

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Neue Therapieansätze zur Behandlung fortgeschrittener gastrointestinaler Tumore

Die bisherigen Therapiemöglichkeiten zur Behandlung fortgeschrittener gastrointestinaler Tumore sind unzureichend. Daher sind neue Therapieansätze erforderlich, die im Gegensatz zu konventionellen und eher unselektiven Behandlungsmethoden eine zielgerichtete und selektive Abtötung der Tumorzellen ermöglichen und gleichzeitig ein geringes Nebenwirkungsspektrum aufweisen.

Durch die zunehmenden Kenntnisse der molekularen Genese von Tumorerkrankungen sowie der Entschlüsselung von Resistenzmechanismen wurden in den letzten Jahren vermehrt antineoplastische Wirkstoffe entwickelt, die sich selektiv und spezifisch gegen tumorspezifische Zielstrukturen richten.

Zu den viel versprechenden Zielstrukturen der molekularen Tumorthapie zählen Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, da sie das Wachstum der Tumore maßgeblich stimulieren. Der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGF-1R) ist aus verschiedenen Gründen besonders interessant für die zielgerichtete Tumorthapie von gastrointestinalen Tumoren. Erstens ist durch eine Vielzahl von Untersuchungen bekannt, dass das IGF-1-Rezeptor-System und insbesondere der IGF-1-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung, der Proliferation und der Ausbreitung verschiedener Tumorarten spielen (Baserga 2000; Wang und Sun 2002; Wang et al., 2003). Zweitens ist der IGF-1-Rezeptor bei vielen gastrointestinalen Tumoren, wie z.B. Kolon-, Magen-, Leber- und neuroendokrinen Tumoren überexprimiert oder besitzt eine unphysiologisch hohe Aktivität (Wulbrand et al., 2000; Ouban et al., 2003). Eine erhöhte IGF-1R-Expression wird häufig im fortgeschrittenen Krankheitsstadium beobachtet und ist mit verkürztem Überleben, Metastasierung sowie Tumor-Dedifferenzierung verbunden (Scharf und Braulke, 2003; Yao et al., 2003; Fottner et al., 2004).

Neben den Wachstumsfaktorrezeptoren zählen Histondeacetylasen zu den erfolgsversprechenden neuen Zielstrukturen in der molekularen Tumorthapie. Die posttranslationalen Modifikationen von Histonen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gentranskription. Zunehmend wird deutlich, dass die Dysregulation von epigenetischen Prozessen eine transkriptionelle Repression von Genen verursacht, die im Zusammenhang mit molekularer Onkogenese stehen (Johnstone und Licht; 2003, Lin et al., 2006). Gerade in den letzten Jahren wurden deutliche Fortschritte erzielt, die die

Beziehungen zwischen aberranten epigenetischen Veränderungen und der Entstehung von Tumoren verdeutlichen (Marks et al., 2003; Miller et al., 2003; Marks et al., 2004). Zu den wichtigsten epigenetischen Regulatoren zählen die Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC), die durch enzymatische Aktivitäten den Acetylierungszustand der Histone kontrollieren (Acharya et al., 2005; Lin et al., 2006). Eine Dysregulation des fein balancierten Gleichgewichts zwischen Acetylierung und Deacetylierung ist damit sowohl für die Entstehung als auch für die Suppression maligner Neoplasien von außerordentlicher Bedeutung. Histondeacetylase-Inhibitoren gelten als viel versprechende neue „Biomodulatoren“, da sie durch eine Veränderung der transkriptionellen Regulation von Genen, Differenzierung, Wachstumsinhibition und Apoptose bei Tumorzellen auslösen können.

Ausgehend von diesen Vorkenntnissen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wirksamkeit einer Inhibition des insulinähnlichen Wachstumsfaktorrezeptors 1 (IGF-1R) sowie die Wirksamkeit einer epigenetischen Regulation durch Histondeacetylase-Inhibitoren bei verschiedenen gastrointestinalen Tumoren überprüft und die spezifische Wirkung der Inhibitoren näher charakterisiert werden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben erstmalig gezeigt, dass die Inhibition des IGF-1-Rezeptors durch spezifische IGF-1R-Tyrosinkinaseinhibitoren das Wachstum von neuroendokrinen Tumoren, hepatozellulären Karzinomen und kolorektalen Karzinomen hemmt. Weiterhin konnte auch durch die Inhibition der Histondeacetylaseaktivität durch verschiedene HDAC-Inhibitoren das Wachstum von den hier untersuchten gastrointestinalen neuroendokrinen und cholangiozellulären Tumoren gehemmt werden. In beiden Fällen war die antiproliferative Wirkung auf eine Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest zurückzuführen, während unspezifische, zytotoxische Effekte keine bedeutsame Rolle spielten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass beide Therapieansätze das Potenzial besitzen, die Wirkung konventioneller Zytostatika und anderer neuartiger antineoplastischer Tumormedikamente zu verstärken und sich daher auch für neue wirkungsvolle Kombinationstherapien eignen.

## **4.2 IGF-1-Rezeptor-Inhibition als innovatives Therapiekonzept für gastrointestinale Tumore**

### **4.2.1 Antiproliferative Wirkung des IGF-1-Rezeptor-Inhibitors NVP-AEW541 bei gastrointestinalen Tumorzelllinien**

Um den Einfluss einer IGF-1-Rezeptor-Inhibition auf das Zellwachstum von gastrointestinalen Tumoren zu untersuchen, wurden an insgesamt 6 Zelllinien von drei verschiedenen gastrointestinalen Tumorentitäten Wachstumsstudien durchgeführt. Der in präklinischen Testungen befindliche IGF-1R-Tyrosinkinaseinhibitor NVP-AEW541 zeigte bei allen untersuchten humanen gastrointestinalen Zelllinien eine zeit- und dosisabhängige Wachstumshemmung, die im mikromolaren Bereich lag (**Kap. 3.1.3, Tab. 3-2**). Es ließ sich dabei zum einen zwischen verschiedenen Tumorentitäten, zum anderen aber auch innerhalb einer Tumorentität eine unterschiedliche Sensitivität ermitteln, die sich in den unterschiedlich hohen halbmaximalen wachstumshemmenden Konzentrationen ( $IC_{50}$ ) an einzusetzendem NVP-AEW541 widerspiegelt. Diese Ergebnisse korrelieren mit Ergebnissen zur antiproliferativen Wirkung von NVP-AEW541 bei anderen soliden Tumoren, wie z.B. muskuloskeletale Tumore und Neuroblastome, bei denen ebenfalls eine sehr weite Bandbreite an unterschiedlichen Sensitivitäten sowohl zwischen verschiedenen als auch innerhalb einer Tumorentität ermittelt wurde. Die  $IC_{50}$ -Werte lagen dabei im submikromolaren bis mikromolaren Konzentrationsbereich (0,2-6,8  $\mu$ M) (Scotlandi et al., 2005; Tanno et al., 2006). Interessanterweise, zeigten die Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen der IGF-1R-Expression und der Sensitivität gegenüber NVP-AEW541 (Scotlandi et al., 2005).

Eine wichtige Einflussgröße für die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit IGF-1R-Inhibitoren scheint die Verdopplungszeit und somit die Proliferationsgeschwindigkeit zu spielen. So konnte in dieser Arbeit herausgearbeitet werden, dass schnell wachsende Zelllinienmodelle wie z.B. die Insulinomzelllinie CM mit einer Verdopplungsrate von  $21 \pm 1$  Std. eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber NVP-AEW541 zeigten als eine langsamer wachsende Zelllinie, wie z.B. die ebenfalls neuroendokrine Karzinomzelllinie BON, die eine Verdopplungszeit von  $34 \pm 4$  Std. aufweist.

