

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Inhibition des insulinähnlichen Wachstumsfaktorrezeptors 1 (IGF-1R)

Die Untersuchungen zur antiproliferativen Wirksamkeit der IGF-1R-Inhibition wurden an je 2 Zelllinien der drei gastrointestinalen Tumorentitäten durchgeführt: an gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren (NET), an hepatozellulären Karzinomen (HCC) und an kolorektalen Karzinomen (CRC). Zusätzlich wurden Untersuchungen an Primärzellkulturen durchgeführt, die aus Biopsaten von humanen gastrointestinalen Tumoren angelegt wurden (siehe **Kap. 2.2.1.2**).

Tumorentität	Zelllinie (Name / Ursprung)	Primärzellkultur
Gastrointestinale neuroendokrine Tumore (NET)	<ul style="list-style-type: none"> • BON /Pankreaskarzinoid • CM / Insulinom 	n = 4
Hepatozelluläre Karzinome (HCC)	<ul style="list-style-type: none"> • Hep-G2 / hepatozelluläres Karzinom • Huh-7 / Hepatom 	n = 0
Kolorektale Karzinome (CRC)	<ul style="list-style-type: none"> • HCT-116 / kolorektales Adenokarzinom • HT-29 / kolorektales Adenokarzinom 	n = 8

Tabelle 3-1: Übersicht der untersuchten gastrointestinalen Tumorzellmodelle.

3.1.1 Expression des IGF-1R in humanen gastrointestinalen Tumorzellen

Nachweis des IGF-1R bei gastrointestinalen Zelllinienmodellen

Der Nachweis einer funktionellen Expression des IGF-1-Rezeptors bei den verschiedenen Zelllinienmodellen erfolgte mittels Gen- und Proteinexpressionsstudien.

Mittels RT-PCR (siehe **Kap. 2.2.2.1**) wurde der Nachweis der mRNA-Expression des IGF-1-Rezeptors durch gelelektrophoretische Auftrennung der cDNA-Amplifikate erbracht. Dabei wurden Einzelbanden der erwarteten Produktgröße (241 bp) detektiert. Die Proteinexpression des IGF-1R wurde über eine immunzytochemische Färbung nachgewiesen (siehe **Kap. 2.2.2.2**). Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten in allen untersuchten Zelllinien eine ausgeprägte Proteinexpression des IGF-1-Rezeptors. (**Abb. 3-1**).

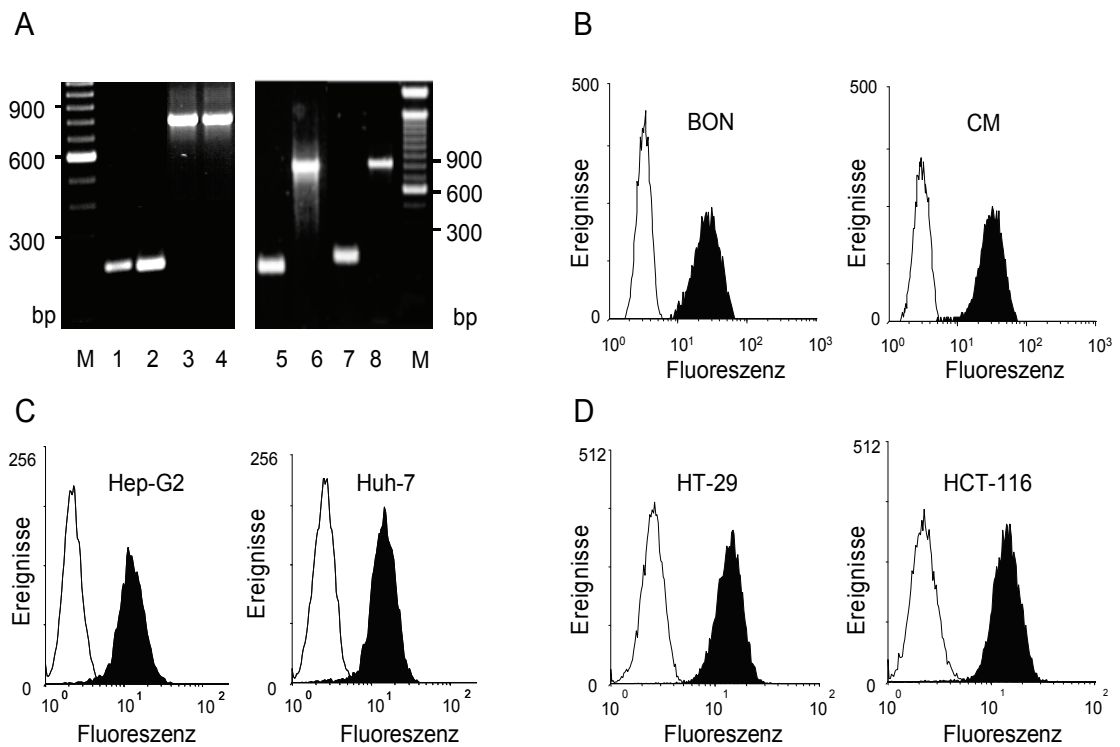


Abbildung 3-1: Nachweis des IGF-1R bei gastrointestinalen Zelllinien.

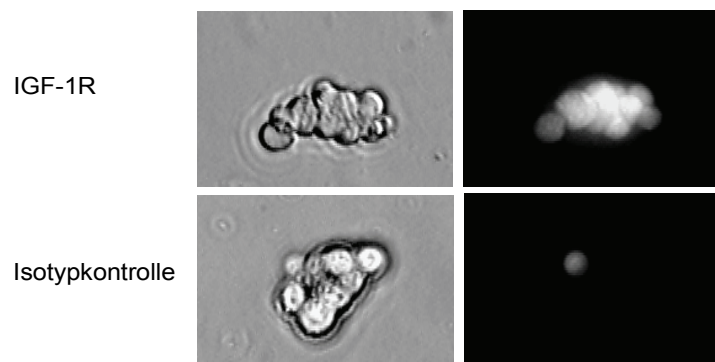
A: Die Expression der IGF-1R-m-RNA (241bp) wurde in HepG2- (Spur 1), Huh-7- (Spur 2), BON- (Spur 5) und CM-Zellen (Spur 7) durch RT-PCR nachgewiesen. Die Expression des *housekeeping*-Gens β -Aktin (822 bp; HepG2: Spur 3, Huh-7: Spur 4, BON: Spur 6, CM: Spur 8) diente der Standardisierung. M = 100 bp Marker. **B,C,D:** Die Proteinexpression des IGF-1R wurde durchflusszytometrisch bei NET-Zellen (**B**), HCC-Zellen (**C**) und CRC-Zellen (**D**) nachgewiesen (rechter „Peak“). Isotypkontrolle (linker „Peak“).

Nachweis des IGF-1R bei Primärzellkulturen

Die Expression des IGF-1R in den Primärzellkulturen wurde über eine immunzytochemische Färbung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (siehe **Kap. 2.2.2.2**). **Abb. 3-2** zeigt repräsentativ die IGF-1R-Expression einer ausgewählten gastrointestinalen neuroendokrinen Primärzellkultur.

Abbildung 3-2: IGF-1R-Expression bei gastrointestinalen Primärzellkulturen.

Primärzellkulturen eines gastrointestinalen neuroendokrinen Tumors wurden mit dem IGF-1R-Antikörper und einem FITC-markierten Sekundärantikörper gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die obere Reihe zeigt die Phasenkontrastaufnahme und die korrespondierende Immunfluoreszenzaufnahme des IGF-1R. Die Färbung der Isotypkontrolle ist in der unteren Reihe abgebildet.



3.1.2 Nachweis der NVP-AEW541-induzierten Dephosphorylierung des IGF-1R

Im Anschluss an den Nachweis der funktionellen Expression des IGF-1-Rezeptors, sollte nun die Spezifität des Tyrosinkinaseinhibitors NVP-AEW541 für den IGF-1-Rezeptor überprüft werden.

Dazu wurden serumfrei kultivierte Zellen für 1 Std. mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 (100 ng/ml) in Ab- oder Anwesenheit von NVP-AEW541 (0-6 μ M) stimuliert. **Abb. 3.3** zeigt exemplarisch die Western Blot Analyse der Expression des IGF-1R und des phosphorylierten IGF-1R bei der gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzelllinie BON.

Die robuste Gesamtexpression des IGF-1-Rezeptors wurde weder durch die IGF-1-Stimulation noch durch die Vorbehandlung der Zellen mit NVP-AEW541 beeinflusst. Dagegen zeigte sich bei der Expression des phosphorylierten Rezeptors eine deutliche Zunahme bei den IGF-1-stimulierten Zellen, die in Anwesenheit des NVP-AEW541 dosisabhängig supprimiert wurde. Damit konnte die spezifische Inhibierung des IGF-1R durch NVP-AEW541 belegt werden.

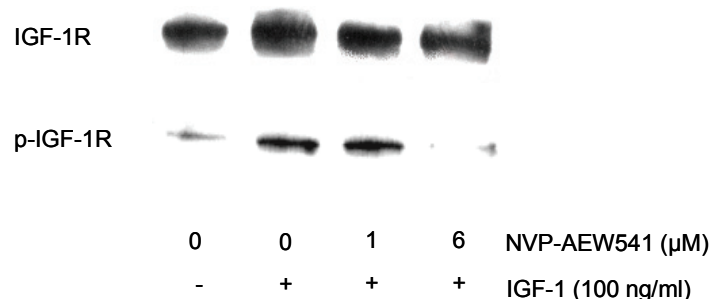


Abbildung 3-3: NVP-AEW541 induziert die Dephosphorylierung des IGF-1-Rezeptors.

Serumfrei-kultivierte BON-Zellen wurden mit 0-6 μ M NVP-AEW541 vorbehandelt und dann für 1 Stunde mit 100 ng/ml IGF-1 stimuliert. Die Western Blot Analysen der IGF-1R-Expression zeigen, dass die IGF-1-Stimulation zu einer deutlichen Zunahme an phosphorylierten IGF-1R führt, die durch die NVP-AEW541-Behandlung in Abhängigkeit von der NVP-AEW541-Konzentration wieder abnimmt. Die Gesamtexpression an IGF-1R bleibt dagegen sowohl durch die IGF-1-Stimulation als auch durch die NVP-AEW541-Behandlung unverändert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n = 3 unabhängigen Versuchen.

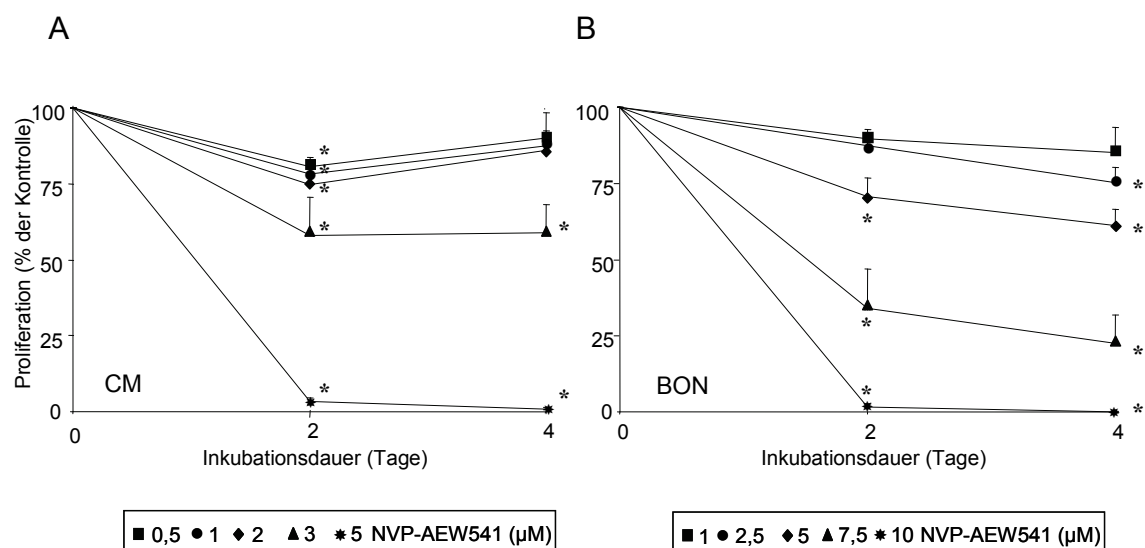
3.1.3 Antiproliferative Wirkung der IGF-1R-Inhibition bei gastrointestinalen Tumoren

Die Inkubation mit dem IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 (0,1-10 μ M) führte zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Abnahme der Zellzahl in allen untersuchten Zelllinienmodellen. Nach 4-tägiger Inkubation mit NVP-AEW541 konnte bei allen Zelllinien eine annähernd 100 %-ige Reduktion der Zellzahl beobachtet werden (**Abb. 3-4**). Auch wenn das Reaktionsmuster der unterschiedlichen gastrointestinalen

Zelllinien ähnlich war, variierte doch die Sensitivität der einzelnen Zelllinien. Die halbmaximale wachstumsinhibitorische Konzentration (IC_{50}) von NVP-AEW541 bewegte sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie zwischen $1,4 \mu\text{M}$ und $6,6 \mu\text{M}$ (siehe **Tab. 3-2**). Es ließen sich dabei tumorentitätsspezifische Unterschiede feststellen. Die größte Sensitivität gegenüber NVP-AEW541 zeigte sich bei den Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms (HCC). Die Sensitivität der kolorektalen Karzinomzelllinien war etwas niedriger als bei den HCC-Zelllinien. Bei den gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzellen war die Sensitivität der beiden Zelllinien unterschiedlich und schien im Zusammenhang mit der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien zu stehen. Die schnell wachsenden CM-Zellen zeigten wie die CRC-Zelllinien eine mittlere Sensitivität, während moderat wachsende BON-Zellen eine vergleichsweise niedrigere Sensitivität als die anderen gastrointestinalen Zelllinien aufwiesen.

Tumormodell	Zelllinie	IC_{50} (nach 48 Std.)
NET	<ul style="list-style-type: none"> BON CM 	<ul style="list-style-type: none"> $6,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$ $3,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$
HCC	<ul style="list-style-type: none"> Hep-G2 Huh-7 	<ul style="list-style-type: none"> $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ $1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$
CRC	<ul style="list-style-type: none"> HCT-116 HT-29 	<ul style="list-style-type: none"> $3,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$ $3,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$

Tabelle 3-2: IC_{50} -Konzentrationen von NVP-AEW541 bei gastrointestinalen Tumoren nach 2-tägiger Inkubation



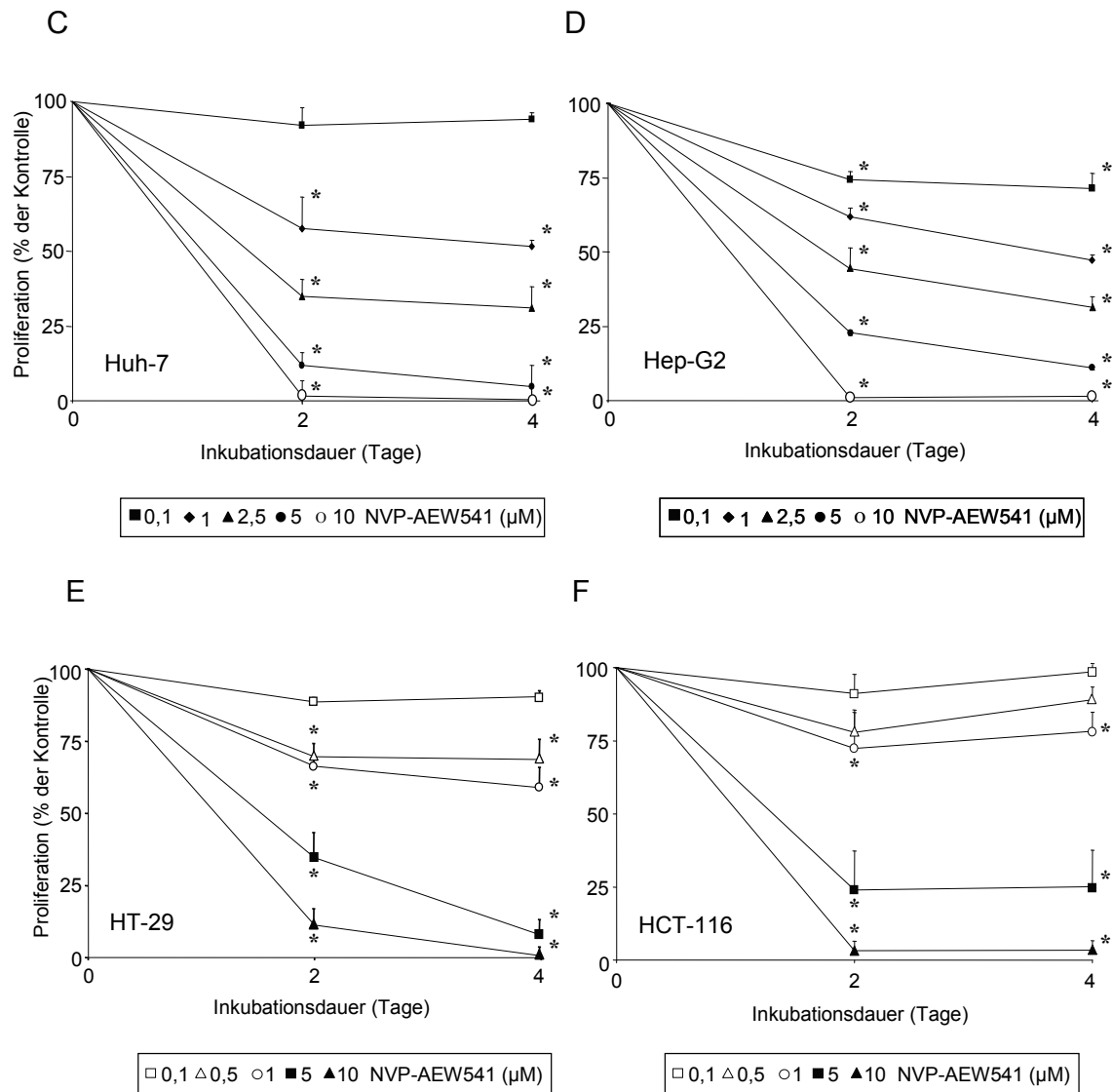


Abbildung 3-4: Antiproliferative Effekte von NVP-AEW541 bei verschiedenen gastrointestinalen Zelllinien. Der IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 hemmt zeit- und dosisabhängig das Wachstum von NET-Zellen (A,B), HCC-Zellen (C,D) und CRC-Zellen (E,F). Dargestellt ist die prozentuale Wachstumsinhibition gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Mittelwert aus mindestens vier unabhängigen Versuchen je Zelllinie \pm Standardfehler (SEM) ist angegeben. * $p < 0,05$

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei permanenten Zelllinien konnte die antineoplastische Potenz von NVP-AEW541 auch bei Primärzellkulturen (PZK) nachgewiesen werden (Abb. 3-5).

So führte eine 3-tägige Inkubation von Primärzellen humaner kolorektaler Karzinome mit NVP-AEW541 (0-5 μ M) zu einer dosisabhängigen Abnahme der Zellzahl von bis zu 50 % in 6 der 8 getesteten PZK. Zwei PZK zeigten hingegen nur eine schwache Wachstumshemmung (ca. 10 %) und können insofern als unsensitiv gegenüber einer NVP-AEW541-Behandlung betrachtet werden. In den NVP-AEW541-sensitiven PZK wurde eine veränderte Morphologie der verbleibenden Zellen beobachtet. Die Zellen

erschieden zusammengeschrumpft und flach und zeigten eine intensive Ethidium-Homodimer-1-(EthD-1)-Färbung (Rotfluoreszenz), die auf einen Verlust der Zellmembranintegrität und somit auf tote oder absterbende Zellen hinweist (**Abb. 3-5, A**).

Ähnliche Beobachtungen wurden bei PZK von humanen gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren gemacht. Nach dreitägiger Inkubation mit NVP-AEW514 wurde eine signifikante Abnahme der Zellzahl sowie morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten bei NVP-AEW514-behandelten Zellen eine Abnahme lebender Zellen (Grünfluoreszenz) bei einer gleichzeitigen Zunahme absterbender bzw. toter Zellen (Rotfluoreszenz) (**Abb. 3-5, B**).

