Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin I

Komm. Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Götz von Wichert

Bedeutung eines neuen IGF-1-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors für Zellproliferation, Signaltransduktion und Regulation der Sekretion in neuroendokrinen Tumorzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

Irina Bergen

Solikamsk

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniel Walcher

Tag der Promotion: 20.04.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis iv
1. Einleitung 1
1.1 Neuroendokrine Tumore 1
1.2 IGF-1, IGF-1-Rezeptor und IGF-1-induzierte Signalwege 5
1.3 Regulation neuroendokriner Sekretion in NETs 11
1.4 Rolle des IGF-1-Rezeptorinhibitors NVP-AEW541 11
1.5 Zielsetzung 14
2. Material und Methoden 15
2.1 Material 15
2.2 Methoden 17
3. Ergebnisse 24
3.1 Auswirkung von NVP-AEW541 auf Zellproliferation 24
3.2 Wirkung von exogenem IGF-1 auf IGF-1R, intrazelluläre Signalwege und die CgA-Sekretion 26
3.3 Einfluss von NVP-AEW451 auf basale Phosphorylierung von IGF-1R in BON-Zellen 32
3.4 Einfluss von NVP-AEW541 auf den IGF-1-induzierten ERK-Signalweg in BON-Zellen 36
3.5 Einfluss von NVP-AEW541 auf den IGF-1-induzierten Akt-Signalweg in BON-Zellen 40
3.6 Einfluss von NVP-AEW541 auf Sekretion von CgA 44
4. Diskussion 49
4.1 NVP-AEW541 hemmt IGF-1R-Phosphorylierung in BON-Zellen 50
4.2 NVP-AEW541 inhibiert intrazelluläre Signalwege in BON-Zellen 50
4.3 NVP-AEW541 hemmt CgA-Sekretion in BON-Zellen 53
4.4 NVP-AEW541 hemmt Proliferation der BON-Zellen 54
4.5 NVP-AEW541 und möglicher Einsatz als Therapeutikum 55
4.6 Schlussfolgerung 56
5. Zusammenfassung 57
6. Literaturverzeichnis 59
7. Danksagung 65
8. Lebenslauf 66

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEBSF	Aminoethylbenzylsulfonylfluorid
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B, eine Serin/Threonin-Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CgA	Chromogranin A
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular signal regulated Proteinkinase
FKS	Fötales Kälber Serum
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	Growth-factor-receptor-bound-protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Salzsäure
HIES	5-Hydroxyindolessigsäure
IGF-1	Insulin-like-Growth-factor-1
IGF-1R	Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor
IGFBP	Insulin-like-Growth-factor-binding-protein
IRS	Insulin-Receptor-Substrate
kDa	Kilodalton
l	Liter
mA	Milliamper
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase

MDM2	Murine double minute 2
MEK	MAPK-Kinase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
mM	millimolar
mTOR	mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
$NaVO_4$	Othovanadat
NET	neuroendokriner Tumor
NF-κB	Nekrosefakor κB
p.a.	zur Analyse
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Pen	Penicillin
PET	Positronenemissionstomographie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP^2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphonat
PIP^3	Phosphatidyl-Inositol-3, 4, 5-Bisphosphonat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PVDF	Polyvinylidendiflourid
Ras	rat sarcoma viral oncogene homolog
Raf	Ras activating factor, Mitogen-activated-protein(MAP)-Kinase-Kinase-Kinase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler
SOS	Son-of-sevenless
Strep	Streptomycin

TBS	Tris buffered Saline
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminoethan
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
V/v	Volumen pro Volumeneinheit
WHO	World Health Organization
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Neuroendokrine Tumore

1.1.1 Definition

Neuroendokrine Tumore (NETs) machen ca. zwei Prozent aller gastrointestinalen Malignome aus (Oberg et al. 2004). Dabei stieg die Inzidenz über die letzten 30 Jahre (Modlin, Lye, and Kidd 2003). Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems lassen sich durch folgende Eigenschaften definieren (Langley 1994):

1. Produktion eines Neurotransmitters, eines Neuromodulators oder eines Hormons aus der Gruppe der Neuropeptide.
2. Vorhandensein von Sekretvesikeln, aus welchen das gespeicherte Hormon, als Antwort auf einen externen Stimulus, durch Exozytose freigesetzt wird.
3. Abwesenheit von Axonen und Synapsen.