Um eine unspezifische Schädigung von Zellmembranen abzuschätzen, wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten der NVP-AEW541 Behandlung durchgeführt (siehe **Kap. 3.1.4**). Es konnte für alle untersuchten Zelllinien

gezeigt werden, dass zytotoxische Effekte bei der Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors NVP-AEW541 keine bedeutsame Rolle spielen. Eine leichte bis mittlere Zunahme der LDH-Konzentration im Medium ließ sich erst nach 24-stündiger Inkubation mit NVP-AEW541 feststellen. Da diese stark mit dem durch den Wirkstoff ausgelösten Ausmaß an Apoptose korrelierte (siehe „Caspase-3-Aktivierung“, **Kap. 3.1.5**), liegt es nahe, dass das freigesetzte LDH aus spätapoptotischen Zellen stammt, die zu diesem Zeitpunkt bereits ihre Membranintegrität verloren haben. Hierbei handelt es sich um ein *in vitro*-Phänomen, da *in vivo* apoptotische Zellen durch Makrophagen eliminiert werden. Die Tatsache, dass NVP-AEW541 keine unspezifische Zytotoxizität induziert, ist sehr wichtig, da eine unspezifische Perforation von Zellmembranen durch zytotoxische Substanzen in der Regel zu Entzündungsreaktionen und damit zu unerwünschten Nebenwirkungen (z.B. Immunsuppression, Anämie, Erbrechen, Durchfall oder Haarausfall) führt. Außerdem unterstreicht es auch die Spezifität der IGF-1R-basierten Wachstumshemmung des NVP-AEW541.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die wachstumshemmende Wirkung von NVP-AEW541 hauptsächlich auf zwei Mechanismen beruht, zum einen auf der Induktion von Apoptose (**Kap. 3.1.5**) und zum anderen auf der Inhibition der Zellzyklusprogression (**Kap. 3.1.6**).

#### **4.2.2 Effekte des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 auf die Apoptose**

Da viele gastrointestinale Tumore durch genetische Alterationen im Zuge der Karzinogenese ihre Apoptosefähigkeit verlieren (Kim et al., 2003a; Kountouras et al., 2005) ist die Re-Initialisierung des apoptotischen Programms bei gastrointestinalen Tumoren von fundamentaler Bedeutung.

Die apoptoseinduzierende Wirkung des NVP-AEW541 für gastrointestinale neuroendokrine Tumore (NET), hepatozelluläre Karzinome (HCC) und kolorektale Karzinome (CRC) konnte in der vorliegenden Arbeit anhand verschiedener apoptosespezifischer Veränderungen demonstriert werden. Erste Anzeichen für die apoptoseinduzierende Wirkung des NVP-AEW541 lieferten die mikroskopischen Untersuchungen zur Zellviabilität, bei denen NVP-AEW541-behandelte Zellen im Unterschied zu den Kontrollzellen apoptosebedingte morphologische Veränderungen aufwiesen (siehe **Kap. 3.1.5**). Weiterhin ließ sich durch die funktionellen Untersuchungen zur Apoptose die Aktivierung der Caspase-3 und die Fragmentierung der DNA demonstrieren (siehe **Kap. 3.1.5**).

Da die Aktivierung der Effektorcaspase-3 sowohl mitochondrienabhängig als auch mitochondrienunabhängig erfolgen kann, wurden am Beispiel von HCC-Zellen mitochondriale Veränderungen untersucht.

NVP-AEW541-behandelte HCC-Zellen zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige Depolarisierung des Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_M$ ), wodurch sich die Beteiligung der Mitochondrien an der durch IGF-1R-Inhibition ausgelösten Apoptose belegen lässt (siehe **Kap. 3.1.5**). Im Gegensatz zu anderen Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass bei der mitochondrienvermittelten Apoptose eine Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran induziert wird, die häufig von einem transienten Anschwellen der mitochondrialen Matrix begleitet ist (Goldstein et al., 2000; Sutter et al., 2003; Sutter et al., 2004), konnte in den vorliegenden Untersuchungen keine ausgeprägte Zunahme des Mitochondrienvolumens festgestellt werden.

Gogvadze und Mitarbeiter zeigten hingegen, dass durch Beteiligung des proapoptotischen Bax-Proteins eine mitochondrienvermittelte Apoptose auch ohne Veränderung des Mitochondrienvolumens erfolgen kann (Gogvadze et al., 2001). Die Western Blot Analysen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten HCC-Zellen bestätigen diese Beobachtung, da die Behandlung der Zellen mit dem IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 zu einer dosisabhängigen Induktion der Bax-Expression führte (siehe **Kap. 3.1.5**). Außerdem wurde eine Suppression des antiapoptotischen und mitochondrial wirksamen Proteins Bcl-2 durch NVP-AEW541 festgestellt, wodurch die Beteiligung der Mitochondrien bei der Auslösung der Apoptose weiterhin belegt wird.

Eine mitochondrienvermittelte Apoptose konnte ebenfalls für NVP-AEW541-behandelte NET- und CRC-Zellen demonstriert werden. In Analogie zu den HCC-Zellen zeigte sich bei den Western Blot Analysen der NET- und CRC-Zellen eine Zunahme der Expression von proapoptotischem Bax und Abnahme von antiapoptotischen Bcl-2 (siehe **Kap. 3.1.5**).

Das antiapoptotische Protein Bcl-2 ist in vielen Tumoren überexprimiert (Takahashi et al., 1999) und ist mit einer schlechten Prognose und auch mit einer Resistenz gegenüber der Chemotherapie verbunden (Pratesi et al., 2001; Wang und Reed, 1998). Somit ist die hier beobachtete Suppression des Bcl-2 durch die IGF-1R-Inhibition ein wichtiger Faktor, der darauf hindeutet, dass mit einer IGF-1R Inhibition durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie NVP-AEW541 Resistenzmechanismen ausgeschaltet bzw. inhibiert werden können. Dies qualifiziert diesen neuen Ansatz im Besonderen auch für kombinationstherapeutische Ansätze, bei denen Zytostatikaresistenzen durch Co-

Applikation von IGF-1R-Inhibitoren möglicherweise aufgehoben bzw. reduziert werden können (siehe auch Kombinationsexperimente **Kap. 3.1.8.1**).

#### **4.2.3 Zellzyklusmodulierende Wirkung durch IGF-1R-Inhibition**

Eine fehlerhafte oder defekte Funktion der zellzyklusregulierenden Proteine ist einer der Hauptursachen für die Entstehung und Progression von Tumoren. So sind z.B. Zellzykluspromotoren wie Cyclin D1 häufig überexprimiert (Lu et al., 2005), während die cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKI) wie p21<sup>Waf1/Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> oft supprimiert werden (Hui et al., 1998). Daher ist die Beeinflussung/Modulierung der Expression von Zellzyklusregulatoren von großer Bedeutung für die Tumorthherapie.

Zellzyklusmodulierende Effekte durch die IGF-1R-Inhibition konnten bereits für verschiedene nicht-gastrointestinale Tumorentitäten gezeigt werden. So zeigte sich bei einer Reihe von soliden Tumoren, wie dem Prostatakarzinom oder Brust- und Lungentumoren eine Arretierung des Zellzyklus an dem G1/S-Kontrollpunkt durch die Inhibition des IGF-1-Rezeptor-Systems (Baserga, 1994; Mitsiades et al., 2004,a).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für neuroendokrine Tumore (NET), hepatozelluläre Karzinome (HCC) und kolorektale Karzinome (CRC) eine Arretierung des Zellzyklus am G1/S-Kontrollpunkt durch NVP-AEW541 demonstriert werden. Außerdem konnte am Beispiel der NET- und CRC-Zellen gezeigt werden, dass NVP-AEW541 die Expression der zellzyklusinhibierenden Proteine p21<sup>Waf1/Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> hochreguliert, während die Expression des Zellzykluspromoters Cyclin D1 supprimiert wurde (siehe **Kap. 3.1.6**).