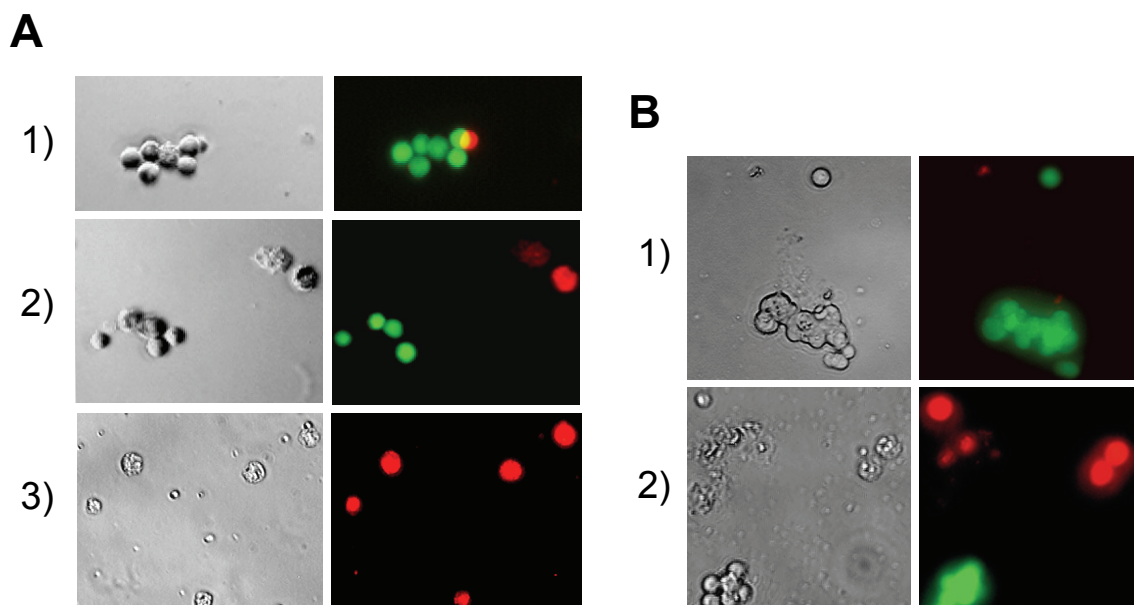


Abbildung 3-5: NVP-AEW514-induzierte Abnahme der Zellzahl bei Primärzellkulturen von kolorektalen Karzinomzellen (CRC) und neuroendokrinen Tumorzellen (NET).

Zellen aus Primärzellkulturen von CRC (**A**) und NET (**B**) wurden 72 Std. lang mit 0-5 μM NVP-AEW514 behandelt und anschließend mittels eines Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays („*Live/Dead-Assay*“) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Lebende Zellen werden hierbei über Grünfluoreszenz, tote Zellen über Rotfluoreszenz detektiert. **A:** 1) CRC unbehandelt, 2) CRC + 1 μM NVP-AEW514, 3) CRC + 5 μM NVP-AEW514. **B:** 1) NET unbehandelt, 2) NET + 5 μM NVP-AEW514. Repräsentative Darstellung der Phasenkontrastaufnahmen (links) und der korrespondierenden Immunfluoreszenzaufnahmen (rechts) eines Präparates aus $n = 4 - 6$ NVP-AEW514-sensitiven Präparaten.

3.1.4 Zytotoxische Effekte von IGF-1R-Inhibitoren

Eine unspezifische Zytotoxizität von Substanzen führt häufig zu Nekrose. Durch Verlust der Plasmamembranintegrität schwellen die Zellen und Organellen osmotisch bedingt an, bis sie platzen und ihren Inhalt in den Interzellularraum entleeren. Dies führt zu unerwünschten immunologischen Reaktionen. Um unspezifische, zytotoxische Effekte

der untersuchten Arzneistoffe abzuschätzen, wurde die Membranintegrität von HCC-, CRC- und gastrointestinalen NET-Zellen nach Inkubation mit NVP-AEW541 anhand der Freisetzung bzw. Aktivität der Laktatdehydrogenase bestimmt (siehe **Kap. 2.2.3.3**). Eine kurzzeitige Behandlung mit NVP-AEW54, je nach Zelllinie 6-8 Stunden, bewirkte im Vergleich zu den Kontrollzellen keinen messbaren Anstieg an Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in den Zellkulturüberständen. Erst nach 24-stündiger Inkubation war bei höheren Wirkstoffkonzentrationen (5-10 μM NVP-AEW541) ein leichter bis mittlerer Anstieg an LDH-Freisetzung zu beobachten (**Abb. 3-6**).

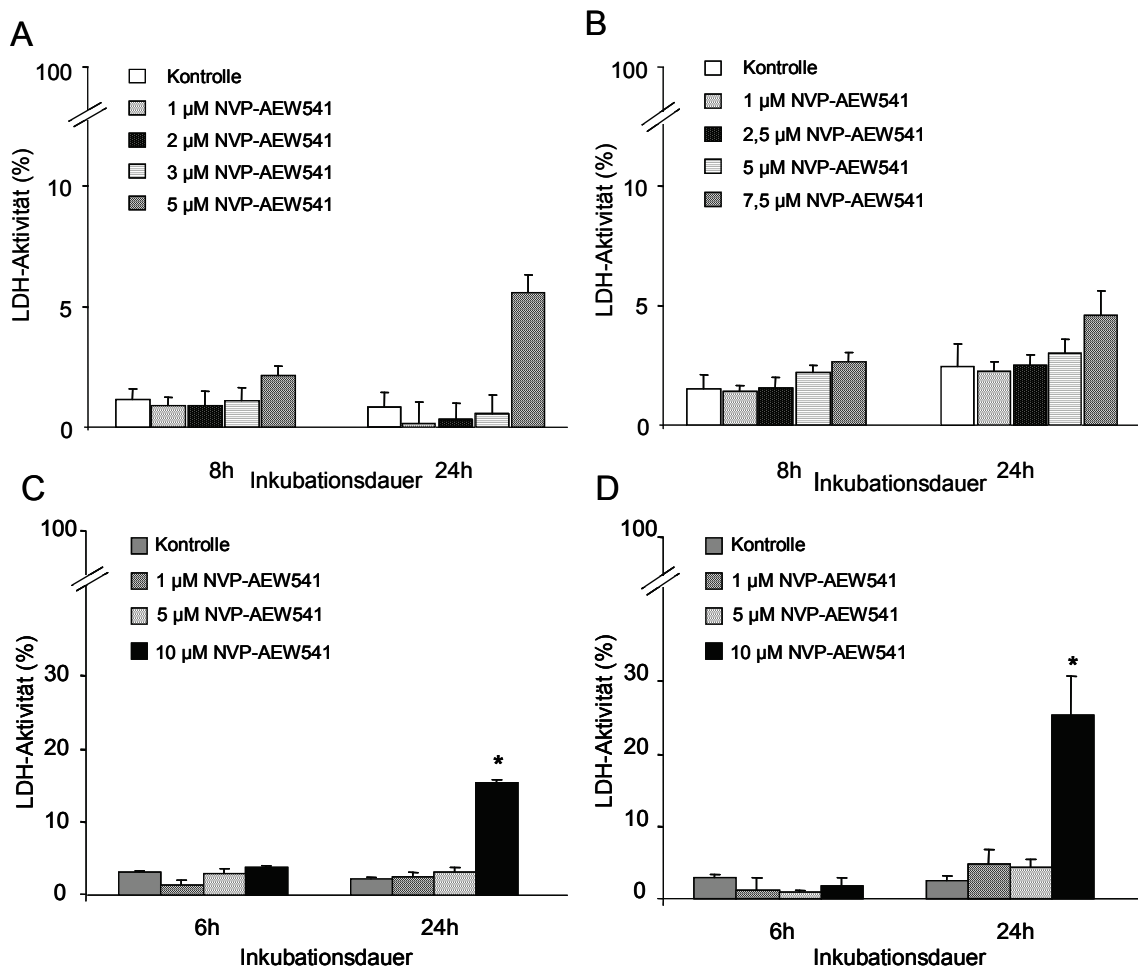


Abbildung 3-6: Zytotoxische Effekte des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541. Darstellung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in den Zellkulturüberständen von NET-Zellen (A,B) und HCC-Zellen (C,D) zu verschiedenen Messzeitpunkten. Die LDH-Freisetzung der unbehandelten Kontrollansätze wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen \pm SEM. * $p < 0,05$.

3.1.5 Apoptoseinduktion durch IGF-1R-Inhibition

Während der Karzinogenese kommt es in Tumoren vielfach zu teilweisem Verlust der Apoptosefähigkeit von Tumorzellen, weil die funktionelle Expression von proapoptotischen Proteinen vermindert bzw. die Expression antiproliferativer Proteine hochreguliert wird und somit das Gleichgewicht von pro- und antiapoptotischen Proteinen gestört ist. Die Reinitialisierung des zellulären Apoptoseprogramms ist daher von großem Interesse für die Tumorthherapie.

Die apoptoseinduzierende Wirkung von NVP-AEW541 zeigte sich bereits bei mikroskopischen Untersuchungen zur Viabilität der Zellen mittels des Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays (siehe **Kap. 2.2.3.4**), bei denen NVP-AEW541-behandelte Zellen apoptosebedingte morphologische Veränderungen aufwiesen (**Abb. 3-7**).

Die mikroskopischen Analysen der neuroendokrinen Zelllinie BON demonstrierten deutliche morphologische Veränderungen nach 24-stündiger NVP-AEW541 Inkubation. In der Phasenkontrastmikroskopie erschienen die NVP-AEW541-behandelten Zellen flacher als die Kontrollzellen und neben einer Zellschrumpfung wurde auch die Abschnürung der als „*apoptotic bodies*“ bezeichneten membranumhüllten Vesikel sichtbar. Bei den Zellen, die mit 6 μ M NVP-AEW541 behandelt wurden, ließ sich zusätzlich anhand des Färbungsmusters EthD-1-positiver Zellen die Fragmentierung des Zellkerns erkennen (**Abb. 3-7 A**).

Die Untersuchungen an Huh-7 Zellen bestätigen die Beobachtungen auch für HCC-Zellen. Auch hier zeigten sich bei den NVP-AEW541-behandelten Zellen nach 24-stündiger NVP-AEW541 Inkubation auffällige morphologische Veränderungen, die sowohl die Bildung der „*apoptotic bodies*“ als auch die Fragmentierung des Zellkerns umfasst. In der Phasenkontrastmikroskopie erschienen die Zellen unstrukturiert, zusammengeschrumpft und flach (**Abb. 3-7, B**).

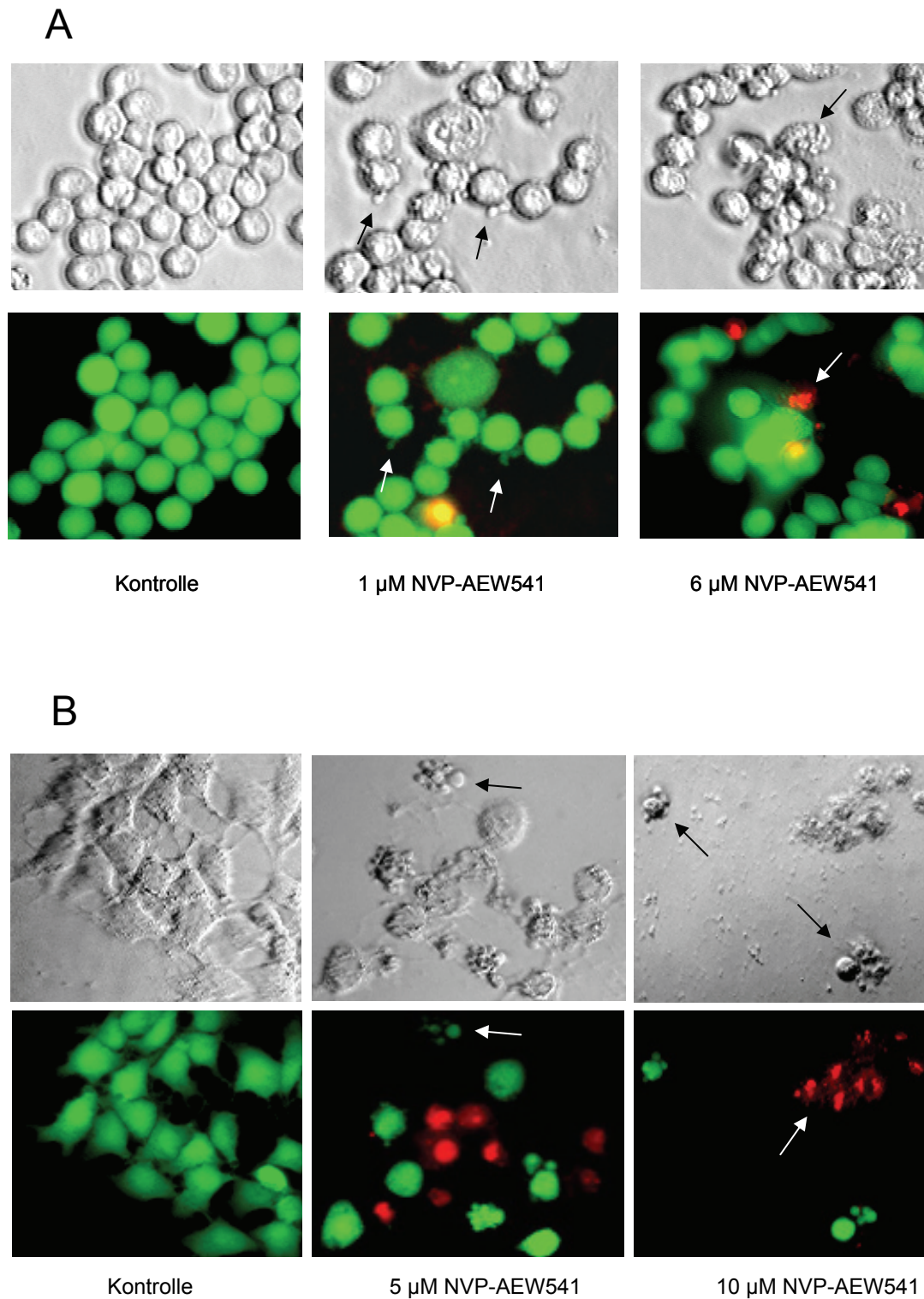


Abbildung 3-7: NVP-AEW541-induzierte morphologische Veränderungen bei NET- und HCC-Zellen. NET-Zellen (A) und HCC-Zellen (B) wurden 24 Std. lang mit aufsteigenden NVP-AEW541-Konzentrationen behandelt und anschließend mittels eines Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays („Live/Dead-Assay“) angefärbt und mikroskopisch analysiert. Lebende Zellen werden hierbei über Grünfluoreszenz, tote Zellen über Rotfluoreszenz detektiert. NVP-AEW541 induziert dosisabhängig eine Zunahme an apoptosespezifischen morphologischen Veränderungen wie die Bildung der „apoptotic bodies“ und eine Fragmentation der DNA (schwarze und weiße Pfeile). Phasenkontrastaufnahmen sind in der oberen Reihe abgebildet und die korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen sind in der unteren Reihe dargestellt. Repräsentatives Ergebnis aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

Um die Beobachtungen der mikroskopischen Untersuchungen zu verifizieren, sollte anhand verschiedener charakteristischer Ereignisse im Ablauf des apoptotischen Programms der Zelle die Apoptoseinduktion durch die Inhibition des IGF-1R bei HCC-, CRC- und gastrointestinalen NET-Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden zum einen mitochondriale Veränderungen (**Kap. 2.2.4.1**) und die Aktivität der Caspase-3 (**Kap. 2.2.4.2**) als Ausdruck eines frühen Apoptosestadiums gemessen und zum anderen die DNA-Fragmentierung (**Kap. 2.2.4.3**) als Zeichen eines späten Apoptosestadiums überprüft. Parallel dazu wurden Expressionsveränderungen apoptoseregulierender Proteine mittels Western Blot analysiert.

Mitochondriale Veränderungen durch die IGF-1R-Inhibition

Hepatozelluläre Hep-G2- und Huh-7-Karzinomzellen wurden mit steigenden Konzentrationen an NVP-AEW541 (0-10 μ M) für 3-24 Stunden inkubiert und apoptose-spezifische Veränderungen des mitochondrialen Volumens und des mitochondrialen Membranpotenzials (V_M , $\Delta\Psi_M$) wurden durch Anfärbung mit JC-1 durchflusszytometrisch untersucht. In beiden Zelllinien wurde eine konzentrations- und zeitabhängige Depolarisierung des Membranpotenzials ($\Delta\Psi_M$) beobachtet (**Abb. 3-8, A,C**). Interessanterweise zeigte sich weder bei den Hep-G2- noch bei den Huh-7-Zellen eine deutliche Zunahme des Mitochondrienvolumens (V_M) (**Abb. 3-8 B,D**). Sogar bei den höchsten NVP-AEW541 Konzentrationen wurde nur eine leichte Zunahme des Mitochondrienvolumens beobachtet, die insgesamt weniger als 20 % betrug.

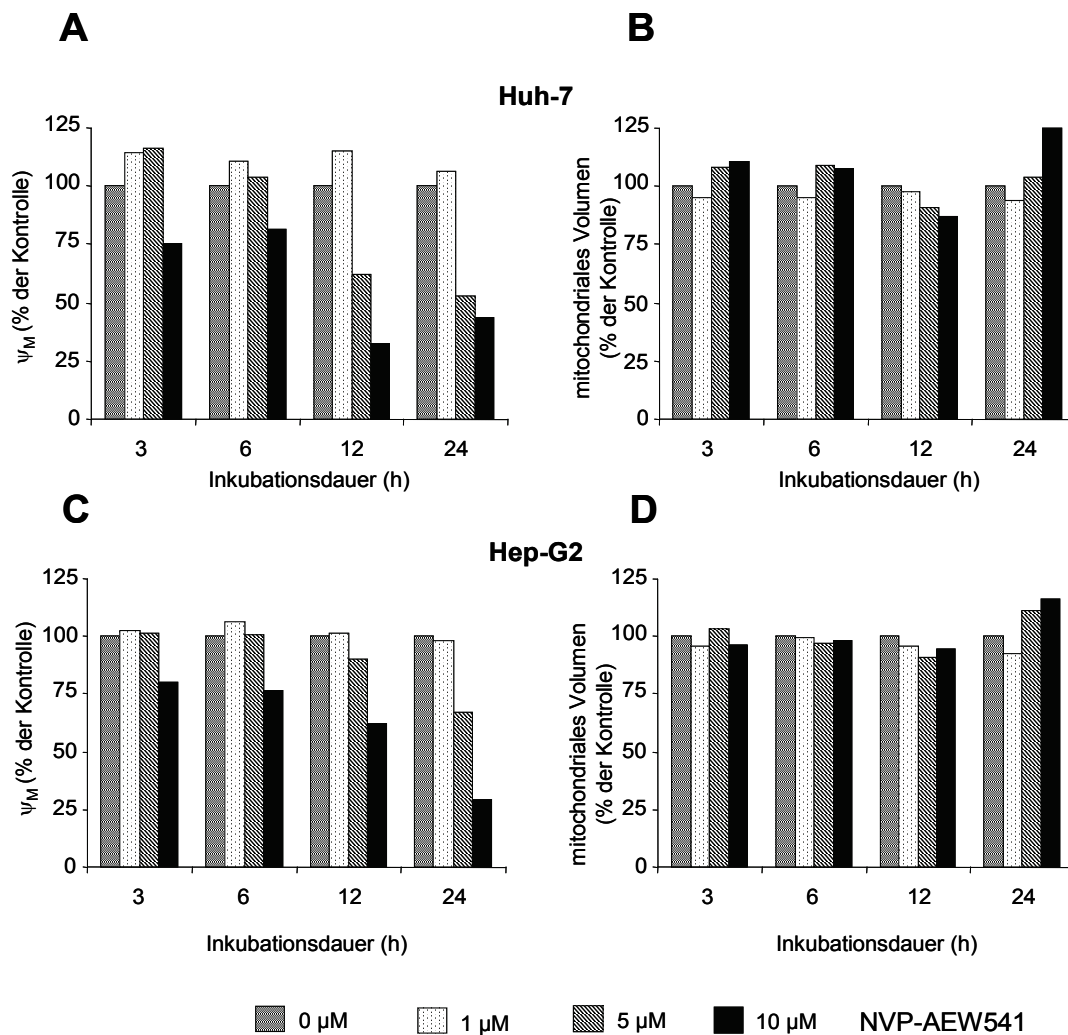


Abbildung 3-8: NVP-AEW541-induzierte mitochondriale Veränderungen.

