation.

Der Acetylierungsstatus von Histonen beeinflusst die transkriptionelle Aktivität von Genen und führt darüber entweder zum Tumorwachstum oder zur Inhibition des Tumorwachstums. Ac= Acetylrest

Die Zusammenhänge zwischen aberranter HDAC-Aktivität und maligner Entartung sind bisher in der Onkogenese der akuten promyeloischen Leukämie (APL) am besten aufgeklärt (He et al., 1998; Lin et al., 1998, Grignani et al., 1998). Aufgrund von chromosomalen Translokationen wird in APL-Patienten die Bildung von onkogenen Retinolsäure-Rezeptor-Fusionproteinen induziert, welche die Differenzierung der myeloischen Zellreihe durch fehlerhafte Aktivierung von HDAC-Komplexen blockieren. Der Zusatz von Histondeacetylase-Inhibitoren ist in der Lage, die Differenzierungsblockade zu überwinden, was die Hypothese bestätigt, dass die HDAC-vermittelte Dysregulation der Genexpression eine zentrale Rolle in der Pathogenese der APL spielt.

Die HDAC-abhängige transkriptionelle Repression in der Entwicklung von APL dient als Modell für ein onkogenes Ereignis, welches nicht nur bei hämatologischen Krebserkrankungen stattfindet, sondern auch für solide Tumoren nachweisbar ist. Für die Entstehung und Progression dieser Malignome scheint insbesondere eine gestörte Balance zwischen HDAC- und HAT-Aktivität von Bedeutung zu sein (Minucci und Pelicci, 2006). So scheint z.B. der Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens APC (Adenomatosis Polyposis Coli), der ein Schlüsselereignis in der Pathogenese von

kolorektalen Tumoren darstellt, offensichtlich auch mit einer übermäßigen HDAC-Aktivität in Verbindung zu stehen (Zhu et al., 2004a).

1.4.3 HDAC-Inhibitoren – Biomodulatoren mit Antitumoraktivität

Das wachsende Verständnis um die molekularen Mechanismen der Onkogenese und die Zusammenhänge zwischen transkriptioneller Dysregulation der Genexpression und maligner Transformation machen HDAC-Enzyme zu potenziellen Angriffspunkten einer zielgerichteten Tumorthherapie und Inhibitoren dieser Enzyme zu hochinteressanten Wirkstoffen mit einer viel versprechenden Antitumorwirkung.

HDAC-Inhibitoren stellen eine strukturell sehr heterogene Gruppe von Molekülen dar, die aufgrund ihrer biochemischen Struktur in folgende Subgruppen klassifiziert werden: Kurzkettige Fettsäuren, Hydroxaminsäuren, synthetische Benzamide, zyklische Tetrapeptide und Ketone. Allen gemeinsam ist die Fähigkeit, an HDACs zu binden und damit die Histondeacetylierung zu hemmen.

Die generelle antineoplastische Aktivität von Histondeacetylase-Inhibitoren wird auf die Aktivierung von Differenzierungsmechanismen, die Inhibition des Zellzyklus und die Induktion von Apoptose in maligne transformierten Zellen zurückgeführt (Marks et al., 2000). Darüber hinaus werden auch die Induktion von Immunantworten (Maeda et al., 2000; Magner et al., 2000; Armeanu et al., 2005) und die Hemmung von Angiogenese (Kim et al., 2001) als weitere Faktoren der Tumorregression durch Histondeacetylase-Inhibitoren *in vivo* diskutiert.

Die Induktion von Differenzierung und Hemmung der Proliferation durch HDAC-Inhibitoren konnte bereits in einer Reihe von Leukämien und soliden Tumoren nachgewiesen werden (Marks et al., 2000; Weidle und Grossmann, 2000; Krämer et al., 2001; Marks et al., 2001). Dabei scheinen transformierte Zellen viel sensitiver auf HDAC-Inhibitoren zu reagieren als normale (Rosato und Grant, 2003; Insinga et al., 2005). Nachdem in präklinischen Studien HDAC-Inhibitoren bereits erfolgreich in der Behandlung von Leukämien und soliden Tumoren getestet worden sind, existieren mittlerweile auch klinische Phase I und II Studien, in denen HDAC-Inhibitoren als Monosubstanz und in Kombination mit anderen Antitumormedikamenten getestet werden (Acharya et al., 2005; Minucci und Pelicci, 2006; Rasheed et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden als HDAC-inhibitorische Wirkstoffe die kurzkettige Fettsäure Natriumbutyrat, die Hydroxaminsäure Trichostatin A und das synthetische Benzamid MS-275 verwendet, mit denen dieser neue therapeutische Ansatz zur Behandlung von gastrointestinalen Tumoren ausgearbeitet werden sollte.