Damit konnte für die hier untersuchten Tumorentitäten gezeigt werden, dass die Unterbrechung des IGF-1R-Signalwegs durch NVP-AEW54 einer unkontrollierten Zellzyklusprogression erfolgreich entgegenwirkt, indem es die Expression fehlerhaft regulierter Zellzyklusproteine moduliert, und so den kontrollierten Ablauf des Zellzyklus wiederherstellt.

Da viele Zytostatika zellzyklusabhängig bzw. phasenspezifisch wirken, ist der durch NVP-AEW541-induzierte G1-Arrest des Zellzyklus auch im Hinblick auf mögliche Kombinationstherapien von Bedeutung. Die Wirkung von phasenspezifischen Zytostatika, die in der G1-Phase des Zellzyklus wirken, könnte somit durch die Co-Applikation von IGF-1R-Inhibitoren optimiert werden.

#### 4.2.4 Regulation mitogener Signalwege durch IGF-1R-Inhibition

Viele Tumore, wie z.B. die neuroendokrinen Tumore, können IGF-1 selbst produzieren und freisetzen und damit ihr Wachstum über eine autokrine Wachstumsschleife selbst stimulieren (von Wichert et al., 2000). In diesem Kontext stellten von Wichert und Mitarbeiter bei serumfrei kultivierten BON-Zellen eine gesteigerte Aktivität des Ras-Raf-MAP-Kinase-Wegs fest, die sich u.a. in einer erhöhte Grundaktivität der extrazellulär regulierten Kinase ERK1/2 widerspiegelte (von Wichert et al., 2000).

Die Western Blot Analysen der vorliegende Arbeit zeigen in Übereinstimmung dazu ebenfalls eine sehr hohe Grundaktivität der ERK1/2, die sich durch die Stimulation mit exogenem IGF-1 noch verstärken ließ und damit den Einfluss des IGF-1R-Systems auf den Ras-Raf-MAPK-Signalweg demonstriert.

Die aktivierte Proteinkinase ERK1/2 stellt einen wichtigen Regulator der Genexpression dar. So wird durch den aktivierten Ras-Raf-MAPK-Weg unter anderem die Expression des Zellzykluspromoters Cyclin D1 induziert (Lavoie et al., 1996), während die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (McMillan et al., 2003; Zhu et al., 2004b) und p27<sup>Kip1</sup> (Cheng et al., 1998) supprimiert wird. Dagegen wird die Aktivierung verschiedener zytosolischer Caspasen (Erhardt et al., 1999) sowie verschiedener antiapoptotischer Faktoren durch die ERK1/2 supprimiert (Rubinfeld und Seger, 2005).

Da die Inkubation der BON-Zellen mit NVP-AEW541 zu einer dosisabhängigen Abnahme der ERK1/2-Aktivität führte, lässt sich damit die proapoptotische und zellzyklusarretierende Wirkung des NVP-AEW541 bei diesen Zellen erklären. Dasselbe gilt auch für die CRC-Zellen, bei denen ebenfalls die Aktivität des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs durch die IGF-1R-Inhibition mit NVP-AEW541 gehemmt wurde (siehe **Kap. 3.1.7**).

Neben dem Ras-Raf-MAPK-Signalweg, werden die Effekte des IGF-1R-Systems auch über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)-Signalweg vermittelt (Yamamoto et al., 1992; Vanhaesebroeck et al., 1997), der eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Proliferation und dem Überleben der Zellen spielt (Katso et al., 2001). Der Einfluss einer IGF-1R-Inhibition auf diesen mitogenen und antiapoptotischen Signalweg ließ sich anhand der Expression der Proteinkinase B (PKB/Akt) feststellen. Es zeigte sich am Beispiel der kolorektalen Karzinomzelllinien HT-29, dass NVP-AEW541 den PI3-K-Weg dosisabhängig herunterreguliert und somit zu einer verminderten Expression der PKB/Akt führt (siehe **Kap. 3.1.7**) Andere Arbeiten konnten den Einfluss einer IGF-1R-

Inhibition durch NVP-AEW541 auf die Aktivität des PI3-K-Wegs auch für Fibrosarkome und Neuroblastome bestätigen (Garcia-Echeverria et al., 2004; Tanno et al., 2006).

Zusammengenommen führen diese Beobachtungen zu dem Schluss, dass die Inhibition des IGF-1R durch NVP-AEW541 zu einer Unterbrechung bzw. Herunterregulierung des Ras-Raf-MAPK- und des PI3-K-Signalwegs führt und dadurch die Zellzyklusprogression und die Apoptosekaskade der Zelle reguliert.

#### **4.2.5 Der Einfluss einer IGF-1R-Inhibition durch NVP-AEW541 auf das Wachstum von Primärzellkulturen humaner gastrointestinaler Tumore**

Primärzellkulturen von humanen gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren und kolorektalen Karzinomen wurden angelegt, um eine Basis für eine individuelle medizinische Behandlung eines Patienten zu schaffen. Das Hauptziel war es, die antineoplastischen Effekte von NVP-AEW541 in einem „*bench to bedside*“ Ansatz zu testen, da die permanenten Zelllinien zwar ein gut geeignetes, aber keineswegs repräsentatives Modell darstellen.

Die Überprüfung der Effekte von NVP-AEW541 an den insgesamt 12 Primärzellkulturen gastrointestinaler Tumore konnte die ausgeprägte antiproliferative Wirkung des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 bestätigen (siehe **Kap. 3.1.3**). 10 von 12 Primärzellkulturen zeigten ein gutes Ansprechen auf die NVP-AEW541-Behandlung. Bei diesen Zellen war die Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollansätzen nach 3-tägiger Inkubation mit NVP-AEW541 im Durchschnitt um 50 % reduziert. Bei 2 Primärzellkulturen wurde dagegen eine Resistenz gegenüber NVP-AEW541 beobachtet.

Die individuellen Sensitivitätsunterschiede demonstrieren die Relevanz einer individuellen Testung zur Prädiktion des Ansprechens auf derartige zielgerichtete Therapien. Insofern stellt die hier vorgestellte Methode einer *ex vivo*-Testung eine einfache und praktikable Möglichkeit dar, um im Vorfeld einer Behandlung abschätzen zu können, ob ein individuelles Therapieansprechen zu erwarten ist.

#### **4.2.6 Kombinationstherapeutische Ansätze**

##### **4.2.6.1 IGF-1R Inhibition in Kombination mit konventionellen Zytostatika und Fluvastatin**

Die Reinitialisierung von Apoptose und die Induktion eines Zellzyklusarrests sind wichtige Eigenschaften eines erfolgsversprechenden Tumormedikaments. Zum einen wird die Apoptose im Gegensatz zu einer durch unspezifische und zytotoxische



Wirkstoffe hervorgerufenen Nekrose, nicht von unerwünschten immunologischen Reaktionen begleitet. Und andererseits bieten die apoptosesensibilisierenden und zellzyklusarretierenden Effekte vielfältige Möglichkeiten für wirkungsvolle Kombinationsbehandlungen.