Die Inkubation von humanen HCC-Zellen mit aufsteigenden NVP-AEW541-Konzentrationen führte sowohl in Huh-7(A) als auch in Hep-G2-Zellen (C) zu einer zeit- und dosisabhängigen Depolarisierung des Membranpotenzials $\Delta\Psi_M$. Eine merkliche Zunahme des mitochondrialen Volumens durch die NVP-AEW541-Behandlung wurde dagegen weder bei den Huh-7- (B) noch bei den Hep-G2-Zellen (D) beobachtet. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen je Zelllinie \pm SEM. Die Angabe der Daten erfolgt in Prozent der unbehandelten Kontrolle.

Caspase-3-Aktivierung

Die Aktivität der Caspase-3 wurde nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit NVP-AEW541 (0,1-10 μM) gemessen. Es zeigte sich sowohl bei den gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzelllinien, wie auch bei den hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzelllinien eine konzentrationsabhängige Zunahme der Caspase-3-Aktivität (Abb. 3-9). Die relative Zunahme der Enzymaktivität war bei den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Am stärksten erfolgte die Caspase-3-Aktivierung bei HCC-Zellen, besonders bei den Huh-7-Zellen, bei denen hohe NVP-AEW541-Konzentrationen eine bis zu 27-fach erhöhte Aktivität der Caspase-3 bewirkten. Bei kolorektalen Karzinomzellen stieg die Caspase-3-Aktivität nach NVP-

AEW54-Behandlung auf das 5-6-fache an. Dagegen wurde bei den beiden NET-Zellen nur eine leichte Zunahme der Caspase-3-Aktivität beobachtet.

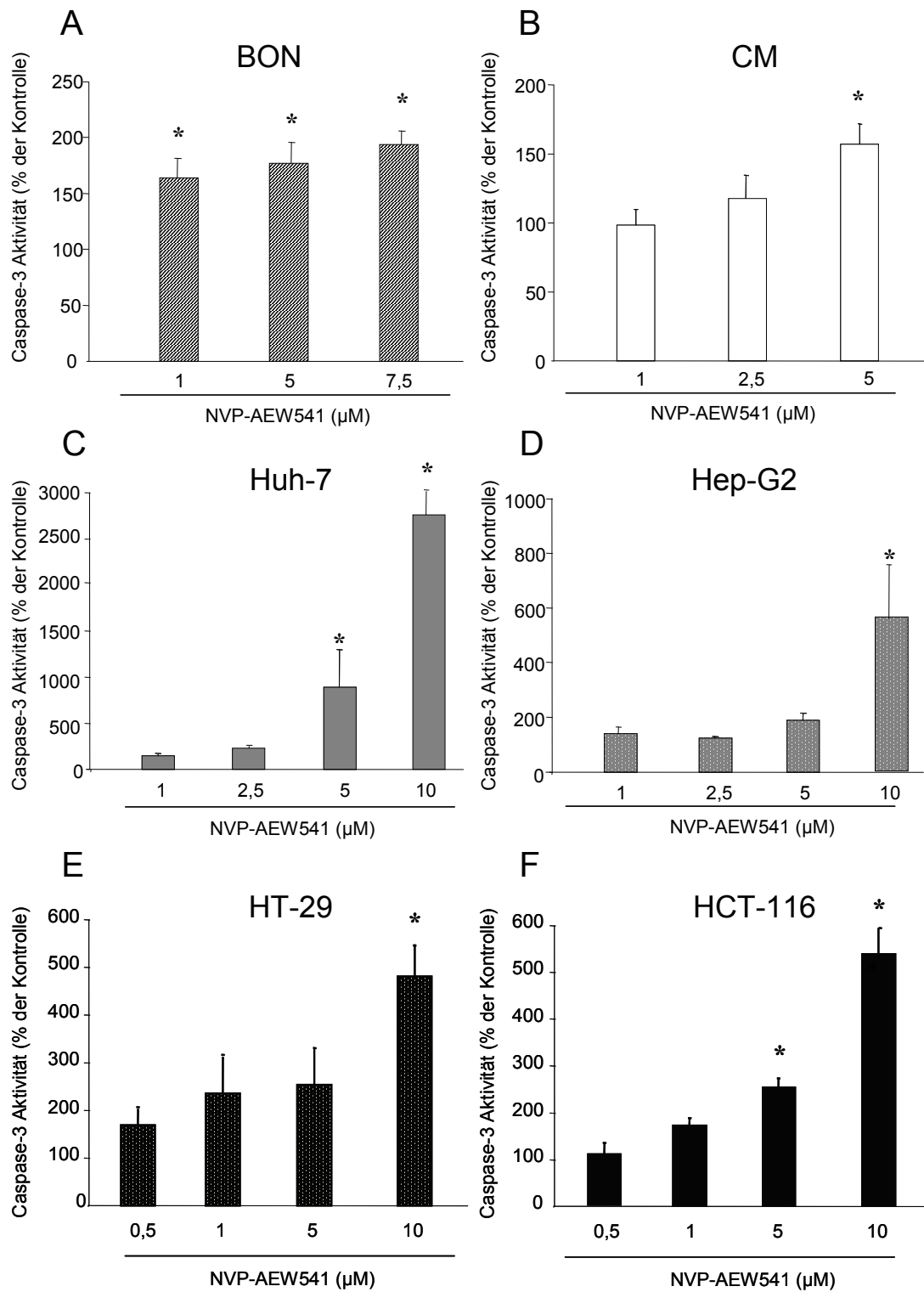
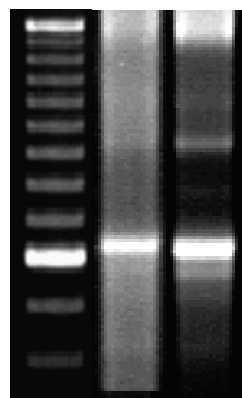


Abbildung 3-9: Caspase-3-Aktivierung durch NVP-AEW541.

Die Behandlung der Zellen mit NVP-AEW541 führte nach einer 24-stündigen Inkubation zu einer dosisabhängigen Zunahme der Caspase-3-Aktivität bei NET-Zellen (A,B), HCC-Zellen (C,D) und CRC-Zellen (E,F). Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen je Zelllinie ± SEM. Die Caspase-3-Aktivität des jeweiligen Kontrollansatz wurde auf 100 % gesetzt. * $p < 0,05$.

DNA-Fragmentierung

Zum Nachweis von Endpunkten der Apoptose wurde die Fragmentierung der DNA untersucht, die einen irreversiblen Schritt im apoptotischen Programm darstellt. Anhand einer charakteristischen Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese ließ sich bei den untersuchten Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 10 μM NVP-AEW541 eine apoptosespezifische DNA-Fragmentierung feststellen (**Abb. 3-10**).



M 0 10

NVP-AEW541 (μM)

Abbildung 3-10: Apoptose IV: DNA-Fragmentierung durch NVP-AEW541. Exemplarische Darstellung einer NVP-AEW541-induzierten Fragmentierung der DNA bei Huh-7-Zellen. Die Inkubation der Zellen für 24 Std. mit 10 μM NVP-AEW541 verursachte eine apoptosespezifische DNA-Fragmentierung der zellulären DNA. M = 100 bp Marker (n = 3 unabhängige Experimente).

Expression von apoptoserelevanten Proteinen

Um die Auswirkungen von NVP-AEW541 auf die Apoptoseregulierung gastrointestinaler Tumore näher zu charakterisieren, wurde die Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie mittels Western Blot untersucht (**Abb. 3-11**).

Die Erfassung einer zeitabhängigen Regulierung von Proteinen der Bcl-2-Familie wurde beispielhaft an den neuroendokrinen Tumorzellen untersucht. Dazu wurden BON-Zellen für 0-48 Std. mit 10 μM NVP-AEW541 inkubiert und die Proteinexpression von proapoptotischem Bax und antiapoptotischem Bcl-2 zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Western Blot Analysen ergaben, dass die Inhibition von IGF-1R mittels NVP-AEW541 das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 maßgeblich veränderte, indem die Proteinexpression von Bax anstieg, während die Bcl-2-Proteinexpression herunterreguliert wurde (**Abb. 3-11, A**).

Ähnliche Ergebnisse zur Regulierung pro- und antiapoptotischer Proteine zeigten auch Western Blot Analysen bei HCC- und CRC-Zellen. Für diese Untersuchungen wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen an NVP-AEW541 (0,5-10 μM) behandelt und nach 24-stündiger Inkubation die Expression von Bax und Bcl-2 bestimmt. Die NVP-

AEW541-Behandlung führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der Bax- bei gleichzeitiger Abnahme der Bcl-2-Proteinexpression (**Abb. 3-11, B,C**).

Mit diesen Experimenten ließ sich also insgesamt sowohl für NET, HCC und CRC-Zellen eine durch NVP-AEW541 induzierte Verschiebung/Veränderung des Gleichgewichts von pro- und antiapoptischen Proteinen feststellen, die zur Auslösung von Apoptose führt.

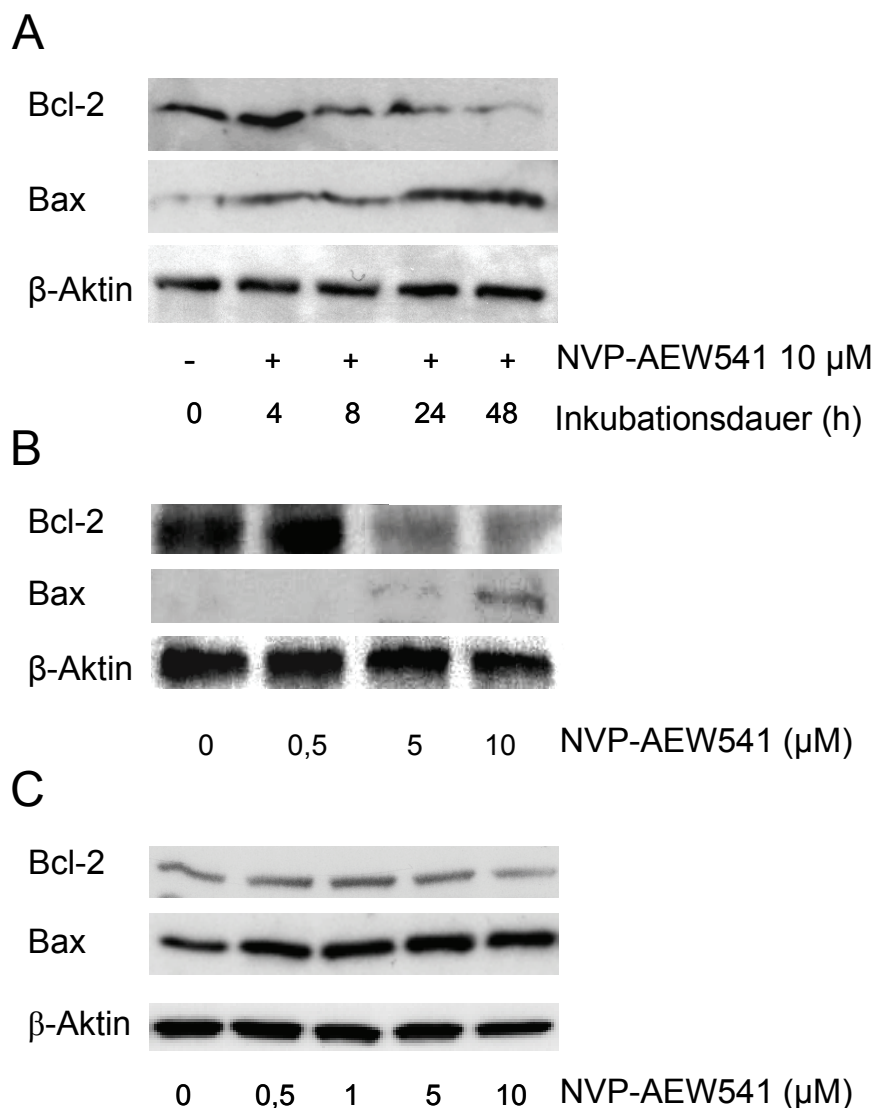


Abbildung. 3-11: Regulation der Expression apoptoserelevanter Proteine.

Der Einfluss der NVP-AEW541-Behandlung auf die Expression von apoptoserelevanten Proteinen der Bcl-2-Familie wurde mittels Western Blot Analysen untersucht. Die Inkubation der Zellen mit 10 μM NVP-AEW541 führte bei NET-Zellen zu einer Zunahme der Expression des proapoptotischen Proteins Bax und umgekehrt zu einer Suppression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (**A**). Weiterhin führte eine 24-stündige Inkubation mit 0-10 μM NVP-AEW541 auch bei den HCC-Zellen (**B**) und den CRC-Zellen (**C**) zu einer Induktion des proapoptotischen Bax und einer Suppression des antiapoptotischen Bcl-2. Exemplarisch gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von n = 3 unabhängigen Experimenten. β-Aktin diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.1.6 Zellzyklusregulation durch IGF-1R-Inhibition

Im Zuge der Entstehung und Progression vieler gastrointestinaler Tumore kommt es aufgrund kumulativer genetischer Alterationen zu einer exzessiven und unkontrollierten Proliferation von Tumorzellen. Wirkstoffe mit zellzyklusmodulierenden Eigenschaften sind somit interessant für die Therapie dieser Tumore. Daher wurde der Einfluss von NVP-AEW541 auf die Zellzyklusregulation in HCC-, CRC- und NET-Zelllinien untersucht.

Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen

Die Durchführung durchflusszytometrischer Zellzyklusanalysen (siehe Kap. 2.2.5) zeigte bei allen NVP-AEW54-behandelten gastrointestinalen Zelllinien einen dosisabhängigen, signifikanten Arrest des Zellzyklus in der G₀/G₁. Der Anteil der Zellen in der S- und G₂/M-Phase nahm entsprechend ab (Abb. 3-12).

Bei den hepatozellulären Karzinomzelllinien konnten bei höheren NVP-AEW541 außerdem noch apoptotische Zellen mit sub2n-DNA (hypodiploid) detektiert werden, die in Form eines zusätzlichen „*Peaks*“ vor der G₁-Phase (Sub-G₁-Phase) gemessen wurden. Am stärksten ausgeprägt war dieser „*Sub-G₁-Peak*“ bei den Huh-7-Zellen. Hier lag der Anteil an hypodiploiden Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit 10 µM NVP-AEW541 bei über 15 % (Abb. 3-12, C).

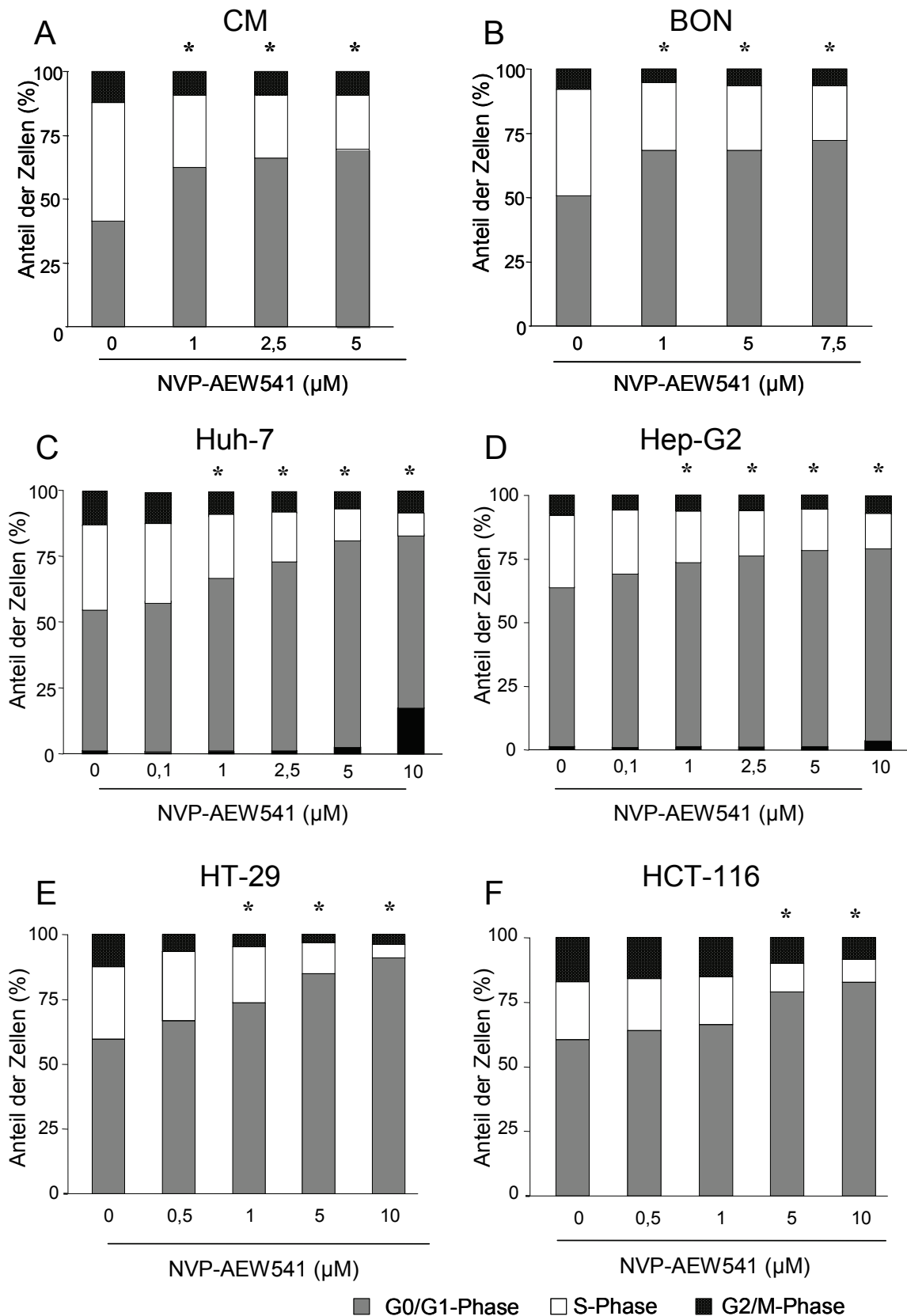


Abbildung 3-12: Zellzyklusregulation durch NVP-AEW541. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit aufsteigenden NVP-AEW541 akkumulierten die Zellen der NET (A,B), HCC (C,D) und CRC (E,F) in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Der Anteil der Zellen in der S- und der G2/M-Phase nahm parallel dazu in allen untersuchten Zelllinien ab. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen. * p<0,05

Veränderungen im Expressionsprofil von Zellzyklusregulatoren

Um die zugrunde liegenden Mechanismen einer IGF-1R-Inhibitor-vermittelten Zellzyklusarretierung genauer zu klassifizieren, wurden Veränderungen im Expressionsmuster von Proteinen untersucht, die zentrale Funktionen in der Zellzyklus-Regulation erfüllen. Dazu wurde die Expression des den Übergang von der G1- zur S-Phase regulierenden Cyclin D1, sowie die Expression der cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKI) p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} mittels Western Blot Analysen untersucht (**Abb. 3-13**).

Für diese Untersuchungen wurden neuroendokrine BON-Zellen bis zu 48 Std. mit 0-10 µM NVP-AEW541 behandelt und anschließend die Expression von Cyclin D1 und p27^{Kip1} zu verschiedenen Zeiten bestimmt. Für den Zellzykluspromoter Cyclin D1 zeigte sich eine zeitabhängige Abnahme der Proteinexpression, während die Expression des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} innerhalb des untersuchten Zeitraums kontinuierlich anstieg (**Abb. 3-13, A**).

Weiterhin wurde auch bei NVP-AEW541 behandelten kolorektalen HT-29-Karzinomzellen die Expression zellzyklusrelevanter Proteine mittels Western Blot untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation mit 0-10 µM NVP-AEW541 war die Expression von Cyclin D1 stark supprimiert. Umgekehrt zeigte sich bei der Proteinexpression der CDK-Inhibitoren p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} eine deutliche Expressionszunahme (**Abb. 3-13, B**).