Für ein praktisches Vorgehen bei der Identifizierung von neuroendokrinen Zellen sind molekulare Marker unentbehrlich, allen voran das Chromogranin A (CgA) (Winkler and Fischer-Colbrie 1992; Taupenot, Harper, and O'Connor 2003).

Die WHO-Klassifikation von 2008 unterteilt neuroendokrine Malignome in drei Gruppen: benigne, niedrig maligne und hoch maligne NETs. Die Unterscheidung zwischen einzelnen Gruppen beruht auf einigen pathologischen und klinischen Daten, wie der Invasion der Muskularis propria, histologischer Differenzierung, Tumorgröße, Angioinvasion, Vorhandensein von Metastasen, hormonell bedingten Symptomen und dem Ki-67-Index. Ki-67 ist ein Proliferationsantigen, das in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus vorhanden ist. Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren Ki-67 nicht. Somit ist Ki-67 ein Marker für Proliferation (Vilar et al. 2007).

Tabelle 1: Kriterien zur Einschätzung der Prognose gastrointestinaler NETs. Verändert nach Gumpp V., Henß H.

Biologisches Verhalten	Benigne	Niedrig maligne	Hoch maligne
Metastasen	-	+	+
M. propria-Infiltration	-	+	+
Differenzierungsgrad	Hoch	Hoch	Niedrig
Tumorgröße	≤ 1 cm	> 2 cm	Beliebig
Angioinvasion	-	+	+
Ki67-Index	< 2 %-	> 2 %	> 30 %
Hormonelles Syndrom	-	+	-

Zusätzlich besteht auch noch eine Subklassifizierung nach der Lokalisation des Tumors im Magen, Duodenum, Ileum, Appendix, Colon, Rektum und Pankreas. (Kloppel, Perren, and Heitz 2004; Rindi G. European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) 2006). Auch existiert eine TNM-Klassifikation für neuroendokrine Tumore der einzelnen Organe.

1.1.2 Symptome

Etwa 30-50 % der NETs produzieren hormonell wirksame Substanzen, die auch von körpereigenen neuroendokrinen Zellen hergestellt werden, wie z.B. Gastrin, Vasoaktives intestinales Peptid (ViP), Insulin und Glukagon. Die Hormonproduktion dieser funktionell aktiven Tumore erzeugt charakteristische Symptome, v.a. bei bestehender Lebermetastasierung. Dazu gehören Flush, Diarrhöe, karzinoidbasierte Herzerkrankung mit Rechtsherzversagen, das sog. Hedinger-Syndrom, hypertensive Entgleisungen, Bronchialkonstriktion und erhöhte Ausscheidung des Serotoninmetabolits 5-Hydroxyindolessigsäure (HIES) im Urin (Kulke 2007; Kunnimalaiyaan and Chen 2006; Rothenstein et al. 2008). So erzeugen Gastrin produzierende NETs das Zollinger-Ellison-Syndrom, ViPome verursachen schwere Diarrhöen und Insulinome schwere Hypoglycämien.

Hormoninaktive NETs bleiben lange symptomfrei und fallen oft erst durch ihre raumfordernde Wirkung auf.