Wirkstoffresistenzen sind eines der Hauptprobleme der Chemotherapie, die häufig zu einem Therapieversagen und damit zum Fortschreiten der Krankheit führen. Da mittlerweile bekannt ist, dass eine hohe IGF-1R-Expression das Ansprechen von Tumoren gegenüber vielen Zytostatika deutlich verschlechtert (LeRoith und Roberts, 2003; Baserga et al., 2003), sollte in weiteren Untersuchungen die kombinierte Wirkung von Zytostatika plus IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 evaluiert werden. Dazu wurden verschiedene Zytostatika ausgewählt, die in der Palliativtherapie der jeweiligen gastrointestinalen Therapie bereits etabliert sind. Bei den hepatozellulären Karzinomzellen wurden Zytostatika verwendet, die bei der transarteriellen Chemoembolisation zum Einsatz kommen, da bei diesen Tumoren die systemische Chemotherapie zumindest bei zugrunde liegender Leberzirrhose nicht etabliert ist.

Untersucht wurden Kombinationen mit Zytostatika, die einen unterschiedlichen Wirkmechanismus aufweisen: der Mikrotubuli-Inhibitor Docetaxel, der Topoisomerase-II-Inhibitor Doxorubicin, der aktive Metabolit des Topoisomerase-I-Inhibitors Irinotecan SN-38 sowie der Antimetabolit 5-Fluorouracil (5-FU).

In einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass bei hepatozellulären Karzinomzellen (HCC) die Behandlung mit Docetaxel bzw. Doxorubicin zu einer Induktion von Apoptose durch Caspase-3 Aktivierung führt, während SN-38 keine Aktivierung der Caspase-3 induzierte (Huether et al., 2005). Da die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bei den HCC-Zellen eine ausgeprägte Aktivierung der Caspase-3 durch NVP-AEW541 demonstrierten (siehe **Kap. 3.1.5**), könnte dies die beobachtete synergistische Wirkung von NVP-AEW541 mit Docetaxel bzw. Doxorubicin bei den HCC-Zellen erklären, während die Kombination NVP-AEW541/SN-38 keine synergistische Wirkungsverstärkung zeigte. Eine synergistische Wachstumsinhibition für den Kombinationsansatz NVP-AEW541/Doxorubicin konnte auch für die neuroendokrinen BON-Zellen bestätigt werden. Die kombinierte Behandlung von BON-Zellen mit NVP-AEW541 und 5-FU verstärkte zwar die Einzelwirkung von NVP-AEW541 und 5-FU, führte aber zu keiner additiven bzw. synergistischen Wirkung. Bei den beiden kolorektalen Karzinomzellen (CRC) ließ sich dagegen eine additive Wirkung der NVP-AEW541/5-FU-Kombination feststellen,

wodurch ein zelltypspezifisches Ansprechverhalten sichtbar wird. Dies wird auch bestätigt bei dem Kombinationsansatz NVP-AEW541/SN-38, der bei der CRC-Zelllinie HT-29 zu keiner Wirkungsverstärkung führte, bei der CRC-Zelllinie HCT-116 hingegen additiv wirkte (siehe **Kap. 3.1.8.1**).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass unabhängig von der unterschiedlichen Pharmakodynamik der Zytostatika fast alle Kombinationen in einer additiven bis überadditiven antiproliferativen Wirkung resultierten. In diesem Kontext zeigten andere Arbeiten für weitere *in vitro*- und *in vivo*-Tumormodelle, dass NVP-AEW541 die Sensitivität gegenüber einer Reihe von Zytostatika wie z.B. Cytarabin, Etoposid, Vincristin, Aktinomycin D, Ifosfamid und Cisplatin verstärken kann (Scotlandi et al., 2005; Gotlieb et al., 2006; Tazzari et al., 2007). Auch bei diesen Arbeiten fanden sich teilweise zelltypspezifische Unterschiede. So führte beispielsweise die Co-Applikation von NVP-AEW541 und Cisplatin bei muskuloskeletalen Tumoren zu keiner antiproliferativen Wirkungsverstärkung (Scotlandi et al., 2005), während bei Ovarialkarzinomzellen durch die kombinierte NVP-AEW541/Cisplatin-Behandlung eine Verstärkung der Einzelwirkung der Substanzen erzielt werden konnte (Gotlieb et al., 2006). Im Hinblick auf das zelltypspezifische Ansprechverhalten gegenüber IGF-1R-basierten Kombinationstherapien mit Zytostatika erscheint es daher sinnvoll, individuelle Prädiktionen mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode der *ex-vivo*-Chemosensitivitäts-Testung an Primärzellkulturen (siehe **Kap. 2.2.1.2**) durchzuführen, um bereits im Vorfeld einen Therapieerfolg abschätzen zu können (vgl. **Kap. 4.2.5**).

Zu den weiteren Mechanismen, die bei der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Monotherapien beteiligt sind, zählen die Aktivierung des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs (Weinstein-Oppenheimer et al., 2001) und die dauerhafte Erhöhung des Cholesterinspiegels in Tumorzellen (Banker et al., 2004), die beide über Isoprenoide kontrolliert werden (Jakobisiak und Golab, 2003). Die Produktion von Isoprenoiden wird durch die HMG-CoA-Reduktase katalysiert, die damit einen interessanten Angriffspunkt für die molekulare Tumortherapie darstellt. Statine, bei denen es sich um Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase handelt, konnten in diesem Zusammenhang bereits bei verschiedenen Tumoren antiproliferative Effekte erzielen (Wong et al., 2001; Paragh et al., 2003) und werden als interessante Arzneistoffe für Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen diskutiert. Aufgrund langjähriger Erfahrung mit Fluvastatin als

Arzneimittel zur Behandlung von Hypercholesterinämie ist die hohe klinische Sicherheit belegt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die antiproliferative Wirkung des Fluvastatin bei NET- und CRC-Zellen bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Kombinationsansätze von NVP-AEW541 mit Fluvastatin zu einer synergistischen Wachstumsinhibition führten (siehe **Kap. 3.1.8.1**). Dieser Synergismus ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die bei diesen Tumoren hochregulierte Aktivität des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs (von Wichert et al., 2000; Kobayashi et al., 2005; Keller et al., 2007) durch die duale Blockade mittels IGF-1R-Inhibitor und Fluvastatin eine vollständige Signalwegs-Inhibition verursacht.

#### **4.2.6.2 Simultane Blockade des IGF-1-Rezeptors und des EGF-Rezeptors**

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass der IGF-1R und der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR im Sinne eines „*crosstalks*“ miteinander interagieren können und dass der IGF-1-Rezeptor in der Lage ist, den EGF-Rezeptor über einen autokrinen/parakrinen Mechanismus zu transaktivieren (Roudabush et al., 2000; Gilmore et al., 2002; Huether et al., 2006). Somit entfalten sich mitogene IGF-Effekte zumindest teilweise unter Zuhilfenahme des EGFR-Signalwegs. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR wird ähnlich wie der IGF-1R mit der Karzinogenese, dem Wachstum und dem Überleben von Tumoren in Verbindung gebracht (Nicholson, et al., 2001; Yarden und Sliwkowski, 2001). Er gehört wie der IGF-1-Rezeptor zu der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Durch Bindung seiner Liganden (EGF und TGF- $\alpha$ ) kommt es zur Rezeptordimerisierung und Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase, wodurch es letztendlich zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden wie dem Ras-Raf-MAP-Kinase- und dem PI3-Kinase-Weg kommt (Bianco et al., 2007).