Insgesamt konnte mit den Untersuchungen zur Zellzyklusregulation gezeigt werden, dass der IGF-1-R-Inhibitor NVP-AEW541 in den verschiedenen gastrointestinalen Tumormodellen einen Arrest der Zellzyklus in der G0/G1-Phase bewirkt, der mit einer veränderten Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1, p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} assoziiert ist.

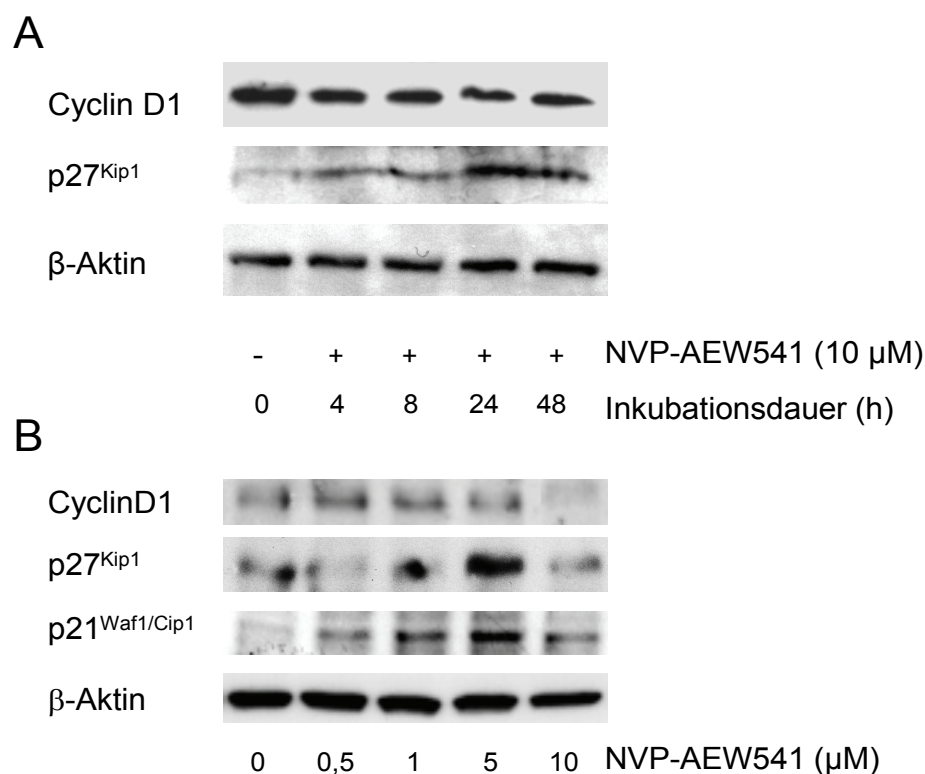


Abbildung 3-13: NVP-AEW541 moduliert die Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen.

A: NET-Zellen wurden bis zu 48 Std. mit 10 μM NVP-AEW541 inkubiert und anschließend wurden Veränderungen im Expressionsprofil von zellzyklusregulierenden Proteinen mittels Western Blot Analysen bestimmt. Der Zellzykluspromoter Cyclin D1 wurde durch NVP-AEW541 supprimiert und der Zellzyklusinhibitor p27^{Kip1} wurde verstärkt exprimiert. **B:** Die Proteinexpression von Cyclin D1 und den Zellzyklusinhibitoren p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} wurde bei CRC-Zellen nach einer 24-stündigen NVP-AEW541 Inkubation mittels Western Blot untersucht. Die Expression des Cyclin D1 wurde supprimiert, während die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} hochreguliert wurde. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von n = 3 unabhängigen Experimenten. β-Aktin diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.1.7 Regulation des Ras-Raf-MAPK- und des PI3-K-Signalwegs durch IGF-1R-Inhibition

Um die Effekte der IGF-1R-Inhibition auf nachgeschaltete, mitogene Signalwege aufzuzeigen, wurden Veränderungen im Expressionsstatus von Schlüsselproteinen des Ras-Raf-MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase)- und des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K)- Signalwegs untersucht. Zum einen wurde die extrazellulär regulierte Kinase ERK1/2, zum anderen die Proteinkinase B (PKB)/Akt ausgewählt (siehe **Kap. 1.3.3**).

Um die Verknüpfung des IGF-1-Rezeptors mit dem Ras-Raf-MAPK-Weg und damit mit der MAP-Kinase ERK1/2 zu demonstrieren, wurden serumfrei-kultivierte NET-Zellen für 15 min. mit 100 ng/ml IGF-1 stimuliert, wodurch eine ausgeprägte Aktivierung (Phosphorylierung) von ERK1/2 ausgelöst wurde. Parallel dazu wurden weitere Ansätze

serumfrei-gehaltener NET-Zellen vor der IGF-1-Stimulation mit verschiedenen NVP-AEW541-Konzentrationen vorbehandelt. Bei diesen Ansätzen zeigte sich, dass die IGF-1-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch NVP-AEW541 konzentrationsabhängig inhibiert wurde. Die Untersuchungen wurden im serumfreien Medium durchgeführt, um die Einflüsse anderer im fötalen Kälberserum vorhandener Wachstumsfaktoren auf die Aktivierung des MAPK-Signalwegs auszuschließen (**Abb. 3-14, A**).

Ähnliche Untersuchungen zur Aktivität der MAP-Kinase ERK1/2 wurden auch bei CRC-Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde bei den CRC-Zellen die Aktivität der PKB/Akt anhand der Phosphorylierung untersucht. Die Zellen wurden dazu für 24 Std. mit steigenden NVP-AEW541-Konzentrationen inkubiert und anschließend wurde der Phosphorylierungsstatus der ERK1/2 bzw. der PKB/Akt auf Proteinebene ermittelt. Durch die Behandlung der Zellen mit NVP-AEW541 wurde sowohl die Phosphorylierung der ERK1/2 als auch der PKB/Akt inhibiert. Die Abnahme an phosphorylierter ERK1/2 und phosphorylierter PKB/Akt erfolgte in Abhängigkeit der NVP-AEW541-Konzentration (**Abb. 3.14, B**).

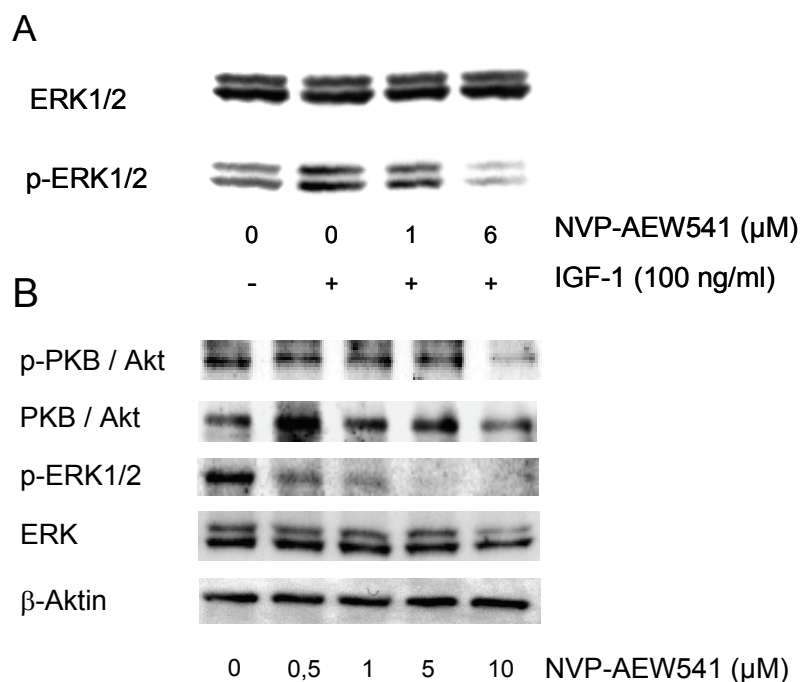


Abbildung 3-14: Unterbrechung des Ras-Raf-MAPK und des PI3-K-Wegs durch NVP-AEW541.

A: Serumfrei-kultivierte NET-Zellen wurden für 1 Std. mit verschiedenen NVP-AEW541-Konzentrationen inkubiert und anschließend für 15 min mit 100 ng/ml IGF-1 stimuliert. Die Proteinexpression der phosphorylierten ERK1/2 und der Gesamtmenge an ERK1/2 wurde mittels Western Blot untersucht. NVP-AEW541 induzierte dosisabhängig eine Abnahme der phosphorylierten ERK1/2. Die Gesamtexpression der ERK1/2 blieb konstant. **B:** CRC-Zellen wurden für 24 Std. mit steigenden NVP-AEW541-Konzentrationen inkubiert und mittels Western Blot wurde die Aktivität der ERK1/2 und der Proteinkinase B (PKB/Akt). Die Expression der phosphorylierten ERK1/2 und der phosphorylierten PKB/Akt nahm durch die NVP-AEW541 Behandlung in Abhängigkeit von der Konzentration ab. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus n = 3 unabhängigen Versuchen.

3.1.8 Steigerung der antiproliferativen Effektivität von IGF-1R-Inhibitoren durch kombinationstherapeutische Ansätze

Nachdem die antiproliferativen Effekte einer IGF-1R-Inhibition bei den drei gastrointestinalen Tumorentitäten, NET, HCC und CRC, näher charakterisiert wurden, sollte als nächstes die Wirkung des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 in Kombinationsansätzen mit konventionellen Zytostatika oder anderen antiproliferativen Wirkstoffen bei gastrointestinalen Tumoren untersucht werden. Dabei sollte anhand von Proliferationsstudien überprüft werden, ob die Co-Applikation von IGF-1-Rezeptor-Inhibitoren mit verschiedenen Zytostatika oder dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Fluvastatin zu einer additiven bis überadditiven/synergistische Wirkungsverstärkung.

3.1.8.1 Wachstumshemmung durch IGF-1R-Inhibitoren in Kombination mit konventionellen Zytostatika oder Fluvastatin

Untersuchungen zur Wirksamkeit des IGF-1-Rezeptor-Inhibitors NVP-AEW541 in Kombination mit Zytostatika wurden bei gastrointestinalen Tumoren bislang noch nicht vorgenommen. Für die Kombinationsexperimente mit NVP-AEW541 wurden die in **Tab. 3-3** aufgelisteten Substanzen in Abhängigkeit von den respektiven Tumorentitäten kombiniert. Neben konventionellen Zytostatika sollte die antineoplastische Potenz von Fluvastatin in Kombination mit NVP-AEW541 überprüft werden. Fluvastatin ist ein Inhibitor der Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA (HMG-CoA)-Reduktase und hemmt die endogene Cholesterinsynthese. Da es außerdem das Zellwachstum beeinflusst, wird dem Fluvastatin auch eine antiproliferative Wirkung zugeschrieben.

Tumormodell	Kombinationsansatz
NET	<ul style="list-style-type: none"> • Doxorubicin + NVP-AEW541 • 5-FU + NVP-AEW541 • Fluvastatin + NVP-AEW541
HCC	<ul style="list-style-type: none"> • Docetaxel + NVP-AEW541 • Doxorubicin + NVP-AEW541 • SN-38 + NVP-AEW541
CRC	<ul style="list-style-type: none"> • 5-FU + NVP-AEW541 • SN-38 + NVP-AEW541 • Fluvastatin + NVP-AEW541

Tabelle 3-3: Kombinationsexperimente I: NVP-AEW541 in Kombination mit konventionellen Zytostatika oder Fluvastatin.

Bei NET-Zellen zeigte sich durch Kombination von NVP-AEW541 mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor Doxorubicin oder dem HMG-Co-A-Reduktase Inhibitor Fluvastatin eine additive bis überadditive antiproliferative Wirkung. Demgegenüber ergaben Kombinationen mit dem Antimetaboliten 5-Fluorouracil (5-FU) keine additive Wirkungsverstärkung. (Abb. 3-15).

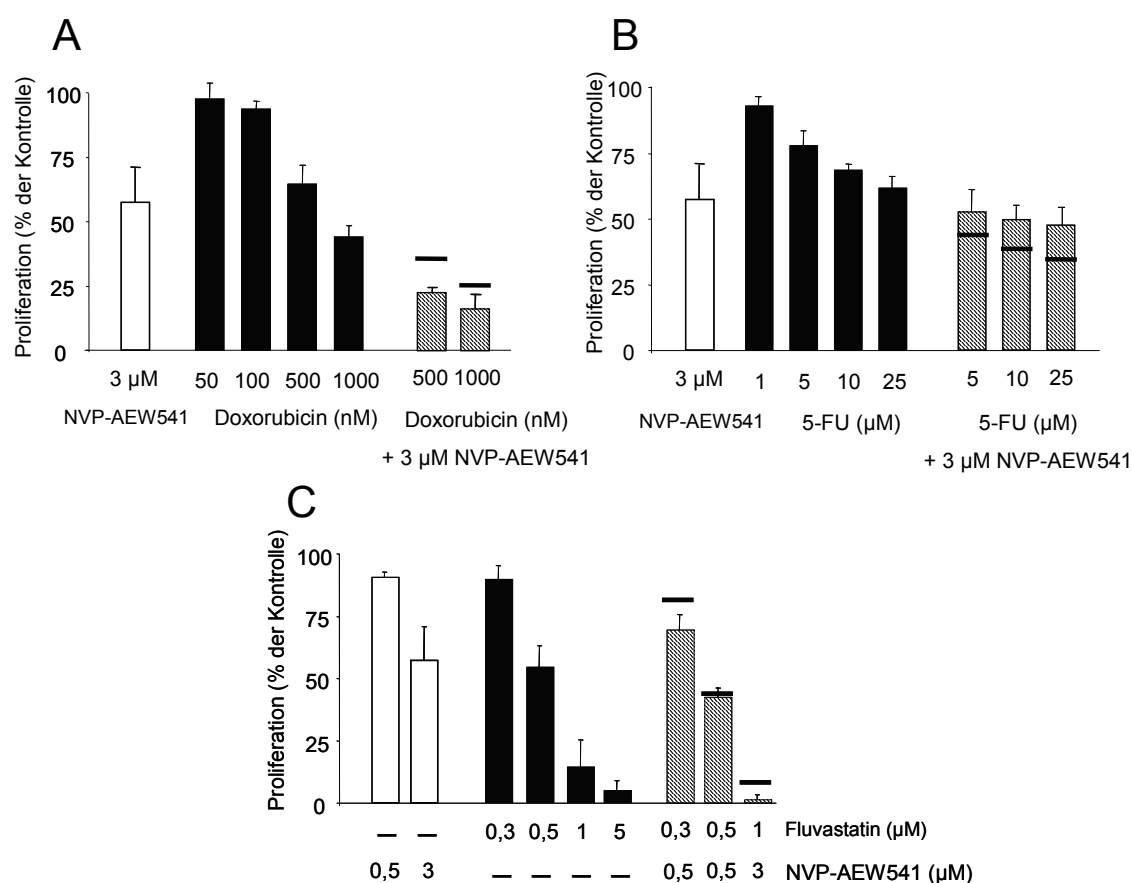


Abbildung 3-15: NVP-AEW541 in Kombination mit konventionellen Zytostatika und Fluvastatin bei NET-Zellen. NET-Zellen wurden für 72 Std. mit steigenden Konzentrationen an Doxorubicin (A), 5-FU (B) oder Fluvastatin (C) alleine oder in Kombination mit jeweils 3 μ M NVP-AEW541 behandelt. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Die rechnerische additive Wachstumsinhibition der jeweiligen Kombination ist als schwarzer Querbalken angezeigt. Mittelwerte aus $n = 4$ unabhängigen Versuchen \pm SEM.

Bei HCC-Zellen wurden antiproliferative Synergismen bei der Kombination des IGF-1-Rezeptor-Inhibitors NVP-AEW541 mit Doxorubicin oder dem Mitoseinhibitor Docetaxel beobachtet. Die Kombination von NVP-AEW541 mit SN-38, dem aktiven Metaboliten des Topoisomerase-I-Inhibitors Irinotecan, zeigte dagegen nur eine leichte Wirkungssteigerung (Abb. 3-16).

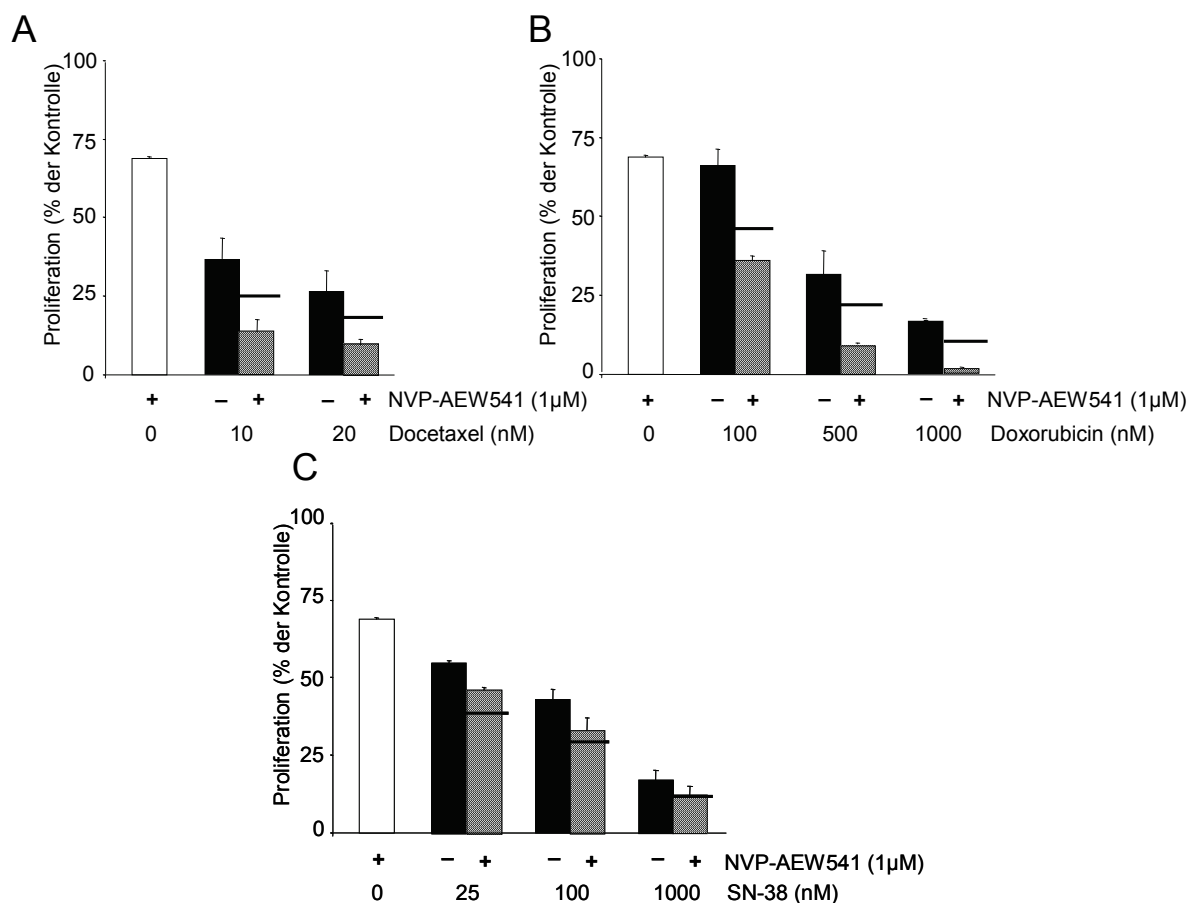


Abbildung 3-16: NVP-AEW541 in Kombination mit konventionellen Zytostatika und Fluvastatin bei HCC-Zellen. HCC-Zellen wurden für 72 Std. mit steigenden Konzentrationen an Docetaxel (A), Doxorubicin (B) oder SN-38 (C) alleine oder in Kombination mit jeweils 1 μM NVP-AEW541 behandelt. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Die rechnerische additive Wachstumsinhibition der jeweiligen Kombination ist als schwarzer Querbalken angezeigt. Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen ± SEM.

Bei kolorektalen Karzinomzellen (CRC) führte die Kombination von NVP-AEW541 mit dem Antimetaboliten 5-FU und mit Fluvastatin in beiden Zelllinien zu einer additiven bis überadditiven Wirkungsverstärkung. Die Kombination von NVP-AEW541 mit SN-38 war bei der CRC-Zelllinie HCT-116 Zellen ebenfalls additiv. Bei der CRC-Zelllinie HT-29 dagegen zeigte dieser Kombinationsansatz NVP-AEW541/SN-38 keine Wirkungsverstärkung (Abb. 3-17).