1.1.3 Diagnostik

Wegweisend für die Diagnose von NETs sind, falls vorhanden, spezifische hormonassoziierte Symptome. Es kommen grundsätzlich die gleichen diagnostischen Mittel zum Einsatz wie bei anderen Tumorerkrankungen.
Zur Lokalisationsdiagnostik neuroendokriner Tumore stehen endoskopische und bildgebende Verfahren zur Verfügung.
Basis der Diagnose ist die histologische Sicherung der Diagnose aus Tumorgewebe mittels konventioneller und immunhistochemischer Untersuchung.
Je nach klinischem hormonassoziiertem Syndrom können die jeweiligen Hormone zur Verlaufsbeurteilung herangezogen werden. Beim Karzinoid-Syndrom wird u.a. das Serotonin-Abbauprodukt 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt (Kulke 2007). Bei neuroendokrinen Tumoren sind die Serum-CgA-Spiegel in über 90% pathologisch erhöht (Seregni et al. 2001; Stivanello et al. 2001; Tomassetti et al. 2001; Oberg et al. 2004).
Bei CgA handelt es sich um ein sekretionsassoziiertes Protein, das in neuroendokrinen Zellen vorkommt und in geringen Mengen im Blut nachweisbar ist. Es gibt Hinweise, dass die Höhe der Spiegel mit Tumormasse und Prognose der Erkrankung korreliert (Oberg 2005). CgA ist sowohl bei funktionell aktiven als auch funktionell nicht-aktiven Tumoren als Marker geeignet (Kulke et al. 2004).
Eine spezifische Methode in der bildgebenden Diagnostik neuroendokriner Tumore stellt die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie dar. Sie nutzt das Vorhandensein von Somatostatinrezeptoren auf der Oberfläche neuroendokriner Tumorzellen (Ricke J, Klose KJ: Digestion 2000). Eine strahlenbelastungsärmere Methode ist die Positronenemissionstomographie mit integrierter Computertomographie, DOTATOC-PET/CT (Forrer et al. 2004).

1.1.4 Therapie

Die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen für Patienten mit neuroendokriner Tumorerkrankung sind vielfältig. Das Therapiekonzept wird interdisziplinär und in Zusammenarbeit mit einem Zentrum entwickelt.

Im Falle der lokalisierten Erkrankung stellt eine chirurgische Intervention die wichtigste und einzige potentiell kurative Therapieoption dar. Auch bei funktionell aktiven Tumoren, insbesondere z.B. bei Entfernung größerer Metastasen in Leber und Bauchraum, spielt die operative Therapie eine wichtige Rolle (de Herder et al. 2004).

In der symptomatischen Therapie stellen die teilweise sehr beeinträchtigenden hormonassoziierten klinischen Symptome eine therapeutische Herausforderung dar. Langwirksame Somatostatinanaloga (Octreotid, Lanreotide) haben dabei einen hohen Stellenwert. Hauptwirkungsweise dieser Substanzen ist eine über Somatostatinrezeptoren vermittelte Hemmung der unkontrollierten Hormonfreisetzung. Bei *in-vitro* Untersuchungen konnte eine antiproliferative Wirksamkeit von Somatostatinanaloga (z.B. Octreotid, Lanreotid) nachgewiesen werden (Welin et al. 2004). In verschiedenen Studien konnte eine Wachstumshemmung neuroendokriner Tumore bei bis zu 50% der Patienten beobachtet werden. Die gezielt gegen den Tumor gerichtete Radionuklidrezeptortherapie mit Hilfe der Kopplung von strahlenemittierenden Radionukliden an Somatostatinanaloga (DOTATOC) stellt einen weiteren Therapieansatz in der systemischen Therapie neuroendokriner Tumoren dar.

Eine primäre Chemotherapie ist bei vielen neuroendokrinen Tumoren nicht erfolgversprechend. Allerdings kann durch Kombination von Streptozotocin mit 5-Fluoruracil oder mit Doxorubicin in etwa der Hälfte der Fälle, vor allem bei hochproliferativen Tumoren, ein Ansprechen erzielt werden (Oberg 2001).

Da NETs meist eine niedrige Proliferationsrate aufweisen, ist in den meisten Fällen eine alleinige Chemotherapie wenig effektiv. Tatsächlich bieten die sog. biologischen Therapien bessere Optionen (Vilar et al. 2007). So konnten Höpfner et al. 2006 zeigen, dass eine Kombination aus dem selektiven IGF-1-Rezeptor-Inhibitor NVP-AEW541 und Doxorubicin bzw. 5-FU zu additiven antiproliferativen

Effekten in BON-Zellen und humanen Insulinomzellen führten (Hopfner et al. 2006). Hieraus könnten sich neue Therapieoptionen erschließen.