Durch die Konvergenz der IGF-1R- und EGFR-Signalwege könnte daher die Hemmung des EGF-Rezeptors zur Inhibition von IGF-stimuliertem Tumorwachstum und damit zu einer antiproliferativen Wirkungsverstärkung der IGF-1R-Inhibition beitragen. Umgekehrt wird die enge Verknüpfung der IGF-1R- und EGFR-vermittelten Signaltransduktion auch als Ursache für Resistenzen gegenüber Anti-EGFR-Therapien diskutiert. So wurde bereits für diverse Tumoren beschrieben, dass die Überexpression des IGF-1R und die damit verbundenen Aktivitätserhöhung der nachgeschalteten

mitogenen Signalwege in der Lage sind, die Effekte einer EGFR-Inhibition zu kompensieren (Chakravarti et al., 2002; Jones et al., 2004).

Um die Bedeutung einer simultanen IGF-1R/EGFR-Inhibition hinsichtlich einer antiproliferativen Wirkungsverstärkung und/oder möglichen Resistenzüberwindung zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit entsprechende Untersuchungen mit verschiedenen IGF-1R- und EGFR-Inhibitoren am Beispiel hepatozellulärer und kolorektaler Karzinomzellen durchgeführt. Es zeigte sich dabei, dass Kombinationen aus IGF-1R- und EGFR-Inhibitoren deutlich wirksamer waren als die Monobehandlungen mit den jeweiligen Substanzen (siehe **Kap. 3.1.8.2**). Vermutlich ist der beobachtete antiproliferative Synergismus das Ergebnis der simultanen Unterdrückung derselben dem IGF-1R bzw. EGFR nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden, wie dem Ras-Raf-MAPK- und PI3-K-Signalweg, sowie der kompensatorischen Mechanismen, die im Zuge des Rezeptor „*crosstalks*“ von IGF-1R und EGFR auftreten. Insofern bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Beobachtungen früherer Arbeiten für das Glioblastom, Brusttumore und Prostatakarzinome (Chakravarti et al., 2002; Jones et al., 2004).

Für resistenzüberwindende Eigenschaften einer kombinierten Anti-IGF-1R/EGFR-Therapie spricht die Tatsache, dass bei hepatozellulären Huh-7-Zellen, die vergleichsweise unsensibel gegenüber dem EGFR-Antikörper Cetuximab waren, die Kombination mit einem IGF-1R-Inhibitor die stärksten synergistischen Effekte erzielte. Insgesamt stellt daher die simultane Blockade von IGF-1R und EGFR einen höchst interessanten Ansatz zur Behandlung fortgeschrittener gastrointestinaler Tumore dar, der vor allem unter dem Aspekt von Resistenzentstehung und -entwicklung zukünftig berücksichtigt werden sollte.

### **4.3 Die Inhibition der Histondeacetylase-Aktivität als wirksames therapeutisches Prinzip bei gastrointestinalen Tumoren**

#### **4.3.1 Antiproliferative Wirkung von HDAC-Inhibitoren**

Um den Einfluss von Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren auf das Zellwachstum von gastrointestinalen Tumoren zu untersuchen, wurden Wachstumsstudien mit insgesamt drei verschiedenen HDAC-Inhibitoren an Zelllinien gastrointestinaler neuroendokriner Tumore (CM und BON) sowie cholangiozellulärer Karzinome (EGI-1 und TFK-1) durchgeführt. Der Fokus der Untersuchungen lag dabei auf dem neuen, oral verfügbaren HDAC-Inhibitor MS-275, für den bereits bei diversen soliden Tumoren und

hämatonkologischen Erkrankungen ausgeprägte antiproliferative Effekte beschrieben worden sind (Saito et al. 1999; Rosato et al., 2003; Hess-Stumpp et al., 2007). Er befindet sich derzeit in klinischen Testungen der Phase I-II zur Behandlung von Patienten mit akuter Leukämie oder soliden Tumoren und Lymphomen (Ryan et al., 2005; Gojo et al., 2007).

Der synthetische HDAC-Inhibitor MS-275 inhibierte dosisabhängig das Wachstum von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzellen und Cholangiokarzinomzellen im submikromolaren Konzentrationsbereich. Einzig die langsam wachsende neuroendokrine Pankreaskarzinoid-Zelllinie BON zeigte eine geringere Sensitivität gegenüber MS-275. Zur halbmaximalen Wachstumsinhibition von BON-Zellen waren daher MS-275-Konzentrationen im mikromolaren Bereich erforderlich (siehe **Kap. 3.2.1, Tab. 3-5**). Das abweichende Ansprechverhalten lässt sich wahrscheinlich durch die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen erklären, die auch für die antiproliferative Wirkung der Inhibition des IGF-1-Rezeptors relevant war. Auch bei der Behandlung mit MS-275 war zu beobachten, dass - vergleichbar zum IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 - die schnell wachsenden Tumorzellen eine höhere Sensitivität gegenüber der Inkubation mit dem Inhibitor zeigten als die langsamer wachsenden Zellen (vgl. **Kap. 3.1.3**).

Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Ansprechen der Zelllinie auf die Behandlung wird auch bei den Untersuchungen der antiproliferativen Wirksamkeit der beiden anderen HDAC-Inhibitoren, Trichostatin A und Natriumbutyrat, bei neuroendokrinen Tumoren deutlich. Trichostatin A (TSA) und Natriumbutyrat (NaB) sind zwei natürlich vorkommende HDAC-Inhibitoren, die *in vitro* bei einer Vielzahl von Tumoren stark antiproliferative Effekte gezeigt haben. Aufgrund ungünstiger *in vivo* Zytotoxizitätsprofile und/oder schlechter Bioverfügbarkeit sind diese natürlichen HDAC-Inhibitoren allerdings klinisch eher unbedeutend. In der vorliegenden Arbeit wurden sie mit einbezogen, um das breite antiproliferative Spektrum von Anti-HDAC-Ansätzen zu überprüfen.

Sowohl für TSA als auch für NaB wurden ausgeprägte dosisabhängige wachstumsinhibitorische Effekte beobachtet. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte korrelieren hierbei mit den in der Literatur angegebenen Werten des jeweiligen HDAC-Inhibitors und liegen für TSA im submikromolaren Konzentrationsbereich sowie für NaB im (sub-)millimolaren Konzentrationsbereich (siehe **Kap. 3.2.1, Tab. 3-6**). Die schnell wachsende CM-Zelllinie zeigte im Vergleich zu der moderat wachsenden Zelllinie BON erneut ein sensitiveres Ansprechen gegenüber beiden HDAC-Inhibitoren.

Insgesamt lässt sich daraus ableiten, dass auch bei der Wirkung von HDAC-Inhibitoren ein Zusammenhang zwischen Proliferationskinetik und Therapiesensitivität besteht. Diese Beobachtung passt zum Wirkmechanismus der HDAC-Inhibitoren, die ja gerade bei der Replikation eingreifen und daher die proliferierenden Zellen stärker schädigen als langsamer wachsende bzw. proliferierende Zellen.

Die Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren beruht u.a. auf einer Akkumulation von acetylierten Histonen, die zur Transkription verschiedener Gene führt, deren Expression das Wachstum von Tumorzellen/Tumoren supprimiert. Diese Theorie wird vor allem durch die Genexpressionsprofile von Zellen, die mit HDAC-Inhibitoren kultiviert worden sind, unterstützt, da diese Zellen eine veränderte Expression von Genen aufweisen, die mit Apoptose, Regulation des Zellzyklus und Zelldifferenzierung assoziiert sind (Van Lint et al., 1996; Della Ragione et al., 2001; Butler et al., 2002; Suzuki et al., 2002).