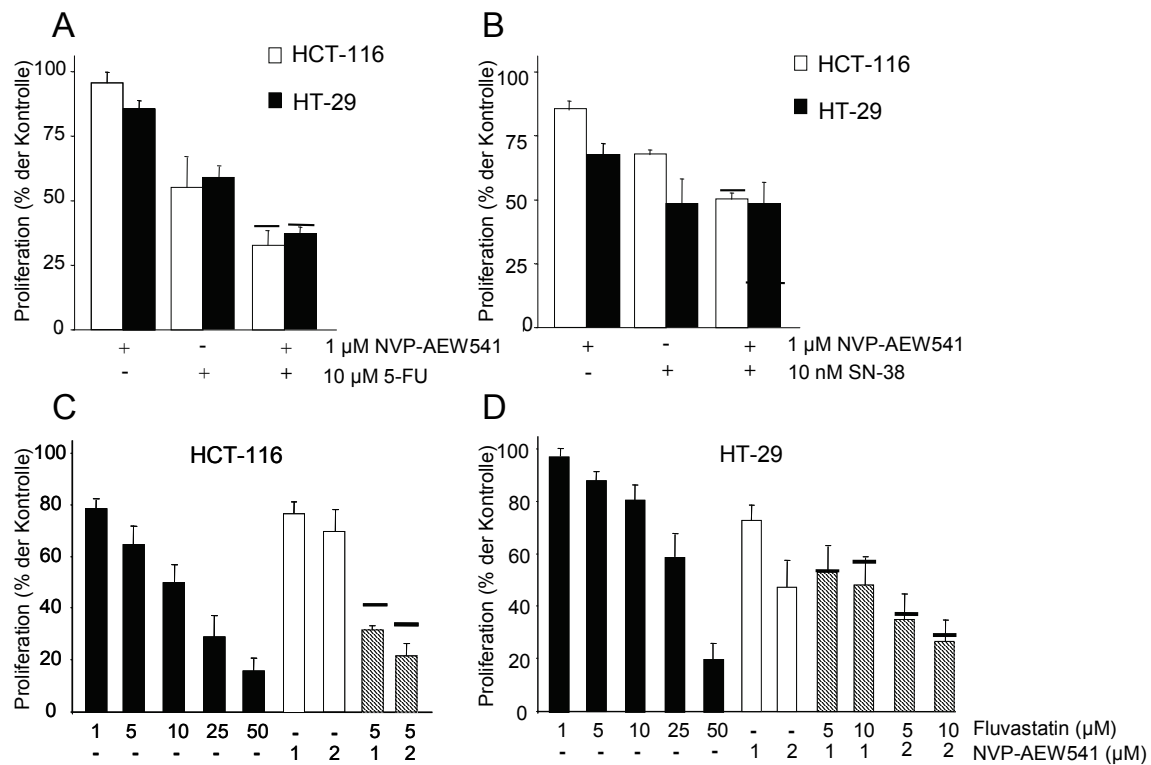


Abbildung 3-17: NVP-AEW541 in Kombination mit konventionellen Zytostatika und Fluvastatin bei CRC-Zellen. CRC-Zellen wurden für 72 Std. mit 5-FU (A) SN-38 (B) oder Fluvastatin (C, D) alleine oder in Kombination mit jeweils 1 und/oder 2 µM NVP-AEW541 behandelt. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Die rechnerische additive Wachstumsinhibition der jeweiligen Kombination ist als schwarzer Querbalken angezeigt. Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen ± SEM.

3.1.8.2 Wachstumshemmung durch IGF-1R-Inhibitoren in Kombination mit EGFR-Inhibitoren

Da der IGF-1-Rezeptor in der Lage ist, den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR zu transaktivieren, werden mitogene IGF-Effekte zumindest teilweise auch über den EGFR-Signalweg vermittelt (vgl. Kap. 1.3.4). Aufgrund der Wechselwirkung zwischen diesen beiden Wachstumsfaktorrezeptoren sollte daher auch die Beeinflussung der Zellproliferation durch eine simultane Blockade des IGF-1 und EGF-Rezeptors untersucht werden. Die funktionelle Expression von EGF-Rezeptoren bei den verwendeten Zellmodellen war bereits aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe belegt (Höpfner et al., 2004; Höpfner et al., 2006).

Als Inhibitoren des IGF-1R wurden hierbei NVP-AEW541 sowie der Tyrosinkinaseinhibitor AG1024 eingesetzt (siehe Kap. 1.3.5). Die Inhibition des EGFR wurde entweder durch den Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (TarcevaTM) oder die monoklonalen EGFR-Antikörper Ab-3103 und Cetuximab (ErbixTM) vorgenommen (siehe Kap 1.3.5).

Tumormodell	Kombinationsansatz: IGF-1R/EGFR-Inhibitoren
HCC	<ul style="list-style-type: none"> • AG1024 + Cetuximab • AG1024 + Erlotinib • NVP-AEW541 + Ab-3103
CRC	<ul style="list-style-type: none"> • NVP-AEW541 + Cetuximab

Tabelle 3-4: Kombinationsexperimente II: IGF-1R-Inhibitoren in Kombination mit EGFR-Inhibitoren

Die simultane Inhibition des IGF-1R- und EGFR führte bei den HCC-Zellen zu einer Wirkungsverstärkung. Nach 3-tägiger Inkubation der Zellen resultierten alle Kombinationen in deutlich additiven bis überadditiven antiproliferativen Effekten, welche die errechneten additiven Werte im Durchschnitt um 10 % überstiegen. Besonders interessant war die Wirkung der AG1024/Cetuximab-Kombination auf die Huh-7-Zellen. Obwohl die antiproliferative Wirkung des EGFR-Antikörpers Cetuximab allein bei Huh-7 Zellen nur schwach ausgeprägt war, zeigte die simultane IGF-1R-/EGFR-Blockade eine deutlich synergistische Hemmung des Tumorzellwachstums, die fast 35% über der errechneten additiven Wachstumsinhibition lag (**Abb. 3-18**).

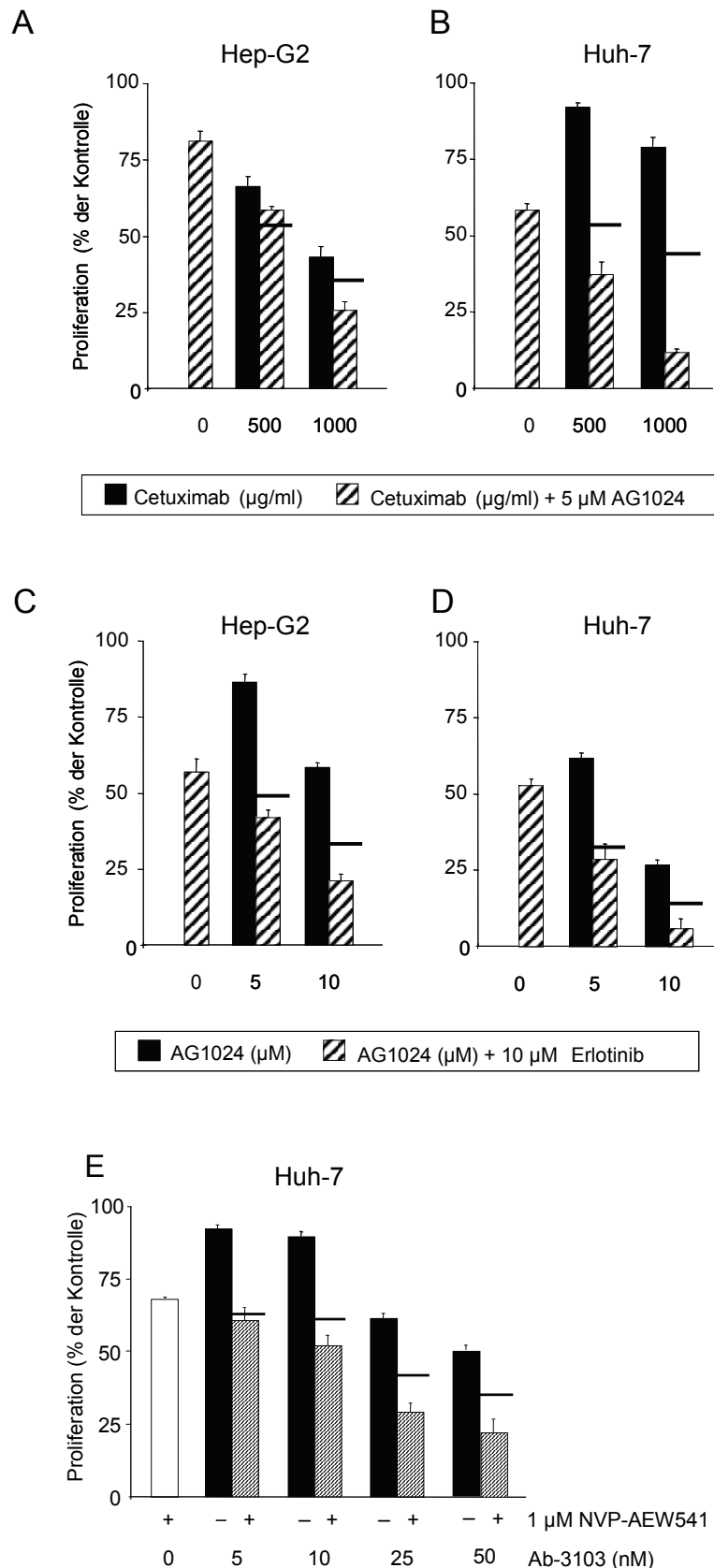


Abbildung 3-18: Simultane Blockade des IGF-1- und des EGF-Rezeptors bei HCC-Zellen.

Die HCC-Zellen wurden entweder mit Cetuximab und AG1024 (A,B) oder mit AG1024 und Erlotinib (C,D) oder mit NVP-AEW541 und Ab-3103 (E) für 72 Std. inkubiert. Die simultane Inhibition des IGF-1R und des EGFR führte bei allen Kombinationsansätzen zu einer additiven bis überadditiven Wirkungsverstärkung. Die rechnerische additive Wachstumsinhibition der jeweiligen Kombination ist als schwarzer Querbalken angezeigt. Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen ± SEM.

Die Kombinationsversuche bei kolorektalen Karzinomzellen zeigten ebenfalls eine gesteigerte Wirkung durch die gleichzeitige Inhibition von IGF-1R und EGFR-Signalwegen. NVP-AEW541 in Kombination mit Cetuximab führte nach 4-tägiger Inkubation bei den CRC-Zelllinien HCT-116 und HT-29 zu synergistischen antiproliferativen Effekten, welche die errechnete additive Wirkung bei HCT-116-Zellen um ca. 10 % und bei HT-29-Zellen sogar um fast 20 % überstieg (**Abb. 3-19**).

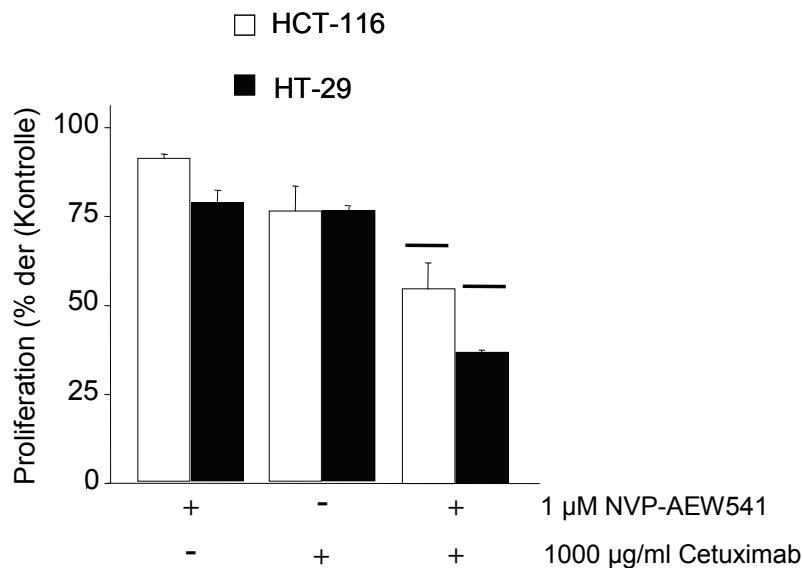


Abbildung 3-19: Simultane Blockade des IGF-1-Rezeptors und des EGF-Rezeptors bei CRC-Zellen. Die kolorektalen Karzinomzelllinien HCT-116 und HT-29 wurden mit NVP-AEW541 und Cetuximab für 96 Std. inkubiert. Die simultane Inhibition des IGF-1R und des EGFR führte bei beiden Zelllinien zu einer überadditiven Wirkungsverstärkung. Die rechnerische additive Wachstumsinhibition der Kombination ist als schwarzer Querbalken angezeigt. Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen ± SEM.

3.2 Die Inhibition der Histondeacetylaseaktivität

Die Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung von Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren wurden an zwei verschiedenen Tumorentitäten durchgeführt. Neben den gastrointestinalen neuroendokrinen Tumor (NET)-Zelllinien BON und CM wurden zusätzliche Arbeiten an den beiden Cholangiokarzinom (CCC)-Zelllinien EGI-1 und TFK-1 durchgeführt. Es wurden insgesamt drei unterschiedliche HDAC-Inhibitoren getestet. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf dem synthetischen Benzamid MS-275. Zusätzlich wurde ein Teil der Versuche zum Vergleich mit der Hydroxaminsäure Trichostatin A und der kurzkettigen Fettsäure Natriumbutyrat durchgeführt (siehe **Kap. 1.4.3**).

3.2.1 Antiproliferative Wirkung von HDAC-Inhibitoren bei gastrointestinalen Tumoren

Als erstes sollte die antiproliferative Wirkung von MS-275 in den verschiedenen gastrointestinalen Zelllinien überprüft werden. Der Nachweis der Wachstumshemmung erfolgte mittels Kristallviolett-Assay (**Abb. 3-20**). Die Inkubation der Zellen mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 führte sowohl bei den neuroendokrinen Tumorzelllinien BON und CM, als auch bei den cholangiozellulären Karzinomzelllinien EGI-1 und TFK-1 zu einer dosisabhängigen Abnahme der Zellzahl. Nach dreitägiger Inkubation der Zellen mit MS-275 wurde bei fast allen Zelllinien eine annähernd 100 %-ige Reduktion der Zellzahl festgestellt. EGI-1 und TFK-1 wiesen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber MS-275 auf, die sich in der niedrigen halbmaximalen wachstumsinhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von MS-275 von $0,48 \pm 0,02 \mu\text{M}$ (EGI-1) und $0,46 \pm 0,02 \mu\text{M}$ (TFK-1) widerspiegelt. Bei den neuroendokrinen Tumorzelllinien zeigte sich eine zelltypspezifische Sensitivität. Die schnell wachsenden CM-Zellen zeigten wie die EGI-1- und TFK-1-Zellen eine hohe Sensitivität, während die moderat wachsende BON-Zellen ein deutlich geringeres Ansprechverhalten gegenüber MS-275 zeigten, was sich in einem ca. 5-6-fach höherem IC_{50} Wert von $3,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ äußerte (**Tab. 3-5**).

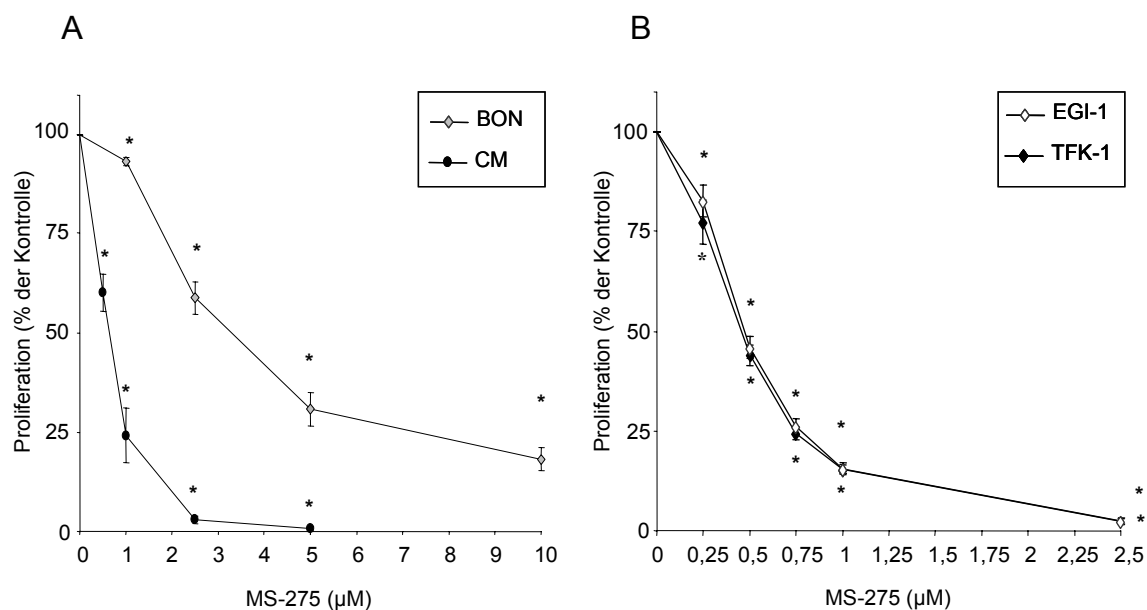


Abbildung 3-20: Antiproliferative Effekte von MS-275 bei gastrointestinalen Tumoren.

Der HDAC-Inhibitor MS-275 hemmte dosisabhängig das Wachstum von NET-Zellen (A) und CCC-Zellen (B) nach 3-tägiger Inkubation. Dargestellt ist die prozentuale Wachstumsinhibition gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Mittelwert aus mindestens vier unabhängigen Versuchen je Zelllinie \pm Standardfehler (SEM) ist angegeben. * $p < 0,05$

Tumormodell	Zelllinie	IC ₅₀ (nach 72 Std.)
Gastrointestinale neuroendokrine Tumore (NET)	• BON	• $3,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$
	• CM	• $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$
Cholangiozelluläre Karzinome (CCC)	• EGI-1	• $0,48 \pm 0,02 \mu\text{M}$
	• TFK-1	• $0,46 \pm 0,02 \mu\text{M}$

Tabelle 3-5: IC₅₀-Konzentrationen von MS-275 bei gastrointestinalen Tumorzellen nach 3-tägiger Inkubation.

Zum Vergleich wurde die antiproliferative Wirkung der beiden HDAC-Inhibitoren Natriumbutyrat (NaB) und Trichostatin A (TSA) bei BON- und CM-Zellen untersucht (Abb. 3-21). Sowohl TSA als auch NaB hemmten dosisabhängig die Proliferation der beiden Zelllinien. Auch hier war bereits nach 3-tägiger Inkubation eine 80-100 %-ige Abnahme der Zellzahl zu beobachten. Während der IC₅₀ von TSA bei beiden Zelllinien im nanomolaren Bereich lag, waren beim Natriumbutyrat (sub-)millimolare Konzentrationen nötig, um eine halbmaximale Wachstumsinhibition zu erreichen. Außerdem war für die schnell wachsende CM-Zelllinie im Vergleich zu den langsamer wachsenden BON-Zellen erneut ein sensitiveres Ansprechen gegenüber beiden HDAC-Inhibitoren zu erkennen (Tab. 3-6).