1.1.5 BON-Zellen als Modell für NETs

Ein Modell für neuroendokrine Tumore ist die Zelllinie BON. BON-Zellen wurden erstmals 1986 aus einer Lymphknotenmetastase eines Pankreaskarzinoids eines 28-jährigen Patienten isoliert (Evers et al. 1994). Die Zelllinie wurde kultiviert und an *in vitro* Bedingungen adaptiert. Auch für unsere Untersuchungen wurden BON-Zellen verwendet.
BON-Zellen zeigen keine Kontaktinhibition und haben eine Verdopplungszeit von ca. 60 Stunden. Von Evers konnte gezeigt werden, dass BON-Zellen unter anderem Gastrin-, Serotonin-, Somatostatin- und muscarinische Acethylcholin-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.
Darüber hinaus exprimieren BON-Zellen funktionell aktive Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptoren (IGF-1R) und sezernieren auch Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF-1), wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (von Wichert et al. 2000). Außerdem werden noch Serotonin, Neurotensin, Pankreastatin und Chromogranin A von diesen Zellen sezerniert.

1.2 IGF-1, IGF-1-Rezeptor und IGF-1-induzierte Signalwege

Die Interaktion von IGF-1 und -2 mit ihrem Rezeptor spielt eine beträchtliche Rolle bei der Tumorgenese, Proliferation und Metastasierung vieler Krebsarten. (Baserga 2000; Wang and Sun 2002; Wang et al. 2003).

1.2.1 IGF-1 und IGF-1-Rezeptor

IGF-1 ist ein 70-Aminosäuren großes Serum– und Gewebepeptid, das eng mit dem Hormon Insulin verwand ist. Zusammen mit IGF-2 und Insulin ist IGF-1 Teil einer Familie von Proteinen, die mit den zugehörigen Rezeptoren und den sechs IGF-Bindungsproteinen (IGFBP) das IGF-System darstellt.

Die sechs bekannten Bindungsproteine regulieren die Blutspiegel von IGF-1 und IGF-2 und modulieren auch deren Wirkung. Das zirkulierende IGF-1 ist zum größten Teil an IGFB-Proteine gebunden, hierbei spielt vor allem IGFBP-3 eine große Rolle. Es bindet mehr als 90 % des zirkulierenden IGF-1, verlängert dessen Halbwertszeit und schafft somit ein IGF-1 Reservoir (Sandhu, Dunger, and Giovannucci 2002). IGF-Bindungsproteine haben mehrere, zum Teil entgegengesetzte Funktionen: 1. dienen sie als Reservoir für IGF; 2. können sie das gebundene IGF aus der Blutbahn durch die Kapillarschranke in das umgebende Gewebe transportieren und können 3. die IGF-Wirkung entweder potenzieren oder inhibieren. Die inhibitorische Wirkung überwiegt dabei gegenüber der potenzierenden Wirkung, die nur für IGFBP-1, -3 und -5 beschrieben ist (Zapf 1995). Neben diesen Funktionen konnte auch eine IGF-unabhängige, direkte biologische Wirkung für IGFBP-3 gezeigt werden (Stewart und Rotwein, 1996).

In BON-Zellen findet sich nur IGFBP-2. Man vermutet, dass durch die Bindung von IGF-1 an IGFB-2 die Halbwertszeit von IGF-1 verlängert wird und die autokrinen Vorgänge unterstützt werden (Höflich et al. 1996; Boulle et al. 1998; Menounty et al. 1998).

IGF-1 hat eine hohe Affinität zu seinem Rezeptor (IGF-1R). Der IGF-1R besteht aus zwei extrazellulären Alpha-Ketten, die für die Ligandenbindung zuständig sind, und zwei intrazellulären Beta-Ketten, die eine Tyrosinkinasedomäne aufweisen, welche für die meisten intrazellulären Effekte verantwortlich ist.

In NETs des Gastrointestinaltrakts ist eine erhöhte Expression von IGF-1R sowie eine IGF-1-Sekretion anzutreffen (Nilsson,O. 1992; Quinn,K.A. 1996; Wulbrand et al. 2000; Zhang and Yee 2004). In BON-Zellen trägt die IGF-1R-Expression und die autokrine IGF-1-Ausschüttung zur exzessiven Sekretion von Bioaminen und CgA, sowie zur Zellzyklusregulation bei (von Wichert et al. 2000, 2005). Die Expression von IGF-1R auf Zellen korreliert mit dem Stadium des neuroendokrinen Karzinoms, mit der Minderung der Überlebenswahrscheinlichkeit, mit der Entwicklung von Metastasen und mit dem Differenzierungsgrad der Zellen (Scharf and Braulke 2003; Yao et al. 2003; Fottner et al. 2004).