Um bei den hier beobachteten antiproliferativen Effekten der HDAC-Inhibitoren eine unspezifische Schädigung von Zellmembranen auszuschließen, wurden als erstes Zytotoxizitätsuntersuchungen für alle drei HDAC-Inhibitoren durchgeführt. Da bei allen Ansätzen keine merkliche Zunahme der Laktatdehydrogenase-Aktivität gemessen wurde, konnte für die hier untersuchten Zellmodelle gastrointestinaler Tumore ausgeschlossen werden, dass die Wirkung der HDAC-Inhibitoren durch unspezifische nekrotische bzw. membranschädigende Effekte vermittelt wurde (siehe **Kap. 3.2.2**). Auch hierdurch lässt sich erklären, warum bei den langsamer wachsenden Zellen geringere Inhibitionseffekte beobachtet wurden als bei den schnell wachsenden Zellen. Durch das erwünschte Ausbleiben von allgemeiner Zytotoxizität kommt es zu keiner unspezifischen Abtötung der Zellen, sondern das Tumorzellwachstum wird ausschließlich durch die antiproliferative Wirkung der HDAC-Inhibitoren gehemmt.

#### **4.3.2 Apoptoseinduktion durch HDAC-Inhibitoren**

Für einige solide Tumore (Brustkrebs, Prostatakarzinom, Neuroblastome und Hepatome) und hämatoonkologische Erkrankungen wurde berichtet, dass HDAC-Inhibitoren ihre antineoplastische Wirkung vor allem durch die Induktion von Apoptose vermitteln (Marks et al., 2000; Herold et al., 2002; Henderson et al., 2003). In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals für die HDAC-Inhibitoren MS-275, TSA und NaB gezeigt werden, dass sie auch bei gastrointestinalen Tumorzellen eine starke Apoptoseantwort induzieren, die zu den beobachteten wachstumsinhibitorischen Effekten beiträgt. Die

apoptoseinduzierende Wirkung der HDAC-Inhibitoren konnte sowohl anhand der signifikanten Zunahme der Aktivität der Caspase-3 als auch anhand der Fragmentierung der DNA demonstriert werden (siehe **Kap. 3.2.3**).

Die Mechanismen, die bei der HDAC-Inhibitor-induzierten Apoptose eine Rolle spielen, sind sehr komplex und können in Abhängigkeit vom Zelltyp variieren (Duan et al., 2005). HDAC-Inhibitoren können die Aktivierung der Caspase-3 sowohl über den intrinsischen als auch extrinsischen Apoptoseweg triggern, indem sie einerseits durch die Freisetzung von Cytochrom C die intrinsische, mitochondrienvermittelte Apoptose induzieren (Maggio et al. 2004; Roh et al 2004; Natoni et al., 2005), und andererseits die Tumorzellen für die Todesliganden sensibilisieren und damit die extrinsische, rezeptorvermittelte Apoptose initiieren (Bhalla und List 2004; Natoni et al., 2005).

Weiterhin wurde auch eine veränderte Expression verschiedener pro- und antiapoptotischer Gene nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren beobachtet (Bhalla und List, 2004). Die Induktion der Expression von proapoptotischem Bak und die Induktion einer Konformationsänderung von proapoptotischem Bax gehören zu den HDAC-Inhibitoren induzierten Ereignissen, die den mitochondrienvermittelten Apoptoseweg triggern (Herold et al., 2002; Fuino et al., 2003; Johnstone und Licht, 2003). Außerdem können auch antiapoptotische Proteine wie z.B. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 und Survivin durch HDAC-Inhibitoren reguliert werden (Guo et al., 2004; Maggio et al., 2004), wodurch es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen zugunsten der proapoptotischen Faktoren kommt.

Passend dazu konnte in dieser Arbeit auch für gastrointestinale Karzinomzellen gezeigt werden, dass die HDAC-Inhibition mit MS-275 zur Suppression von antiapoptotischen Proteinen und zur Induktion von proapoptotischen Proteinen führte. Allerdings zeigten sich zelltypspezifische Unterschiede bei der Regulation. So zeigte sich bei den CCC-Zellen, dass die Expression von proapoptotischem Bax durch MS-275 dosisabhängig hochreguliert wurde, während das antiapoptotische Protein Bcl-2 supprimiert wurde. Bei NET-Zellen war dagegen nur eine Suppression des Bcl-2 zu beobachten, während die Bax-Expression durch MS-275 nicht verändert wurde (siehe **Kap. 3.2.3**).

Die zelltypspezifische Regulation von pro- und antiapoptotischen Proteinen durch HDAC-Inhibitoren lässt sich auch durch frühere Arbeiten belegen, in denen die Apoptosewirkung von HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A (TSA) und Natriumbutyrat (NaB) untersucht wurde. Bei Brustkrebszellen wurde beispielsweise eine signifikante Regulation von Bax und Bcl-2 durch TSA bzw. NaB festgestellt, die zu einer erhöhten

Bax-Expression und einer verminderten Bcl-2-Expression führte (Singh et al., 2002; Louis et al., 2004). In TSA- bzw. NaB-behandelten Gliomzellen konnte hingegen keine veränderte Expression von Bax und Bcl-2 beobachtet werden (Sawa et al., 2001).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es für die Bewertung/Einschätzung von geeigneten Ansätzen für Kombinationstherapien, die auf einer Verstärkung apoptotischer Effekte basieren, besonders wichtig ist, die zelltypspezifischen Veränderungen des Expressionsmusters von HDAC-Inhibitoren induzierten pro- und antiapoptotischen Proteinen zu überprüfen.

### 4.3.3 Zellzyklusmodulierende Wirkung durch HDAC-Inhibitoren

Die Induktion des cyclinabhängigen Kinase-Inhibitors (CDKI) p21<sup>Waf1/Cip1</sup> ist ein häufig beobachtetes Ereignis infolge der Inhibition von Histondeacetylasen (Richon et al., 2000; Herold et al., 2002). Obwohl der CDKI p21<sup>Waf1/Cip1</sup> überwiegend mit dem G1-Kontrollpunkt des Zellzyklus in Verbindung gebracht wird (Yamashita et al., 2003), wurde außerdem eine zusätzliche Involvierung des p21<sup>Waf1/Cip1</sup> bei der Regulation des Übergangs von der G2- zur M-Phase festgestellt (Noh und Lee, 2003; Peart et al., 2003). Dementsprechend konnte für verschiedene HDAC-Inhibitoren gezeigt werden, dass sie in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase als auch in der G2/M-Phase induzieren (Fournel et al., 2002; Takai et al., 2004; Ryu et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Beobachtungen für den HDAC-Inhibitor MS-275 bei gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren (NET) und bei cholangiozellulären Karzinomen (CCC). Die Inkubation der Zellen mit MS-275 bewirkte in allen vier gastrointestinalen Tumorzelllinien eine dosisabhängige Zunahme der Expression des CDKI p21<sup>Waf1/Cip1</sup> und einen Arrest des Zellzyklus in der G0/G1-Phase und teilweise auch in der G2/M-Phase. Während der G0/G1-Arrest in allen Zelllinien sehr ausgeprägt und statistisch signifikant war, zeigten sich bei dem G2/M-Arrest zelltypspezifische Unterschiede. Ein eindeutiger G2/M-Arrest ließ sich daher nur bei den TFK-1 und den BON-Zellen feststellen (siehe **Kap. 3.2.4**).

Zelltypspezifische Unterschiede zeigten sich auch sehr deutlich bei den anderen beiden HDAC-Inhibitoren, Trichostatin A und Natriumbutyrat, die bei neuroendokrinen Tumorzellen untersucht wurden. Sowohl TSA als auch NaB induzierten in beiden Zelllinien einen signifikanten G0/G1-Arrest. Ein zusätzlicher, signifikanter G2/M-Arrest mit entsprechender Abnahme der S-Phase war allerdings nur bei den BON-Zellen



festzustellen, wogegen bei CM-Zellen eine Zunahme der S-Phase beobachtet wurde (siehe **Kap. 3.2.4**).