Kurzkettige Fettsäuren, wie z.B. Butyrate, zählen zu den ersten identifizierten HDAC-Inhibitoren (Boffa et al., 1978). Im Gegensatz zu anderen HDAC-Inhibitoren sind Butyrate weniger wirksam und erst bei millimolaren Konzentrationen inhibieren sie die Aktivität von HDACs über einen nicht-kompetitiven Mechanismus (Archer und Hodin, 1999). Trotz der vergleichsweise schwächeren, inhibitorischen Aktivität waren Butyrate und ihre Derivate, die ersten Substanzen, von denen man vielversprechende Daten aus klinischen Daten gesammelt hat (Newmark et al., 1994). Die Fähigkeit von Butyrat z.B. das Wachstum von Darmkrebszellen zu hemmen (Velazquez und Rombeau, 1997), ist heute noch Gegenstand vieler Untersuchungen. Obwohl sie ein sehr günstiges *in vivo*-Toxizitätsprofil aufweisen, sind die bisher bekannten Vertreter dieser Gruppe, zu denen Butyrate, Phenylbutyrate, Phenylacetate und Valproat gehören, durch ihre kurze Serumhalbwertszeit und ihre vielfältigen Effekte auf andere Enzymsysteme, wie z.B. Phosphorylierung und Methylierung in ihrer klinischen Anwendbarkeit nicht so weit fortgeschritten (Kortenhorst et al., 2006).

Hydroxaminsäuren bilden eine Gruppe von sehr potenten Inhibitoren, die bereits bei nanomolaren Konzentrationen eine ausreichende Aktivität besitzen, um HDAC Enzyme reversibel zu inhibieren (Finnin et al., 1999). Zu dieser Substanzfamilie gehört z.B. das Trichostatin A (TSA), ein ursprünglich als Antimykotikum entwickelter Wirkstoff, der *in vitro* und *in vivo* bei vielen Tumoren, wie z.B. Lungenkrebs, Brustkrebs, Magen- und Leberkarzinomen ausgeprägte antineoplastische Effekte gezeigt hat (Eickhoff et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Vigushin et al., 2001; Herold et al., 2002). Aufgrund seines ungünstigen Toxizitätsprofils und der geringen Bioverfügbarkeit ist TSA für klinische Studien nicht geeignet. Es wird mittlerweile vor allem als gut charakterisierte Referenzsubstanz verwendet und dient außerdem als Vorlage für die Entwicklung neuer synthetischer HDAC-Inhibitoren wie z.B. SAHA (Suberoylanilid-Hydroxaminsäure) (Richon et al., 1998), welches bereits in klinischen Studien (Phase I/II) zur Behandlung von hämatoonkologischen Erkrankungen und soliden Tumoren getestet wird (Kelly et al., 2003; Kelly et al., 2005; Duvic et al., 2007).

Synthetische Benzamide bilden eine neue, strukturell heterogene Substanzklasse, die alle als gemeinsame Komponente einen Benzamid-Rest enthalten. Synthetische Benzamide blockieren HDACs im mikromolaren Konzentrationsbereich. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe zählen MS-275 (Saito et al., 1999) und CI-994 (El-Beltagi et al., 1993). Aufgrund der neuartigen Struktur dieser HDAC-Inhibitoren ist die HDAC-inhibitorische Aktivität deutlich höher als bei anderen natürlichen HDAC-Inhibitoren. Für MS-275 wurde z.B. im Vergleich zu Natriumbutyrat eine 30-fach erhöhte HDAC-inhibitorische Aktivität festgestellt (Suzuki et al., 1999). So konnte bereits *in vitro* und *in vivo* eine starke antiproliferative Wirkung des MS-275 bei einer Reihe von humanen Tumoren, wie z.B. Lungenkrebs, Dickdarm- und Magenkarzinomen festgestellt werden (Saito et al., 1999; Rosato et al., 2003; Hess-Stumpp et al., 2007). MS-275 befindet sich derzeit bereits in klinischen Testungen der Phase I-II. Die bisher erhaltenen Daten bei Patienten mit soliden Tumoren, Lymphomen und hämatoonkologischen Erkrankungen sind sehr viel versprechend und haben eine ausgeprägte Antitumorwirkung und eine gute Verträglichkeit des MS-275 gezeigt (Ryan et al., 2005; Gojo et al., 2007).