Die Aktivierung des Rezeptors führt zu Autophosphorylierung und Tyrosinphosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) -1, -2, -3, -4. Das IRS-1 dient als Bindeprotein und kann verschiedene intrazelluläre Signalwege in Gang setzen (Delafontaine, Song, and Li 2004). In BON-Zellen ist vor allem das IRS-1 für die Vermittlung IGF-1-induzierter Signale zuständig (von Wichert et al. 2000).

1.2.2 IGF-1-Rezeptor vermittelte Signalwege

Akt-Signalweg

Eine der IGF-1-induzierten Kaskaden beinhaltet Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), Akt (auch Proteinkinase B genannt) und mammalian target of rapamycin (mTOR).

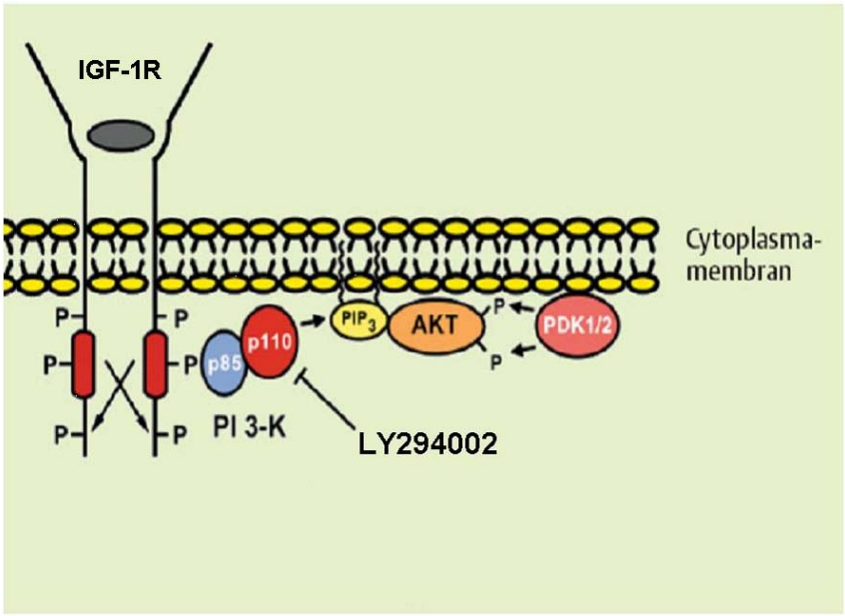


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Akt-Signalweges und des Wirkortes des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitors LY294002 (Verändert nach G.Thiel, O.G.Rössler.)
Der aktivierte Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor (IGF-1R) aktiviert die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K). PI3K ist eine membranständige Lipidkinase aus zwei Untereinheiten p85 und p110, die die Umwandlung von Phosphatityl-4,5-biphosphat (PIP_2) zu Phosphatidyl-3,4,5-triphosphat (PIP_3) katalysiert. Durch die Interaktion mit PIP_3 gelangt Akt in der Zelle zur Plasmamembran und wird dort von der Phosphoinositol-dependent Kinase (PDK) 1/2 phosphoryliert.
Der selektive Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitor LY294002 hemmt reversibel PI3K.

Das phosphorylierte IRS aktiviert die membranständige Lipidkinase PI3K bestehend aus zwei Untereinheiten, einer katalytischen p110 und einer regulatorischen p85. Ihre Aufgabe ist die Katalysierung der Umwandlung von Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP_2) zu Phosphotidylinositoltriphosphat (PIP_3) (Altomare and Testa 2005). Durch die Interaktion mit PIP^3 gelangt Akt zur Plasmamembran und wird dort von der Phosphoinositol-dependent Kinase 1/2 (PDK 1/2) phosphoryliert (Toker and Yoeli-Lerner 2006; Mora et al. 2004; Blume-Jensen and Hunter 2001). Diese Phosphorylierung steigert direkt die katalytische Aktivität von Akt.