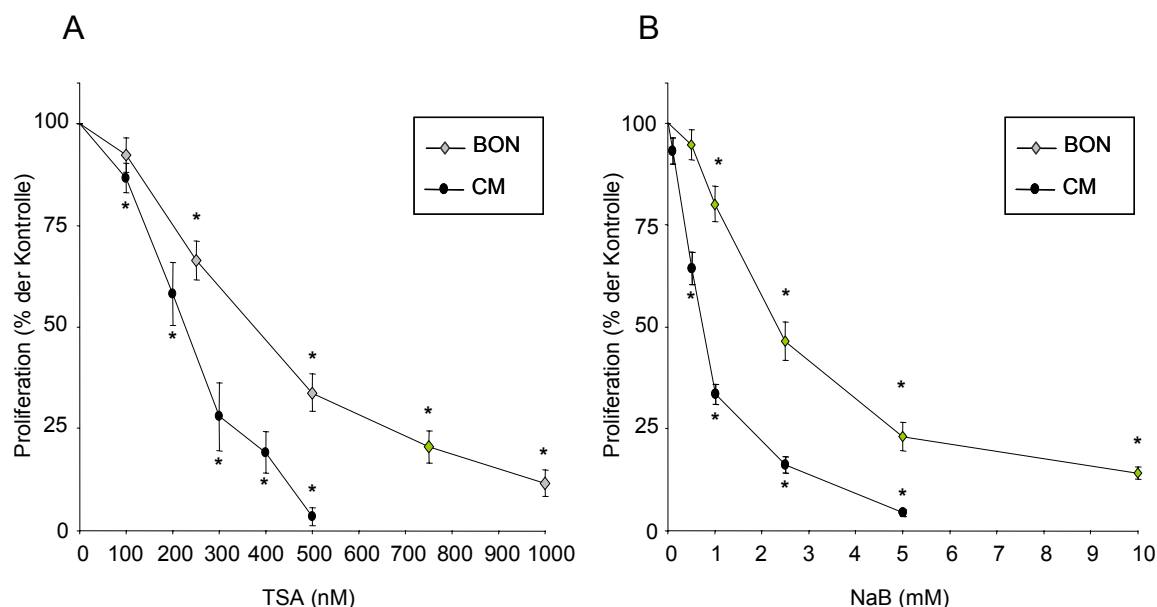


Abbildung 3-21: Antiproliferative Effekte von Trichostatin A (TSA) und Natriumbutyrat (NaB) bei gastrointestinalen Tumoren.

Die HDAC-Inhibitoren TSA (A) oder NaB (B) hemmten dosisabhängig das Wachstum von NET-Zellen nach 3-tägiger Inkubation. Dargestellt ist die prozentuale Wachstumsinhibition gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Mittelwert aus mindestens vier unabhängigen Versuchen je Zelllinie \pm Standardfehler (SEM) ist angegeben. * $p < 0,05$

HDAC-Inhibitor	Zelllinie	IC ₅₀ (nach 72 Std.)
Trichostatin A (TSA)	• BON	• 380 ± 80 nM
	• CM	• 240 ± 20 nM
Natriumbutyrat (NaB)	• BON	• $2,4 \pm 0,3$ mM
	• CM	• $0,8 \pm 0,1$ mM

Tabelle 3-6: IC₅₀-Konzentrationen von Trichostatin A (TSA) und Natriumbutyrat (NaB) bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzellen nach 3-tägiger Inkubation.

3.2.2 Zytotoxische Effekte von HDAC-Inhibitoren

Zur detaillierten Charakterisierung der antiproliferativen Wirkung der HDAC-Inhibitoren wurde der Anteil an unspezifischer Zytotoxizität der Substanzen überprüft. Der Zytotoxizitätsnachweis erfolgte über die Messung der Aktivität bzw. der Freisetzung der Laktatdehydrogenase. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 zeigte sich nur ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität, der $< 5\%$ betrug (Abb. 3-22).

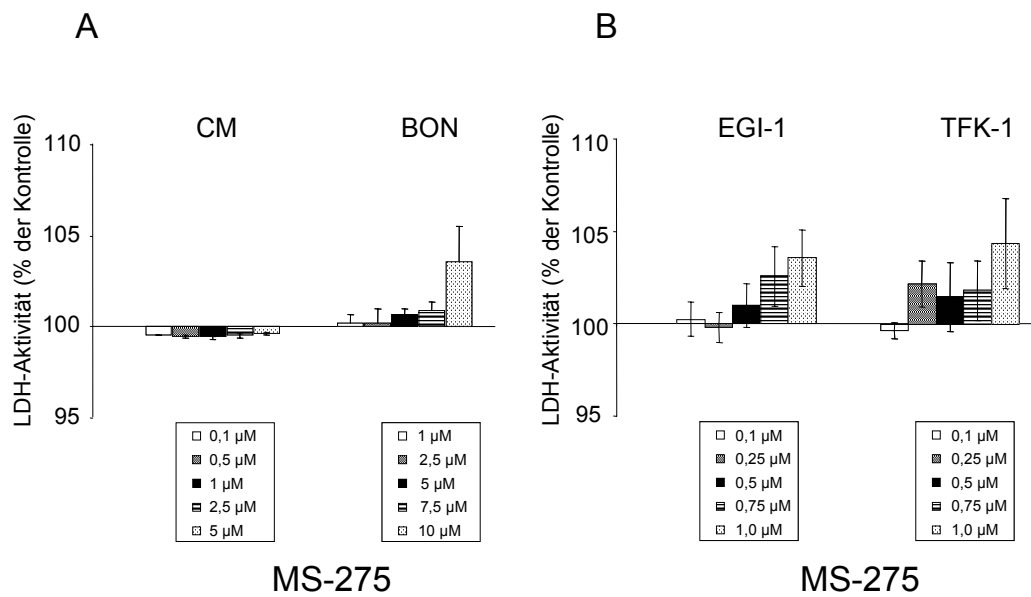


Abbildung 3-22: Zytotoxische Effekte von MS-275.

Darstellung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in den Zellkulturüberständen von NET-Zellen (A) und CCC-Zellen (B) nach 24-stündiger Inkubation mit dem HDAC-Inhibitor MS-275. Die LDH-Freisetzung der unbehandelten Kontrollansätze wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen \pm SEM. * $p < 0,05$.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den Untersuchungen zur Zytotoxizität von Trichostatin A und Natriumbutyrat. Auch hier führte die Inkubation der Zellen für 24 Std. mit den entsprechenden HDAC-Inhibitoren nur zu einem leichten Anstieg der LDH-Aktivität um maximal 6 % (Abb. 3-23).

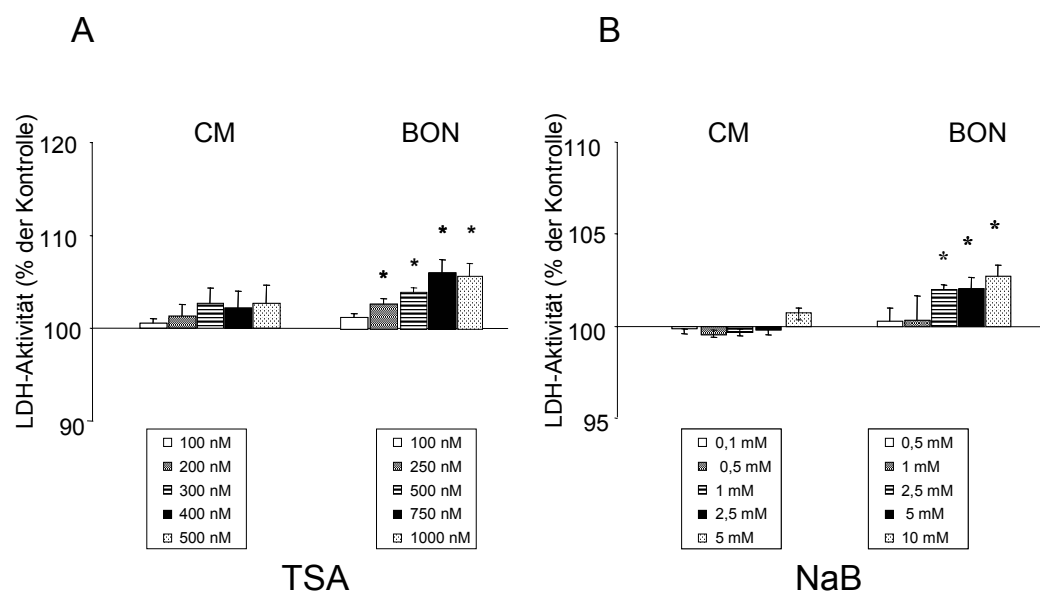


Abbildung 3-23: Zytotoxische Effekte von TSA und NaB.

Darstellung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in den Zellkulturüberständen von NET-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den HDAC-Inhibitoren TSA (A) bzw. NaB (B). Die LDH-Freisetzung der unbehandelten Kontrollansätze wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen \pm SEM. * $p < 0,05$.

Insgesamt lässt sich daraus ableiten, dass die HDAC-Inhibitoren MS-275, TSA und NaB die Membranintegrität in den untersuchten Zellen nicht beeinträchtigten, und auch höhere Konzentrationen keine direkten zytotoxischen Effekte auslösen.

3.2.3 Apoptoseinduktion durch Hemmung der HDAC-Aktivität

Da bei einer Vielzahl von soliden Tumoren beobachtet wurde, dass HDAC-Inhibitoren eine apoptoseinduzierende Wirkung besitzen, sollte im Rahmen dieser Arbeit für die drei HDAC-Inhibitoren MS-275, TSA und NaB die Fähigkeit zur Auslösung von Apoptose bei den hier untersuchten gastrointestinalen Tumorzellmodellen überprüft werden.

Caspase-3-Aktivierung

Die apoptoseinduzierende Wirkung von MS-275 wurde als erstes anhand der Aktivierung der Caspase-3 bei BON- und CM-Zellen überprüft. Dazu wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen an MS-275 (0,1-10 μM) behandelt und nach 24-stündiger Inkubation wurde die Aktivität der Caspase-3 bestimmt. Für beide Zelllinien ergab sich eine signifikante Zunahme der Caspase-3-Enzymaktivität, die bei BON-Zellen bis auf das 4-fache und bei CM-Zellen sogar bis auf das 12-fache der Grundaktivität anstieg (**Abb. 3-24**).

Die Caspase-3-Aktivitätsmessungen bei EGI-1- und TFK-1-Zellen, die mit steigenden MS-275-Konzentrationen (0,1-1 μM) bis zu 48 Stunden inkubiert wurden, ergaben sowohl eine zeit- und eine dosisabhängige Aktivierung der Caspase-3 durch MS-275. Bei diesen Zellen stieg die Aktivität der Caspase-3 um das 3-fache (TFK-1) bzw. 7-fache (EGI-1) der Grundaktivität an (**Abb. 3-24**).

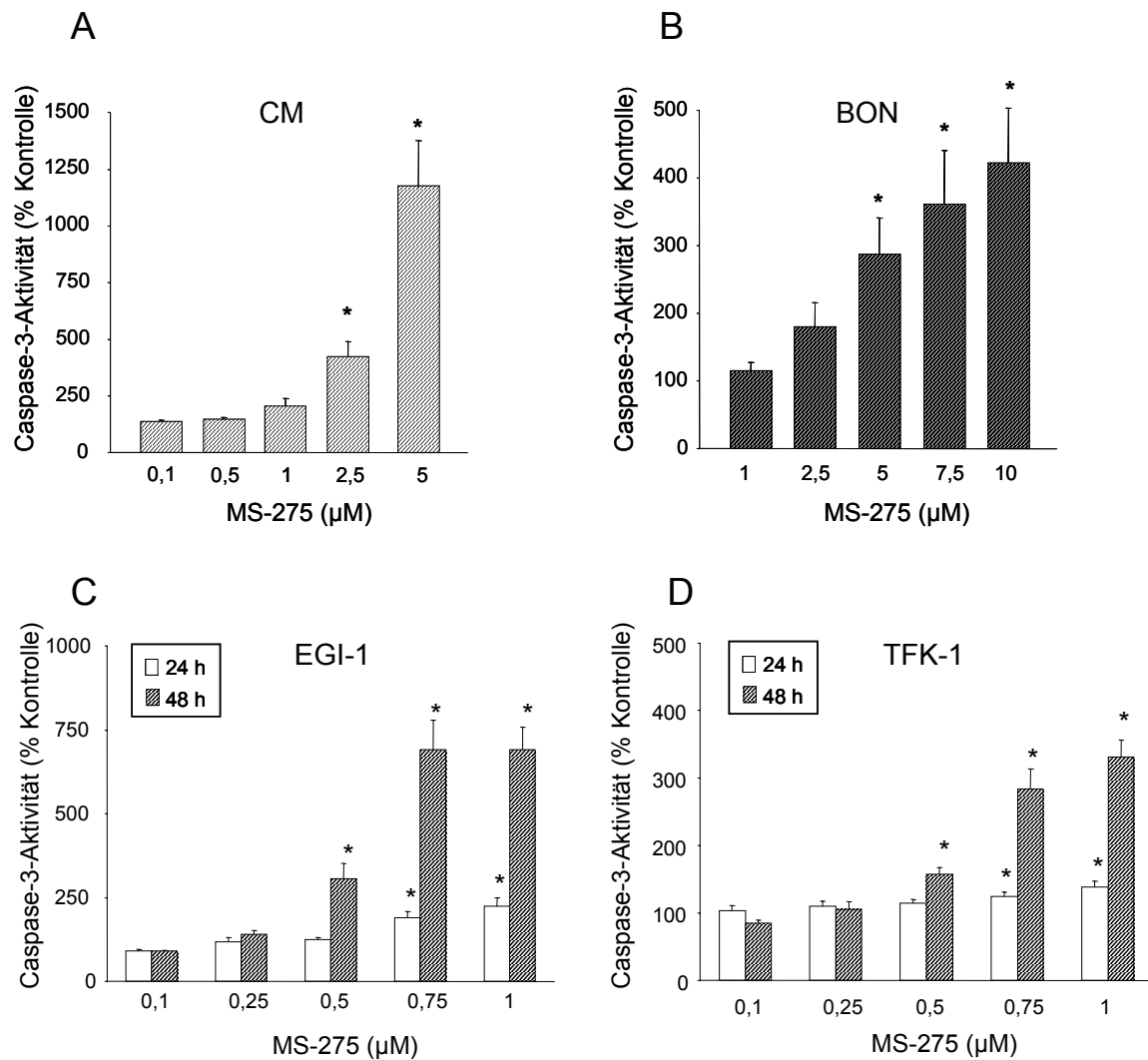


Abbildung 3-24: MS-275-induzierte Caspase-3-Aktivierung.

Die Behandlung der Zellen mit MS-275 führte nach einer 24-stündigen und/oder 48-stündigen Inkubation zu einer dosisabhängigen Zunahme der Caspase-3-Aktivität bei NET-Zellen (**A,B**) und CCC-Zellen (**C,D**). Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen je Zelllinie \pm SEM. Die Caspase-3-Aktivität des jeweiligen Kontrollansatz wurde auf 100 % gesetzt. * $p < 0,05$.

Analoge Untersuchungen zur Caspase-3-Aktivierung durch Trichostatin A und Natriumbutyrat wurden an BON- und CM-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich dabei für beide HDAC-Inhibitoren eine dosisabhängige, signifikante Zunahme der Caspase-3-Aktivität (**Abb. 3-25**). Insgesamt war die Aktivierung der Caspase-3 durch TSA und NaB in den schnell wachsenden CM-Zellen wiederum ausgeprägter als bei den moderat wachsenden BON-Zellen.

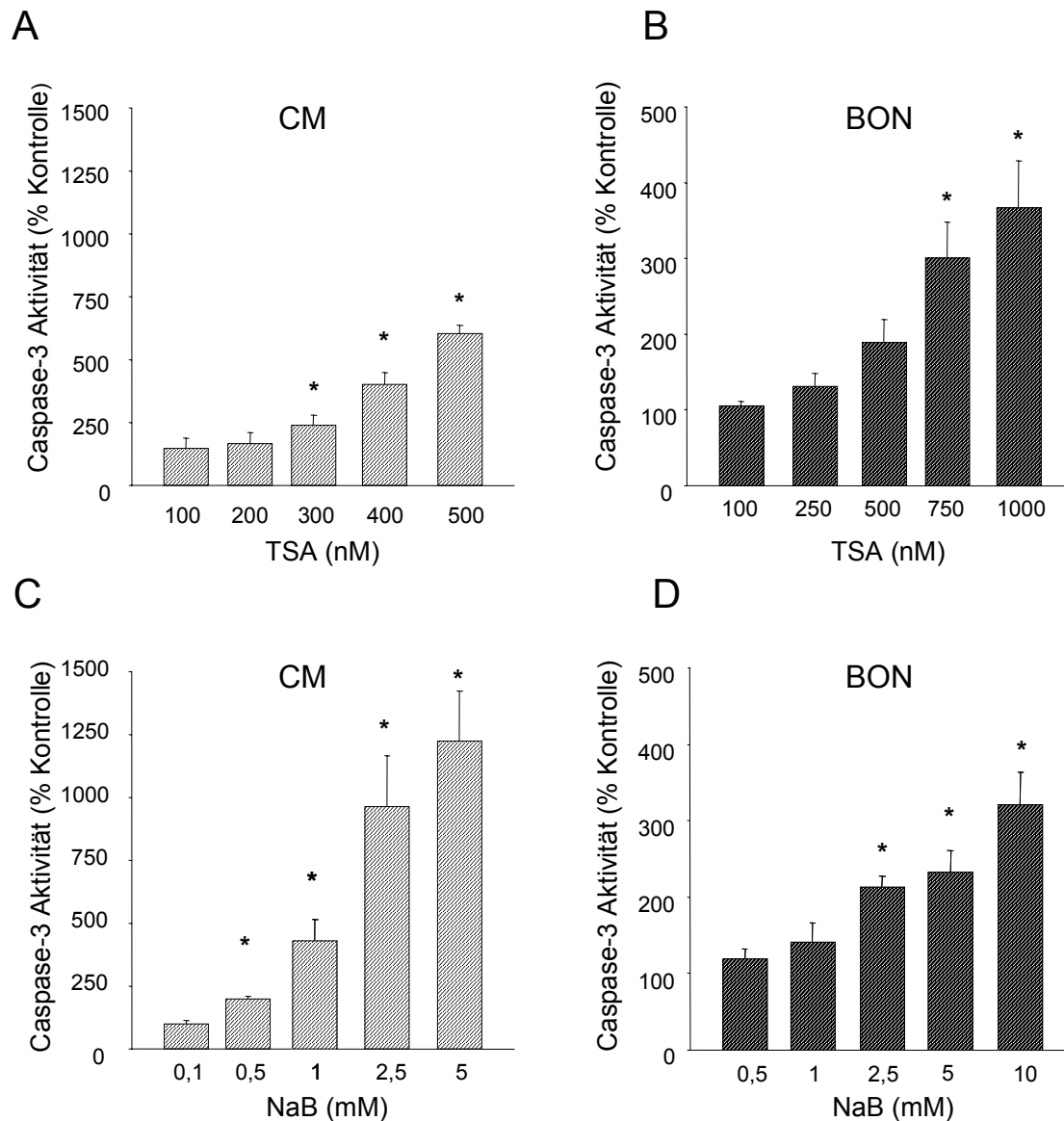


Abbildung 3-25: TSA- und NaB-induzierte Caspase-3-Aktivierung.

Die Behandlung der Zellen mit TSA (A,B) oder NaB (C,D) führte nach einer 24-stündigen Inkubation zu einer dosisabhängigen Zunahme der Caspase-3-Aktivität bei NET-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen je Zelllinie \pm SEM. Die Caspase-3-Aktivität der jeweiligen Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.* $p < 0,05$.

DNA-Fragmentierung

Als nächster Schritt sollte die Apoptoseinduktion durch die HDAC-Inhibitoren anhand der Fragmentierung der DNA verifiziert werden. Die DNA-Fragmentierung ist ein irreversibler Schritt im apoptotischen Programm, der in einem späten Stadium der Apoptose erfolgt. Der Nachweis der DNA-Fragmentierung erfolgte anhand einer charakteristischen Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von ca. 180 bp oder Vielfachen davon (DNA-Leiter) im Agarosegel.

MS-275 (CM: 5 μ M, BON: 10 μ M) und Trichostatin A (CM: 500 nM, BON: 1000 nM) induzierten nach 24-stündiger Inkubation sowohl in CM- als auch in BON-Zellen eine apoptosespezifische Fragmentierung der DNA. Das Ausmaß der DNA-Fragmentierung war dabei für beide HDAC-Inhibitoren sehr ähnlich. Insgesamt war die DNA-Fragmentierung in den CM-Zellen ausgeprägter als in BON-Zellen und korrelierte mit der in den Zellen gemessenen Caspase-3-Aktivität (**Abb. 3-26**).