1.5 Ziel der Arbeit

Die therapeutischen Möglichkeiten zur medikamentösen Behandlung fortgeschrittener gastrointestinaler Tumore sind nach wie vor unbefriedigend. Daher sind neue, zielgerichtete Antitumortherapien dringend erforderlich.

Im Zusammenhang mit innovativen Krebstherapien werden neuerdings Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren als viel versprechende Zielproteine diskutiert, da sie das Wachstum einer Vielzahl von Tumoren maßgeblich stimulieren. Insbesondere der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGF-1R) und seine Liganden haben sich hierbei als interessante Zielstrukturen herauskristallisiert. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die Unterbrechung der IGF-1R-Signaltransduktion durch niedermolekulare IGF-1R-Tyrosinkinaseinhibitoren und monoklonale Antikörper bei verschiedenen, nicht-gastrointestinalen Tumoren zu antiproliferativen Effekten führt. Zudem scheint der Acetylierungsstatus von Histonen bei der transkriptionellen Regulation von Genen, die im Zusammenhang mit der molekularen Onkogenese stehen, eine große Rolle zu spielen. Das Gleichgewicht reversibler Histonacetylierung wird durch die enzymatische Aktivität von Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen aufrechterhalten. Eine Dysregulation dieses Gleichgewichts ist somit sowohl für die

Entstehung als auch für die Suppression maligner Neoplasien von großer Bedeutung. Der Einsatz HDAC-inhibitorischer Substanzen könnte daher durch die Wiederherstellung des intrazellulären Acetylierungsgleichgewichts ein viel versprechender Ansatz zur medikamentösen Tumorthherapie sein.

In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der Wirksamkeit von zwei neuartigen Ansätzen zur Tumorthherapie verschiedener gastrointestinaler Tumore überprüft werden. Dabei handelt es sich um folgende Strategien:

1. Die zielgerichtete Blockierung des insulinähnlichen Wachstumsfaktorrezeptors 1
2. Die zielgerichtete Inhibition der Enzymaktivität von Histondeacetylasen .

Dazu wurde *in vitro* an verschiedenen gastrointestinalen Zelllinien zum einen der IGF-1R-Tyrosinkinaseinhibitor NVP-AEW541 und zum anderen drei Substanzen mit HDAC-inhibitorischer Wirkung, MS-275, Trichostatin A und Natriumbutyrat auf ihre Fähigkeit, das Wachstum der Tumorzellen zu hemmen, untersucht.

Die Mechanismen, die der antiproliferativen Wirkung der untersuchten Arzneistoffe zugrunde liegen, wurden mit Hilfe zellbiologischer, molekularbiologischer und biochemischer Methoden charakterisiert.

Dabei sollte jede Einzelsubstanz unter folgenden Aspekten charakterisiert werden:

1. In welcher Form verändert sich das Proliferationsverhalten der jeweiligen Tumorzelllinie durch die Zugabe der zu testenden Substanzen?
2. Können diese Substanzen in den zu untersuchenden gastrointestinalen Tumorzellen Apoptose und Zellzyklusarrest auslösen?
3. Wenn ja, welche sind die zugrunde liegenden Mechanismen, Signalwege und Zielproteine?
4. Inwieweit unterscheidet sich der Wirkmechanismus der untersuchten Substanz bei den verschiedenen gastrointestinalen Tumorzelllinien?

Um die an Zelllinienmodellen erzielten Ergebnisse direkt an individuellen humanen Tumoren zu evaluieren, wurden zudem teilweise auch Studien an Primärzellkulturen aus Operationsresektaten oder Biopsaten verschiedener humaner gastrointestinaler Tumoren durchgeführt, die im Vergleich zu Zelllinien ein patientennäheres Untersuchungsmodell darstellen.

Ein weiteres Ziel war es, basierend auf der Anti-IGF-1R- bzw. der Anti-HDAC-Therapie neue Kombinationsansätze mit konventionellen Chemotherapeutika oder neuartigen, zielgerichteten Antitumormedikamenten an den verschiedenen gastrointestinalen Tumormodellen zu untersuchen. Durch die kombinierte Behandlung sollte neben der Vermeidung von Resistenzen auch eine Steigerung der Effektivität von Monosubstanzen und/ oder eine Senkung der Einzeldosierung der kombinierten Substanzen erzielt werden.