Akt hat antiapoptotisch wirkende Substrate wie das Bcl-2-Antagonist of Cell Death (BAD) (Datta et al. 1997; del Peso et al. 1997) und das Murine double minute 2 (MDM2) (Zhou et al. 2001). Zusätzlich gelangt aktiviertes Akt in den Zellkern, wo es Transkriptionsfaktoren, die die Transkription apoptoserelevanter Gene regulieren, wie z.B. den Transkriptionsfaktor NF-κB oder Mitglieder der FoxO-Familie, phosphoryliert (Brunet et al. 1999).

Des Weiteren stimuliert aktiviertes Akt mTOR. Das mTOR-Protein ist eine Serin/Threonin-Kinase, die Proteinsynthese und Proliferation kontrolliert. Es spielt eine wichtige Rolle für den Übergang des Zellzyklus aus der G1- in die S-Phase. (Morgensztern and McLeod 2005).

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist ein aintiapoptotisches, wachstumsvermittelndes System, das in vielen Tumorzellen aktiv ist (Jacob et al. 2008) und wichtig für Zellüberleben, Wachstum, Motilität, Differenzierung sowie Tumorgenese ist (Toker and Newton 2000).

So zahlreich die Auswirkungen des PI3K/Akt/mTOR-Systems in der Zelle sind, so vielfältig sind auch die Möglichkeiten dieses System zu unterbrechen. Für die Experimente dieser Dissertation war v.a. der selektive PI3K-Inhibitor LY294002 von Bedeutung.

LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenylchromon) ist ein selektiver PI3K-Inhibitor. Durch eine reversible Hemmung der katalytischen Untereinheit p110 der PI3K hebt LY294002 die PI3K-Aktivität nahezu vollkommen auf (Vlahos et al. 1994).

Der Akt-Signalweg und der Angriffspunkt von LY294002 sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

ERK-Signalweg

Ein anderer wichtiger Signalweg, der durch IRS in Gang gesetzt wird, ist der ERK-Signalweg. Dieser beinhaltet Ras, Mitogen-activated-protein(MAP)-Kinase-Kinase-Kinase Raf, MAP-Kinase-Kinase (MEK) und extracellular signal-regulated Kinase (ERK).

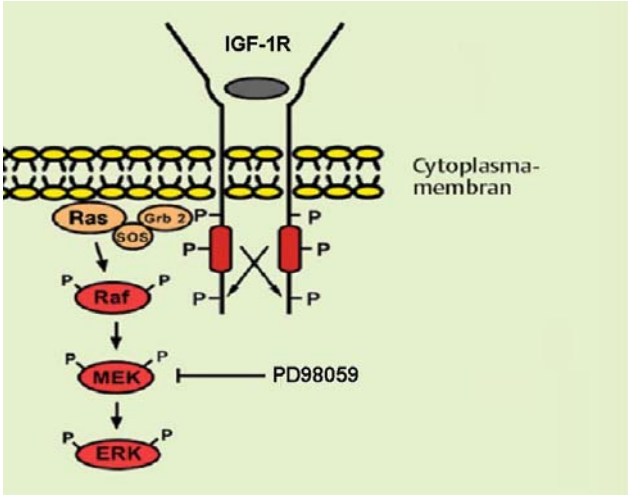


Abbildung 2: Schematische Darstellung des ERK-Signalweges und des Wirkortes des selektiven MEK-Inhibitors PD98059 (Verändert nach G.Thiel, O.G.Rössler.) Das extrazelluläre Signal durch Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF-1) wird über den IGF-1-Rezeptor (IGF-1R) ins Zellinnere geleitet und führt hier über ein Proteinkomplex aus Growth-factor-receptor-bound-protein 2 (Grb2) und Son-of-sevenless (SOS) zu einer Aktivierung von rat sarcoma viral oncogene homolog (Ras). Ras wiederum aktiviert die mitogen-activated-protein(MAP)-Kinase-Kinase-Kinase Raf. Das aktivierte Raf phosphoryliert die MAP-Kinase-Kinase (MEK) in einer Aktivierungs-Kaskade. Das aktivierte MEK phosphoryliert die mitogen-aktivierte extracellular signal-regulated Kinase (ERK).
Der Inhibitor PD 89059 hemmt selektiv MEK.