Neben dem CDK-Inhibitor p21<sup>Waf1/Cip1</sup> können noch eine Reihe weiterer zellzyklusrelevanter Gene durch HDAC-Inhibitoren modifiziert/reguliert werden (Marks et al., 2003). So können HDAC-Inhibitoren auch einen G1-Arrest des Zellzyklus induzieren, der mit einer veränderten Expression des Zellzykluspromoters Cyclin D1 und des CDK-Inhibitors p27<sup>Kip1</sup> assoziiert ist, die den Übergang der G1- zur S-Phase kontrollieren. Für Trichostatin A und Natriumbutyrat ist in diesem Zusammenhang bereits gezeigt worden, dass der TSA- bzw. NaB-induzierten G1-Arrest mit einer verminderten Expression des Cyclin D1 und einer Zunahme der Expression von p27<sup>Kip1</sup> einhergeht (Takai et al., 2004; Chen und Faller, 2005).

Die Untersuchungen dieser Arbeit zur Expressionsmodulation zellzyklusrelevanter Proteine durch den HDAC-Inhibitor MS-275 können diese Ergebnisse nur teilweise bestätigen (siehe **Kap. 3.2.4**). Bei den neuroendokrinen Tumorzellen führte die Behandlung der Zellen mit MS-275 zu einer Abnahme der Expression von Cyclin D1 bei gleichzeitiger Induktion von p27<sup>Kip1</sup>. Im Gegensatz dazu blieb die Proteinexpression von Cyclin D1 und p27<sup>Kip1</sup> bei MS-275-behandelten Cholangiokarzinomzellen unverändert.

Ein weiteres zellzyklusrelevantes Protein, das durch HDAC-Inhibitoren reguliert werden kann, ist Cyclin B1, das den Übergang der Zellen von der G2- zur M-Phase fördert (Lallemant et al., 1999; Noh und Lee, 2003). Da bei den Zellzyklusanalysen der vorliegenden Arbeit insbesondere bei den TSA- und NaB-behandelten BON Zellen ein sehr ausgeprägter, signifikanter G2/M-Arrest aufgefallen war, wurde weiterhin die Expression von Cyclin B1 bei den entsprechenden Zellen untersucht. Die Western Blot Analysen zeigten, dass 500-1000 nM TSA bzw. 5-10 mM NaB die Expression von Cyclin B1 herunterregulierten und demonstrieren damit, dass der durch die HDAC-Inhibitoren induzierte G2/M-Arrest mit einer verminderten Cyclin B1-Expression assoziiert ist (siehe **Kap 3.2.4**).

Gerade für den Einsatz von HDAC-Inhibitoren als Kombinationspartner für Therapien mit konventionellen Chemotherapeutika, deren Wirkung abhängig von Zellzyklusphasen erfolgt, ist es sehr wichtig, die zelltypspezifische Regulation zu charakterisieren, um begründete Entscheidungen für erfolgsversprechende Kombinationen treffen zu können.

#### **4.3.4 Kombinationstherapeutische Ansätze**

##### **4.3.4.1 HDAC-Inhibitoren mit Somatostatinen und konventionellen Zytostatika**

###### **HDAC-Inhibitoren plus Somatostatin und Octreotid**

Somatostatinanaloga werden bereits seit langem erfolgreich zur symptomatischen Behandlung von Patienten mit gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren eingesetzt (Öberg et al., 2001; Arnold, 2007). Zahlreiche klinische Studien belegen, dass Somatostatin und das langwirkende Somatostatinanalogon Octreotid zu einer signifikanten Reduzierung der durch die Tumore sezernierten Neurotransmitter und Hormone im Blut führen, und dadurch eine Kontrolle des so genannten Hypersekretionssyndroms ermöglichen (Öberg, 1996). Darüber hinaus wurde berichtet, dass Somatostatinanaloga die antiproliferativen Effekte von verschiedenen chemotherapeutischen Agenzien in einer additiven oder synergistischen Weise verstärken können (Weckbecker et al., 1996). Durch die hier untersuchten Kombinationsansätze von Somatostatin-14 bzw. Octreotid mit dem HDAC Inhibitor MS-275 konnte dagegen keine Verstärkung der antiproliferativen Wirkung des MS-275 bei neuroendokrinen Tumorzellen erzielt werden (siehe **Kap. 3.2.5.1**).

Ungeachtet dessen stellt dieser Kombinationsansatz dennoch eine Möglichkeit für eine wirkungsvolle/geeignete Kombinationstherapie zur Behandlung gastrointestinaler neuroendokriner Tumore (NET) dar. Durch die Co-Applikation von HDAC-Inhibitoren und Somatostatinanaloga könnte einerseits eine Wachstumsinhibition und zusätzlich eine Suppression der Hormonfreisetzung bei funktionellen, symptomatischen Tumoren erzielt werden. Damit bietet dieser Ansatz eine neue Strategie, NET effektiv durch eine Sekretionsunterdrückung und gleichzeitige Tumorwachstumskontrolle zu therapieren.

###### **HDAC-Inhibitoren plus konventionelle Zytostatika**

Die Kombination von HDAC-Inhibitoren mit konventionellen chemotherapeutischen Agenzien erscheint als ein viel versprechender Ansatz, um die Wirkstoffkonzentration der zytotoxischen Chemotherapeutika zu reduzieren, Resistenzen zu überwinden und insgesamt die Nebenwirkungen der Behandlung zu reduzieren und so zu einer besseren Patientenverträglichkeit beizutragen. Bei einigen soliden Tumoren, wie z.B. Glioblastomen und Brusttumoren, konnte bereits gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren die antiproliferativen Effekte von Zytostatika erheblich steigern können (Kim et al., 2003b).

In dieser Arbeit wurden zwei in der Palliativtherapie der cholangiozellulären Karzinome eingesetzte Zytostatika, das Nukleosidanalogen Gemcitabin und der Topoisomerase-II-Inhibitor Doxorubicin, ausgewählt, um die Kombinationswirkung mit MS-275 bei CCC-Zellen zu evaluieren. Für beide Kombinationen konnte eine additive Wirkungsverstärkung bei den cholangiozellulären Karzinomen demonstriert werden (siehe **Kap. 3.2.5.1**).

Bei der Kombination von HDAC-Inhibitoren mit Topoisomerase-II-Inhibitoren wie Doxorubicin wird angenommen, dass eine durch HDAC-Inhibitoren-induzierte Zunahme der Topoisomerase-II, zur Wirkungsverstärkung beiträgt (Kurz et al., 2001). Maggio und Mitarbeiter vermuten weiterhin für die Kombination von MS-275 mit einem anderen Nukleosidanalogen, dem Fludarabin, eine synergistische Interaktion zur Auslösung von Apoptose, die über eine mitochondriale Dysfunktion und Caspase-Aktivierung vermittelt wird (Maggio et al., 2004).

Die genauen Mechanismen, wie HDAC-Inhibitoren die Wirkung von Zytostatika bei gastrointestinalen Tumorzellen potenzieren, sind allerdings noch unklar und es bedarf weiterführender Untersuchungen, um die genauen Interaktionen aufzuklären. Dennoch führen die Ergebnisse zu dem Schluss, dass eine HDAC-Inhibitor-basierte Kombinationstherapie mit konventionellen Zytostatika zu einer gesteigerten Wachstumshemmung beiträgt, und daher als neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung fortgeschrittener cholangiozellulärer Karzinome und anderer gastrointestinaler Tumore weiter verfolgt werden sollte.