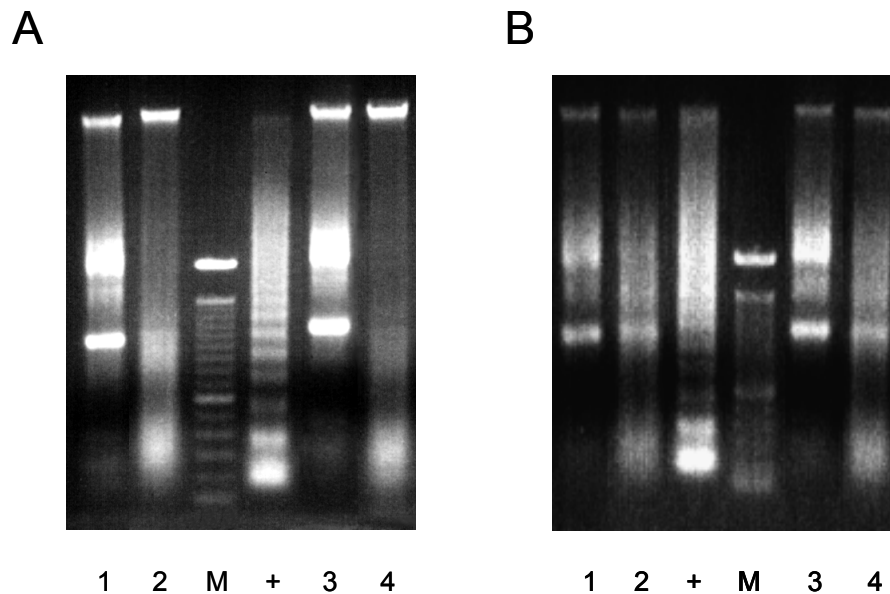


Abbildung 3-26: MS-275- und TSA-induzierte DNA Fragmentierung. Exemplarische Darstellung einer MS-275- (**A**) bzw. einer TSA-induzierten DNA-Fragmentierung (**B**) bei NET-Zellen. Die Inkubation der CM- bzw. BON-Zellen mit MS-275 oder TSA für 24 Std. verursachten jeweils eine apoptosespezifische DNA-Fragmentierung der zellulären DNA ($n = 3$ unabhängige Experimente). **A:** 1: CM unbehandelt, 2: CM + 5 μ M MS-275, M: 100 bp Marker, +: Positivkontrolle, 3: BON unbehandelt, 4: BON + 10 μ M MS-275. **B:** 1: CM unbehandelt, 2: CM + 500 nM TSA, +: Positivkontrolle, M: 100 bp Marker, 3: BON unbehandelt, 4: BON + 1000 nM TSA..

Expression von apoptoserelevanten Proteinen

Um die Auswirkungen der HDAC-Inhibition durch MS-275 auf die Expression apoptoserelevanter Proteine zu untersuchen, wurden die hier untersuchten gastrointestinalen Tumorzelllinien mit steigenden Konzentrationen an MS-275 (0,1-10 μ M) inkubiert und die Expression der pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie, Bax und Bcl-2 mittels Western Blot analysiert. Interessanterweise zeigten sich hier zelltypspezifische Unterschiede bei der Regulation/Modulation der Proteinexpression von Bax und Bcl-2. Während die Expression von antiapoptotischen Bcl-2 in allen vier Zelllinien dosisabhängig herunterreguliert wurde, war die Expression von proapoptotischem Bax in den CCC-Zelllinien EGI-1 und TFK-1 hochreguliert. Bei den NET-Zelllinien BON und CM blieb die Bax-Proteinexpression dagegen unverändert (**Abb. 3-27**).

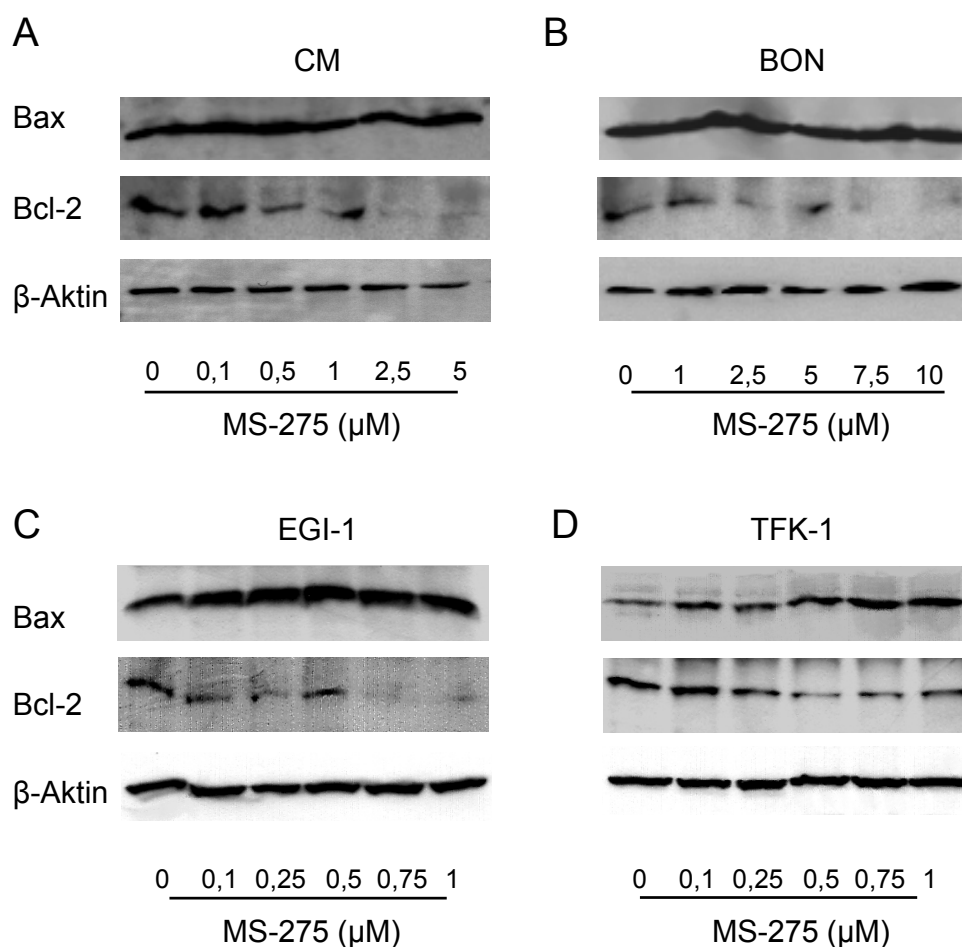


Abbildung 3-27: Regulation der Expression apoptoserelevanter Proteine.

Der Einfluss der MS-275-Behandlung auf die Expression von apoptoserelevanten Proteinen der Bcl-2-Familie wurde mittels Western Blot Analysen untersucht. Eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit aufsteigenden MS-275-Konzentrationen führte in NET-Zellen zu einer Suppression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2, während die Expression des proapoptotischen Bax unverändert blieb (A,B). Bei den CCC-Zellen bewirkte die MS-275-Behandlung sowohl eine Suppression des Bcl-2-Proteins als auch eine verstärkte Expression an Bax (C,D). Exemplarisch gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von $n = 3$ unabhängigen Experimenten. β -Aktin diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.2.4 Zellzyklusregulation durch HDAC-Inhibitoren

Um zu überprüfen, inwieweit die Inhibition von Histondeacetylasen durch MS-275, TSA oder NaB den Zellzyklus von gastrointestinalen Tumoren moduliert, wurden durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen durchgeführt.

Der HDAC-Inhibitor MS-275 (0,1-10 μ M) bewirkte bei allen vier gastrointestinalen Zellen nach 24-stündiger Inkubation einen signifikanten, dosisabhängigen Arrest der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (Abb. 3-28). Der Anteil der Zellen in der S-Phase nahm entsprechend ab. Außerdem führten höhere MS-275-Konzentrationen teilweise zu einem zusätzlichen G2/M-Arrest, der bei den BON- und TFK-1-Zellen ebenfalls signifikant war (Abb. 3-28, B,D). Die CM- und EGI-1-Zellen zeigten dagegen keinen eindeutigen G2/M-Arrest (Abb. 3-28, A,C).

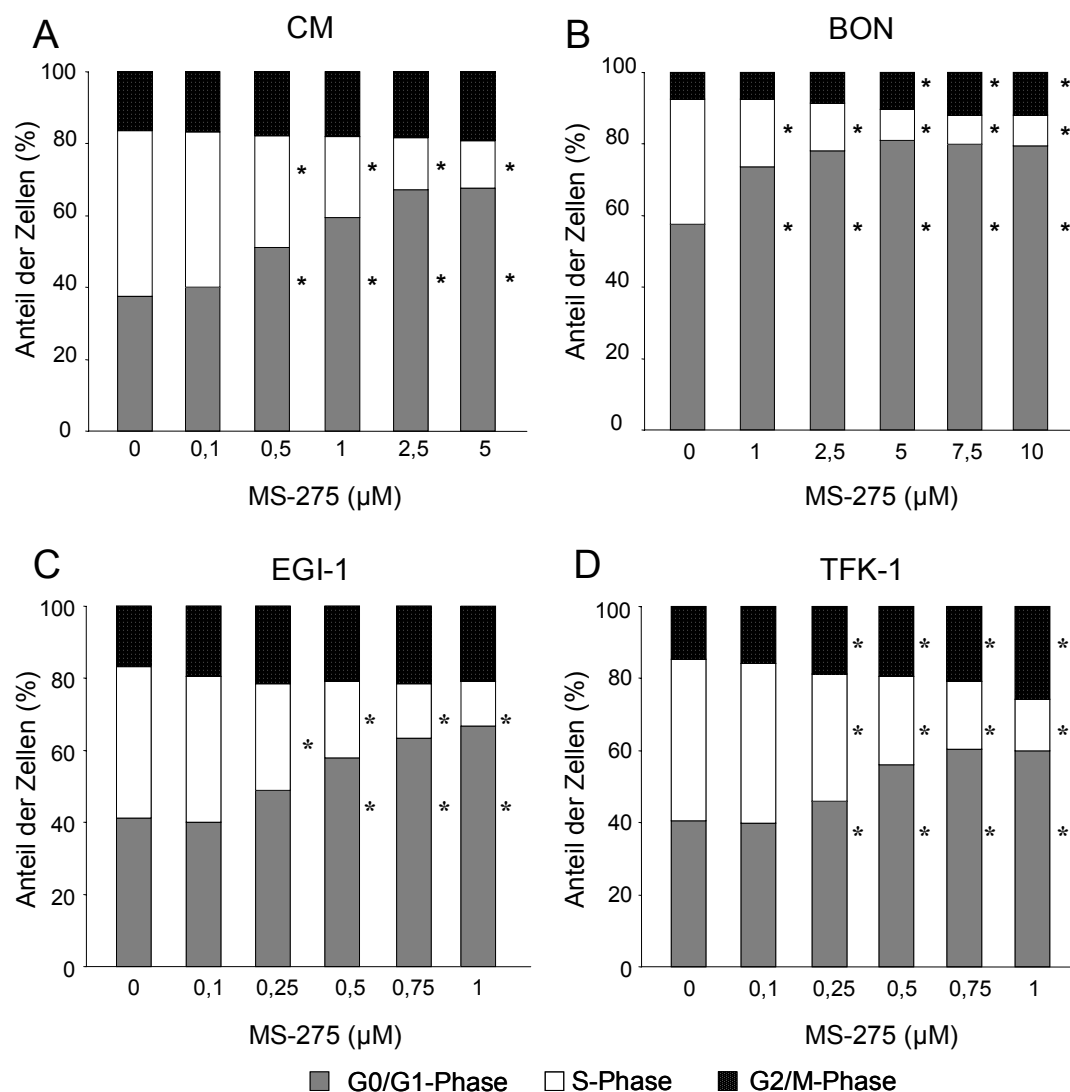


Abbildung 3-28: Zellzyklusregulation durch MS-275. Die Inkubation der Zellen für 24 Std. mit aufsteigenden MS-275-Konzentrationen führte zu einem signifikanten G0/G1-Arrest bei allen vier gastrointestinalen Zelllinien und zu einem zusätzlichen, signifikanten G2/M-Arrest bei BON- (B) und TFK-1-Zellen (D). Der Anteil der Zellen in der S-Phase nahm bei allen untersuchten Zelllinien ab. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen. * p<0,05

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den beiden weiteren untersuchten HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (100-1000 nM) und Natriumbutyrat (0,1-10 mM) war ein Arrest in der G1-Phase und teilweise auch in der G2/M-Phase des Zellzyklus zu beobachten. Im Gegensatz zu MS-275 war für TSA und NaB keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung bei dem G1-Arrest festzustellen. Mittlere TSA- bzw. NaB-Konzentrationen führten zu dem höchsten Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase, während höhere TSA- bzw. NaB-Konzentrationen eine Zunahme der S-Phase (CM-Zellen) oder der G2/M-Phase (BON-Zellen) bewirkten (Abb. 3-29).

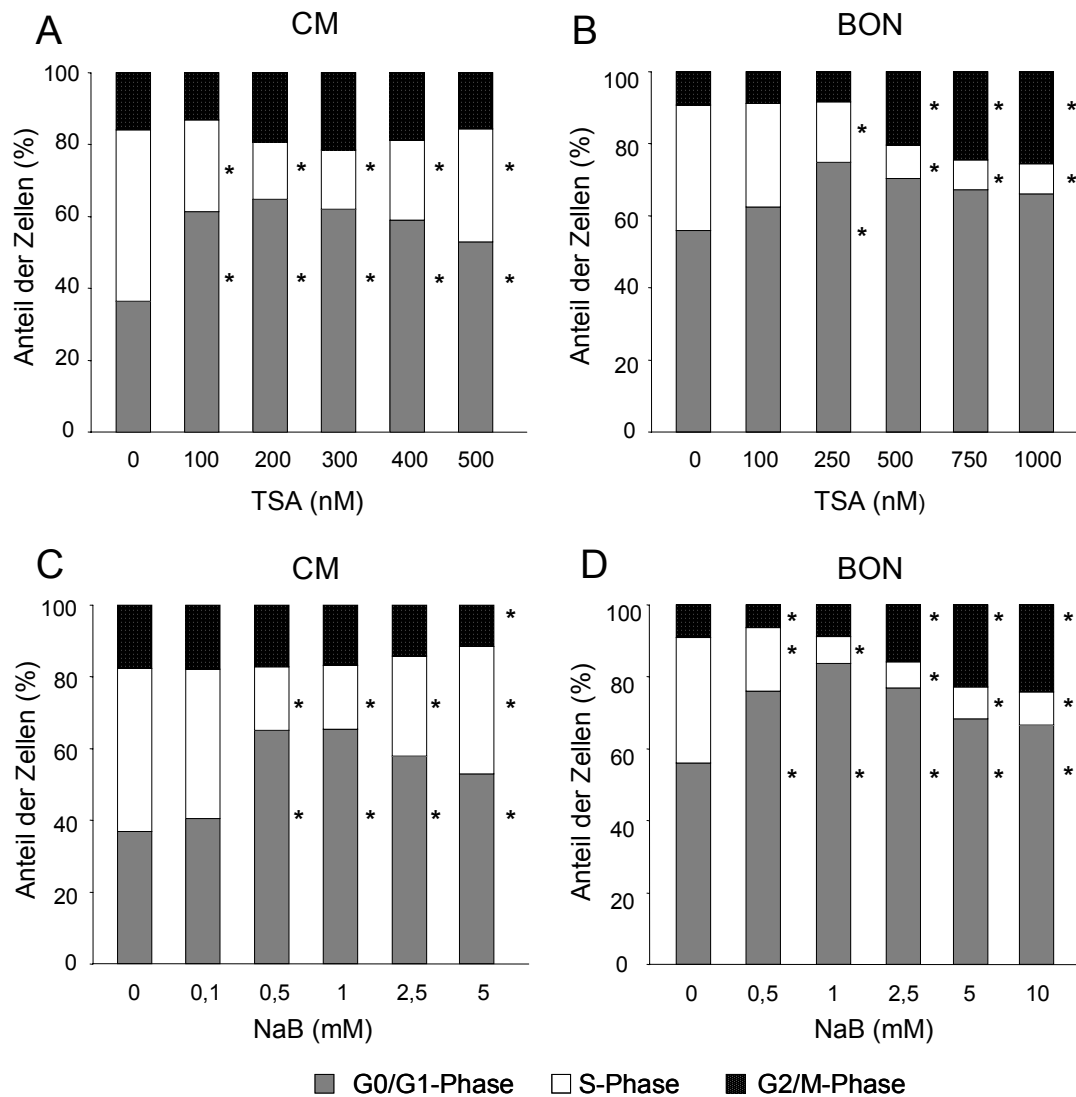


Abbildung 3-29: Zellzyklusregulation durch TSA oder NaB.

Die Inkubation der Zellen für 24 Std. mit aufsteigenden Konzentrationen an TSA (A,B) oder NaB (C,D) führten zu einem signifikanten G0/G1-Arrest bei NET-Zellen. Hohe Konzentrationen an TSA bzw. NaB bewirkten außerdem einen zusätzlichen, signifikanten G2/M-Arrest bei den BON-Zellen (B,D). Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n = 4$ unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$

Expression von zellzyklusrelevanten Proteinen

Die Veränderungen in der Proteinexpression verschiedener Zellzyklusregulatoren wurde anhand der Expressionsänderung von Cyclin D1 sowie der cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKI) $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ und $p27^{\text{Kip1}}$ (vgl. **Kap. 3.1.6**) mittels Western Blot analysiert. Wie aus **Abb. 3-30** hervorgeht, bewirkte die Inkubation mit MS-275 (0,1-10 μM) eine deutlich sichtbare Induktion von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ in allen vier Zelllinien. Bei den NET-Zelllinien BON und CM führte die Behandlung der Zellen mit MS-275 außerdem zu einer Induktion von $p27^{\text{Kip1}}$ bei gleichzeitiger Abnahme der Cyclin D1-Expression. Bei den CCC-Zellen EGI-1- und TFK-1 blieb die $p27^{\text{Kip1}}$ - und die Cyclin D1-Expression dagegen unverändert (**Abb. 3-30**).

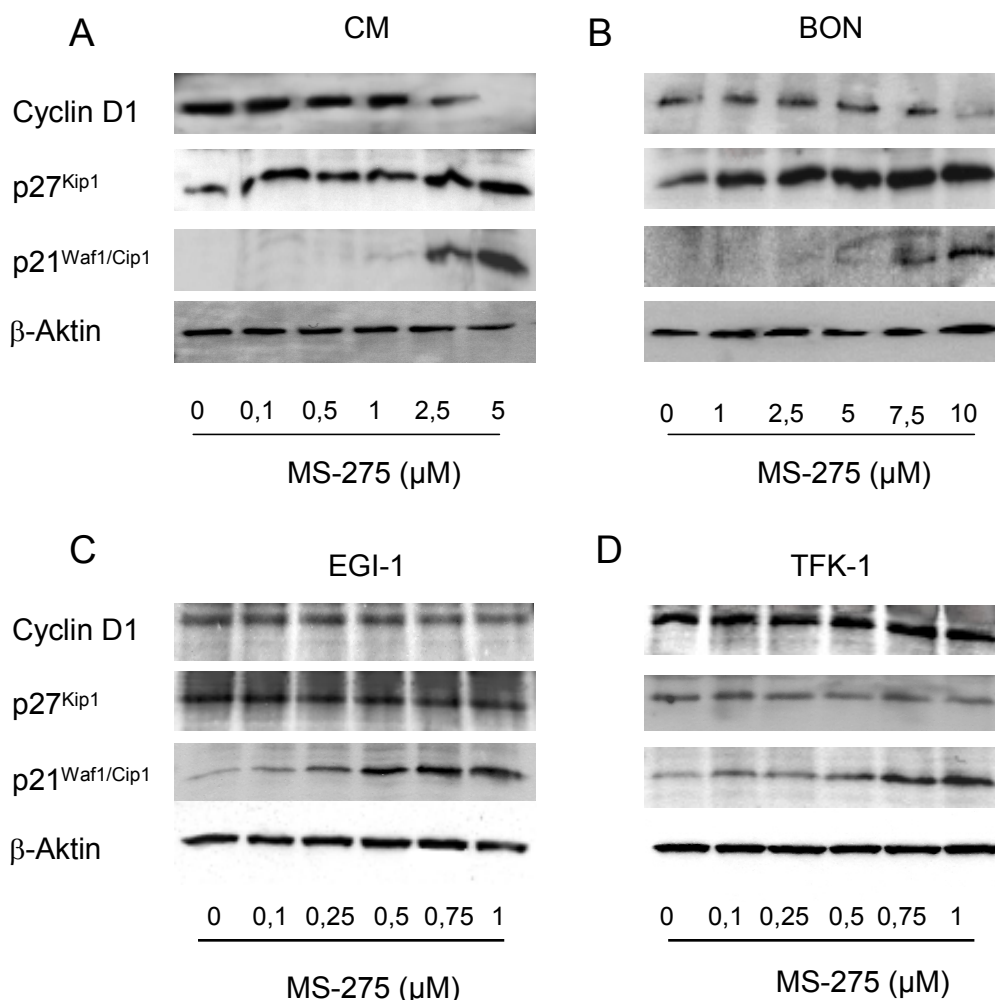


Abbildung 3-30: MS-275 moduliert die Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen.