#### **4.3.4.2 HDAC-Inhibitoren in Kombination mit Sorafenib oder Bortezomib**

Weiterhin wurde die Kombinationswirkung von HDAC-Inhibitoren mit zwei so genannten „*small molecule*“-Inhibitoren, Sorafenib und Bortezomib, untersucht.

Sorafenib: Sorafenib (Nexavar<sup>TM</sup>) ist ein Multi-Kinase Inhibitor, der in den bei vielen Tumoren gesteigerten Ras-Raf-MAPK-Signaltransduktionsweg eingreift, indem er bestimmte in Tumorzellen häufig überexprimierte Raf-Isoformen hemmt (Wilhelm et al., 2002; Beeram et al., 2005; Sridhar et al., 2005). Der Ras-Raf-MAPK-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von multiplen zellulären Funktionen/Vorgängen, wie Proliferation, Apoptose und der Progression des Zellzyklus (vgl. **Kap. 1.3.3**). Durch die Unterbrechung dieses Signalwegs vermindert Sorafenib u.a. die Proliferation von Tumorzellen (Beeram et al., 2005). Unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass Sorafenib das Wachstum von CCC-Zellen inhibiert, indem es die

Aktivität der MAP-Kinase ERK1/2 supprimiert (Huether et al., 2007). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass die kombinierte Behandlung von CCC-Zellen mit dem HDAC-Inhibitor MS-275 und Sorafenib zu einer deutlich additiven bis überadditiven Wirkungsverstärkung führt (siehe **Kap. 3.2.5.2**).

HDAC-Inhibitoren können ebenfalls den Ras-Raf-MAPK-Signalweg herunterregulieren, wie sich beispielsweise durch die HDAC-induzierte Wachstumshemmung bei transformierten Hepatozyten zeigte, die durch eine Suppression von onkogenen Ras und ERK1/2-Kinasen verursacht wurde (Jung et al., 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete synergistische Wachstumshemmung durch MS-275 und Sorafenib bei CCC-Zellen lässt vermuten, dass die antiproliferative Wirkung von MS-275 bei gastrointestinalen Tumoren möglicherweise auch durch eine Suppression des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs vermittelt wird.

Bortezomib: Auch die Hemmung der Proteasomfunktion ist ein weiteres neues therapeutisches Wirkprinzip der zielgerichteten Tumorthherapie (Adams und Kauffman, 2004; Roccaro et al., 2006). Das Proteasom spielt eine wesentliche Rolle beim kontrollierten, nicht-lysosomalen, intrazellulären Abbau von Proteinen mit zum Teil zentraler Bedeutung in der Kontrolle von Proliferation und Metastasierung, wie z.B. das Tumorsuppressorprotein p53, die CDK-Inhibitoren p21<sup>Waf1/Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> oder I $\kappa$ B, der Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Der 26S Proteasominhibitor Bortezomib (Velcade<sup>TM</sup>) hemmt die Aktivität des Proteasoms und hat bereits *in vitro* und *in vivo* bei verschiedenen Tumoren eine antineoplastische Wirkung gezeigt (Fribley et al., 2004).

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B eine wichtige Rolle dabei spielt, wie die Zellen auf eine Anti-HDAC-Therapie ansprechen (Marks et al., 2001b; Dai et al., 2005), und dass eine hohe NF $\kappa$ B-Konzentration mit einem schlechteren Ansprechverhalten korreliert (Denlinger et al., 2004). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Co-Applikation von Bortezomib und HDAC-Inhibitoren bei z.T. HDAC-insensitiven Tumorzellen zu einer Resensibilisierung und/oder einer antiproliferativen Wirkungsverstärkung der HDAC-Inhibitoren bei den untersuchten Zellen führte (Yu et al., 2003; Denlinger et al., 2004; Pei et al., 2004). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kombination des HDAC-Inhibitors MS-275 mit Bortezomib führte zu einer synergistischen Wachstumsinhibition bei den untersuchten Cholangiokarzinomzellen (siehe **Kap. 3.2.5.2**). Eine Erklärung für den wachstumsinhibitorischen Synergismus ist, dass es durch die Proteasominhibierung

zu einer Akkumulation des NFκB-Inhibitors IκB im Zytoplasma kommt, die verhindert, dass NFκB in den Zellkern wandert und dort die Transkription von antiapoptotischen Genen induziert (Adams, 2003). Außerdem ist durch andere Arbeiten bekannt, dass eine Inhibierung des Proteasoms dazu führt, dass viele proapoptotische Proteine, u.a. Bax, nicht abgebaut werden (Mitsiades et al., 2002; Ling et al., 2003). Bortezomib kann also ebenso wie der HDAC-Inhibitor MS-275 das Gleichgewicht von pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie in Richtung eines apoptosebegünstigenden Verhältnisses verschieben, und könnte dementsprechend auf diese Weise die apoptoseauslösende Wirkung des MS-275 verstärken.

Angesichts dieser viel versprechenden *in vitro* Daten erscheinen sowohl die Kombinationsbehandlung von HDAC-Inhibitoren mit Sorafenib als auch die kombinierte Behandlung von HDAC-Inhibitoren mit Bortezomib als äußerst interessante Ansatzpunkte für neue Arzneistoffkombinationen zur Behandlung von Cholangiokarzinomen, deren Effektivität und Sicherheit in klinischen Studien überprüft werden sollten.

#### **4.4 Abschließende Betrachtungen und Ausblick**

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse belegen, dass sowohl der insulinähnliche Wachstumsfaktorrezeptor 1 (IGF-1R) als auch Histondeacetylasen sehr viel versprechende Zielstrukturen für innovative und zielgerichtete Therapieansätze zur Behandlung von gastrointestinalen Tumoren darstellen.

Somit konnte ein Beitrag zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden Wirkmechanismen und der antiproliferativen Potenz von IGF-1R-basierten und HDAC-basierten Therapieansätzen geleistet werden. Dabei wurde erstmals die Wirksamkeit dieser Ansätze zur Therapie gastrointestinaler Tumore evaluiert. Die vorgestellten Ergebnisse eröffnen vielfältige Anknüpfungspunkte für weiterführende Untersuchungen - insbesondere hinsichtlich kombinationstherapeutischer Ansätze mit konventionellen Zytostatika.

Da die Wirkmechanismen dieser beiden neuen Therapieansätze auf der Modulation von teilweise denselben Signalwegen beruhen, wie z.B. Apoptose, und außerdem gezeigt werden konnte, dass IGF-1R- und HDAC-Inhibitoren die Expression derselben Zielproteine wie beispielsweise die apoptoserelevanten Proteine Bax und Bcl-2 und das zellzyklusinhibierende Protein p21<sup>Waf1/Cip1</sup> regulieren, bieten sich weiterführende

Untersuchungen an, bei denen IGF-1R- und HDAC-Inhibitoren miteinander kombiniert werden, um die antineoplastische Potenz gegenüber einer Monobehandlung mit dem jeweiligen Inhibitor zu steigern. Erste Voruntersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Ansatz bei gastrointestinalen Tumoren zu viel versprechenden Ergebnissen führt. Außerdem liefert auch eine Arbeit von Mitsiades und Mitarbeitern erste Hinweise darauf, dass ein derartiger Ansatz sich für künftige Tumorthapien eignen könnte, da einige HDAC-Inhibitoren eine modulatorische Wirkung auf das IGF-1R-System ausüben (Mitsiades et al., 2004, b).