Der Einfluss der MS-275-Behandlung auf die Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen wurde mittels Western Blot Analysen untersucht. Eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit steigenden MS-275-Konzentrationen führte in neuroendokrinen Tumorzellen CM (A) und BON (B) zu einer Suppression des Zellzykluspromotors Cyclin D1, während die Expression der CDKI p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} hochreguliert wurde. Bei den Cholangiokarzinomzellen EGI-1 (C) und TFK-1 (D) bewirkte die MS-275-Behandlung eine Induktion des p21^{Waf1/Cip1}, während die Expression von p27^{Kip1} und Cyclin D1 unverändert blieb. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von n = 3 unabhängigen Experimenten. β-Aktin diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung.

Da höhere HDAC-Inhibitor-Konzentrationen bei den TSA- bzw. NaB-behandelten BON-Zellen einen zusätzlichen G2/M-Arrest induzierten, wurde außerdem die Proteinexpression von Cyclin B1 untersucht, welches eine entscheidende Rolle bei dem Übergang der Zellen von der G2- in die M-Phase spielt. Die Inkubation von BON-Zellen für 24 Std. mit TSA bzw. NaB führte zu einer deutlichen Verminderung der Expression von Cyclin B1. In Übereinstimmung mit dem beobachteten G2/M-Arrest der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigte sich nur bei den höheren TSA- (500-1000 nM) bzw. NaB-Konzentrationen (5-10 mM) eine verminderte Cyclin B1-Expression (Abb. 3-31).

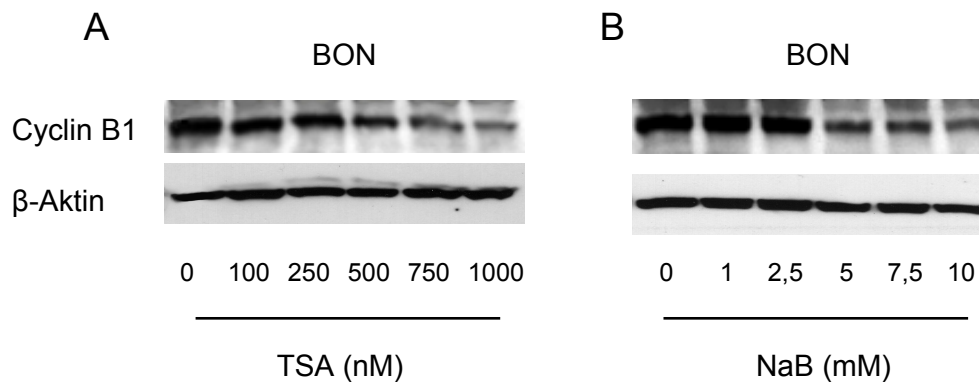


Abbildung 3-31: TSA und NaB modulieren die Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen. Der Einfluss einer TSA- (A) bzw. einer NaB-Behandlung (B) auf die Expression des Cyclin B1 bei BON-Zellen, wurde mittels Western Blot Analysen untersucht. 500-100 nM TSA bzw. 5-10 mM NaB führten nach 24-stündiger Inkubation zu einer Suppression des Zellzykluspromoters Cyclin B1. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von $n = 3$ unabhängigen Experimenten. β -Aktin diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.2.5 Steigerung der antiproliferativen Effektivität von HDAC-Inhibitoren durch kombinationstherapeutische Ansätze

Im Anschluss an die Charakterisierung der antiproliferativen Eigenschaften von HDAC-Inhibitoren als Monosubstanz sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, inwieweit sich die getesteten HDAC-Inhibitoren für kombinationstherapeutische Behandlungen von gastrointestinalen Tumoren eignen. Es sollte dabei anhand von Proliferationsstudien überprüft werden, ob die Kombination von HDAC-Inhibitoren mit konventionellen Zytostatika oder anderen Antitumormedikamenten zu einer Verstärkung antineoplastischer Effekte führt.

3.2.5.1 Wachstumshemmung durch HDAC-Inhibitoren in Kombination mit Somatostatinen oder Zytostatika

Der HDAC-Inhibitor MS-275 in Kombination mit Somatostatin oder Octreotid

Die bei funktionellen gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren typischen Hypersekretionssyndrome können durch den Einsatz von Somatostatinen bzw. stabilen Somatostatinanaloga effektiv kontrolliert werden. Daher sollten Somatostatin und das in der Klinik weit verbreitete Somatostatinanalogon Octreotid hinsichtlich ihrer antiproliferativen Kombinationswirkung zusammen mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 überprüft werden.

Nach 72-stündiger Inkubation von BON und CM Zellen mit sub IC_{50} -Konzentrationen an MS-275 in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen an Somatostatin-14 (0-1000 nM) bzw. Octreotid (0-1000 nM) zeigte sich allerdings bei beiden neuroendokrinen

Zelllinien, dass weder Somatostatin-14 noch Octreotid die antiproliferativen Effekte von MS-275 verstärken konnten bzw. sich keine additiven antiproliferativen Effekte ergaben (**Abb. 3-32**).

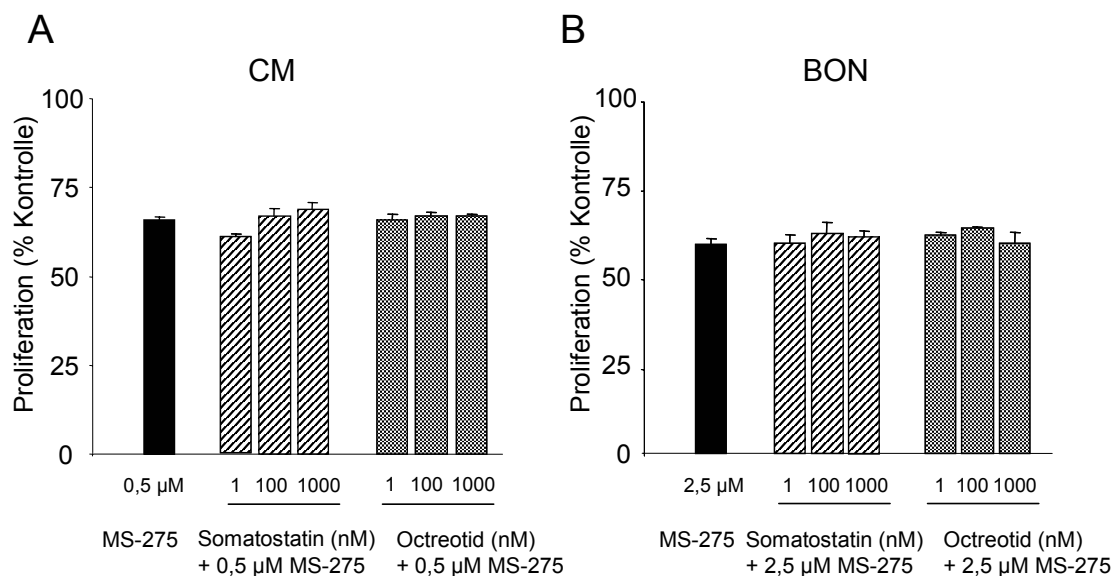


Abbildung 3-32: MS-275 in Kombination mit Somatostatin-14 oder Octreotid bei NET-Zellen.

NET-Zellen wurden für 72 Std. mit steigenden Konzentrationen an Somatostatin-14 oder Octreotid in Kombination mit jeweils 0,5 µM MS-275 bei CM-Zellen (**A**) und 2,5 µM MS-275 bei BON-Zellen (**B**) behandelt. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen ± SEM.

Der HDAC-Inhibitor MS-275 in Kombination mit Zytostatika

Die Kombination von HDAC-Inhibitoren mit Zytostatika zeigte bereits für andere, nicht-gastrointestinale Tumorentitäten, wie z.B. Brustkrebs oder Glioblastome, eine Wirkungsverstärkung der antiproliferativen Effekte.

In dieser Arbeit sollte die Kombination des HDAC-Inhibitors MS-275 mit zwei Zytostatika, die üblicherweise zur Chemotherapie fortgeschrittener cholangiozellulärer Karzinome eingesetzt werden, untersucht werden. Dazu wurden Kombinationsexperimente mit MS-275 (0,5 µM) und dem Topoisomerase-II-Inhibitor Doxorubicin (0-100 nM) oder mit dem Antimetaboliten Gemcitabin (GemzarTM) (0-500 nM) an CCC-Zellen durchgeführt.

Nach 2-tägiger Inkubation der CCC-Zellen EGI-1 und TFK-1 wurde in beiden Kombinationsansätzen eine Wirkungsverstärkung beobachtet (**Abb. 3-33**). Obwohl die Sensitivität der EGI-1- und der TFK-1-Zellen gegenüber Gemcitabin sehr unterschiedlich war, führte die Kombination von Gemcitabin mit MS-275 in beiden Zelllinien zu einer additiven Wirkungsverstärkung (**Abb. 3-33, A,B**). Die Kombination von Doxorubicin

mit MS-275 führte ebenfalls zu einer additiven Wirkungsverstärkung in beiden Zelllinien (Abb. 3-33, C,D).

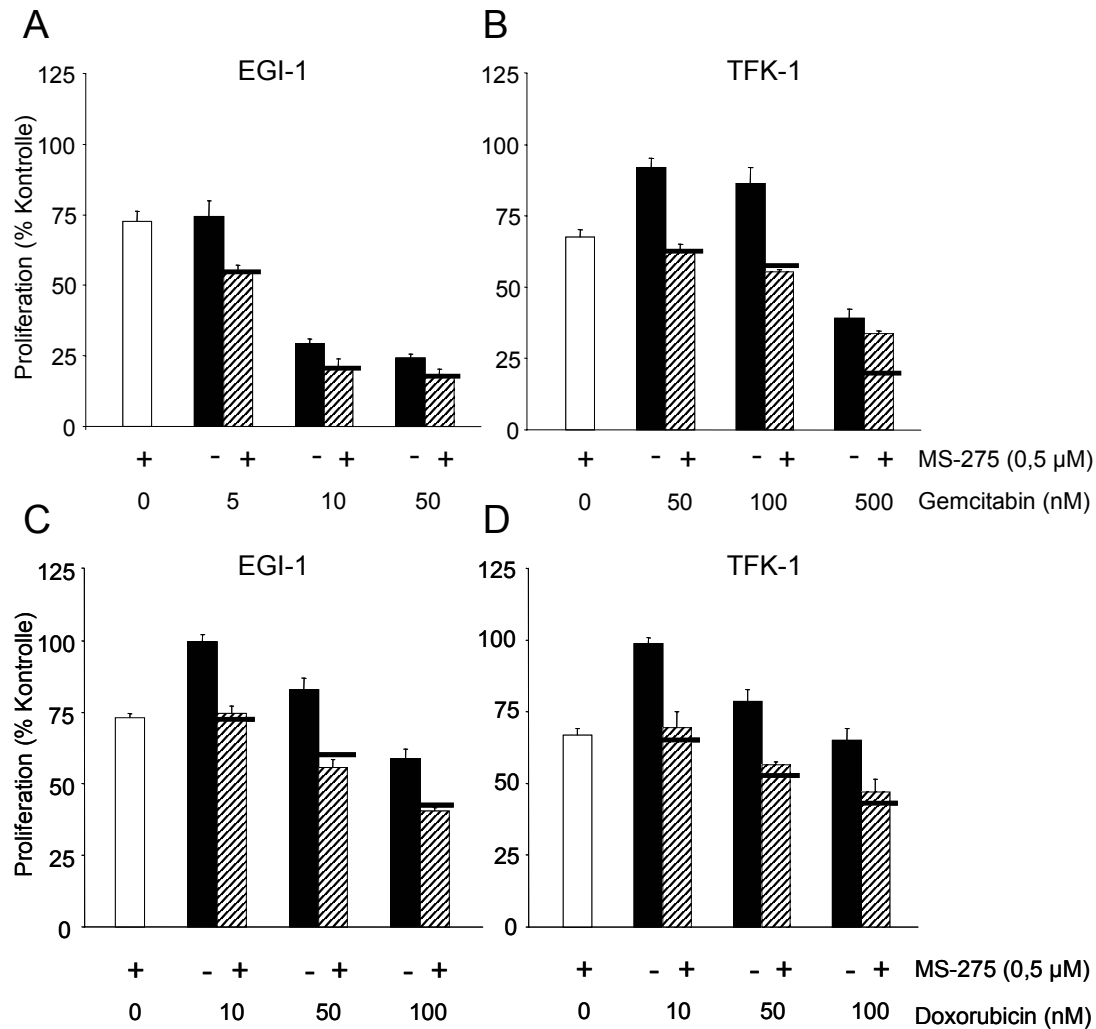


Abbildung 3-33: MS-275 in Kombination mit Gemcitabin oder Doxorubicin bei CCC-Zellen.

CCC-Zellen wurden für 48 Std. mit steigenden Konzentrationen an Gemcitabin (A,B) oder Doxorubicin (C,D) allein oder in Kombination mit jeweils 0,5 μM MS-275 behandelt. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Die rechnerische additive Wachstumsinhibition der jeweiligen Kombination ist als schwarzer Querbalken angezeigt. Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen ± SEM.

3.2.5.2 Wachstumshemmung durch HDAC-Inhibitoren in Kombination mit Sorafenib oder Bortezomib

Sorafenib (NexavarTM) ist ein Multi-Kinase-Inhibitor, der in erster Linie die Raf-Kinase des Ras-Raf-MAP-Kinase-Wegs inhibiert (vgl. **Kap. 1.3.3**) und damit die Proliferation von Tumorzellen vermindert. Die antineoplastische Potenz von Sorafenib in cholangiozellulären Karzinomzellen wurde kürzlich in einer anderen Arbeit der Arbeitsgruppe nachgewiesen (Huether et al., 2007).

Um zu überprüfen, inwieweit eine kombinierte Behandlung von EGI-1 und TFK-1 Zellen mit MS-275 und Sorafenib zu einer Wirkungsverstärkung führt, wurden die Zellen für 2 Tage mit MS-275 (0,25-0,5 μ M) und Sorafenib (1-5 μ M) inkubiert. Es zeigte sich in beiden Zelllinien eine additive bis überadditive antiproliferative Wirkung, die bei TFK-1-Zellen bis zu 10 % und bei EGI-1-Zellen bis zu 20 % höher war als die rechnerische additive Wachstumsinhibition (**Abb. 3-34, A,B**).

Ähnlich viel versprechende Ergebnisse zeigten sich bei den Kombinationsansätzen von MS-275 mit dem Proteasominhibitor Bortezomib (VelcadeTM). Zunächst wurde die alleinige Wirkung von Bortezomib auf die Proliferation von CCC-Zelllinien ermittelt. Nach 2-tägiger Inkubation der Zellen mit Bortezomib (0-10 nM) wurde das Wachstum von TFK-1- und EGI-1-Zellen um bis zu 65 % bzw. 84 % reduziert. Die Kombination von Bortezomib mit MS-275 (0,5 μ M) zeigte in beiden Zelllinien eine synergistische Wirkungsverstärkung. Die Co-Applikation von 0,5 μ M MS-275 und 10 nM Bortezomib führte nach 2-tägiger Inkubation sowohl bei EGI-1- und TFK-1-Zellen zu einer annähernd 100 %-igen Reduktion der Zellzahl (**Abb. 3-34, C, D**).

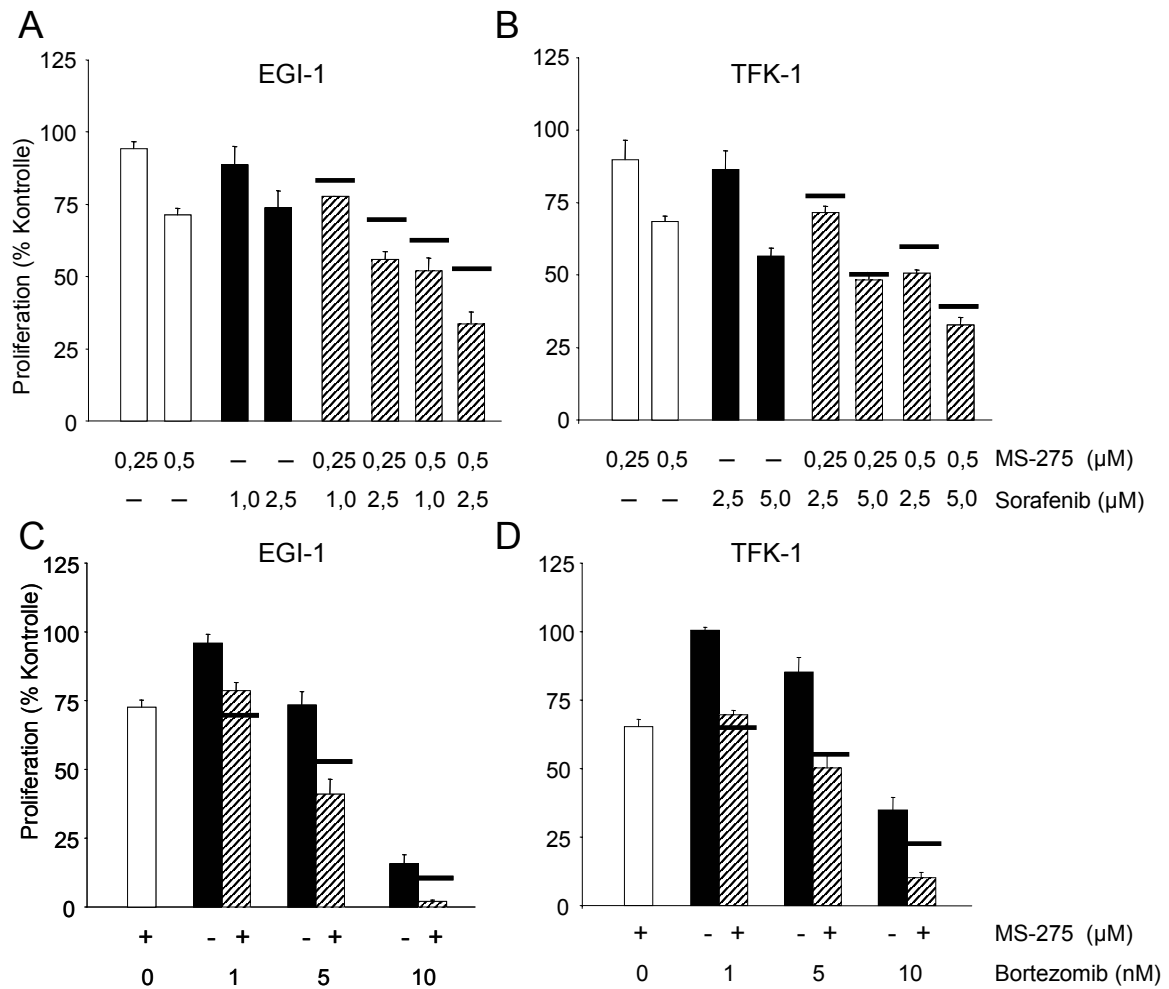


Abbildung 3-34: MS-275 in Kombination mit Sorafenib oder Bortezomib bei CCC-Zellen.

CCC-Zellen wurden für 48 Std. mit steigenden Konzentrationen an Sorafenib (A,B) oder Bortezomib (C,D) allein oder in Kombination mit jeweils 0,25 und/oder 0,5 μM MS-275 behandelt. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Die rechnerische additive Wachstumsinhibition der jeweiligen Kombination ist als schwarzer Querbalken angezeigt. Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Versuchen ± SEM.