Durch Bindung von IGF-1 an den IGF-1R kommt es zur Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne. Die phosphorylierten Tyrosine dienen als Andockstelle für das zytosolische Adapterprotein Growth-factor-receptor-bound-protein 2 (Grb2), welches wiederum konstitutiv mit dem Ras-Nukleotid-Austauschfaktor Son-of-sevenless (SOS) assoziiert ist. Der Proteinkomplex aus Grb2 und SOS wird an die Membran rekrutiert und aktiviert Ras.

Ras ist ein Guanosintriphosphat(GTP)-bindendes Protein und fungiert als molekularer Schalter. Ras interagiert im GTP-gebundenen Zustand mit weiteren Effektoren. Durch Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) wird Ras wieder inaktiv. SOS aktiviert Ras, indem es die Freisetzung von GDP und den

anschließenden Austausch mit GTP ermöglicht. Ras wiederum aktiviert Raf. Entsprechend der Kaskade phosphoryliert Raf MEK, die ihrerseits ERK aktiviert.
ERK gehört zu der Familie der MAP-Kinasen. Das aktivierte ERK wirkt nun auf verschiedene Substrate im Zytoskelett, auf Phosphatasen, Kinasen, und Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielen (Kunnimalaiyaan and Chen 2006; Bentires-Alj, Kontaridis, and Neel 2006)
Der Signalweg aus Ras/Raf/MEK/ERK ist, wie auch der Akt-Signalweg, in viele zelluläre Prozesse, vor allem Proliferation, Differenzierung und Metabolismus, involviert (Lloyd 2006).
ERK liegt in den meisten Geweben in zwei Isoformen vor: ERK 1 und ERK 2. Die beiden Kinasen sind in ihrer Sequenz sehr ähnlich und es wird angenommen, dass sie eine funktionelle Redundanz aufweisen (Yoon and Seger 2006).
Der Aktivitätszustand des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs kann auf dem Elektrophoresegel mit Hilfe von aktivitäts-spezifischen Antikörpern (AK) in Doppelbanden detektiert werden, eine Bande für Phospho-ERK 1 und eine Bande für Phospho-ERK 2 (Lloyd 2006).
Auch der ERK-Signalweg lässt sich auf unterschiedliche Weisen hemmen. In dieser Arbeit wurde vor allem die Inhibition mit dem selektiven MEK-Inhibitor PD98059 verwendet. PD98059 (2`-amino-3`-methoxyflavon) ist ein synthetischer Inhibitor des MAP-Kinase-Signalweges (Dudley et al. 1995) und wird für die Erforschung der physiologischen Rolle von ERK1/2 genutzt.
PD98059 bindet an die inaktive Form von MEK und verhindert so die MEK-Aktivierung durch Raf und andere Aktivatoren (Alessi et al. 1995). Dieser Inhibitor konkurriert weder mit ATP, noch inhibiert er die Phosphorylierung von MEK. Wahrscheinlich hat er eine andere, noch unbekannte, Bindungsstelle an MEK (Kim, Abdelmegeed, and Novak 2006). Im Vergleich zu anderen bekannten Kinase-Inhibitoren bietet PD98059 eine hohe Selektivität (Davies et al. 2000).
Abbildung 2 zeigt schematisch den ERK-Signalweg und den Angriffspunkt von PD98059.
Der ERK-Signalweg lässt sich auch IGF-1-unabhängig aktivieren. Solche ERK-Aktivatoren sind u.a. Substanzen, die zur Gruppe der Phorbolester gehören. Phorbo-12-Myristat-13-Acetat (PMA) induziert über eine Proteinkinase C die

Aktivierung von ERK (Clark,J.A. 2004). Dieser Prozess läuft unabhängig von der IGF-Induktion ab.

1.3 Regulation neuroendokriner Sekretion in NETs

Chromogranin A ist ein 49 kDa Protein, das in neurosekretorischen Vesikeln des endokrinen, exokrinen und nervalen Systems zusammen mit Hormonen, Enzymen, Neuropeptiden und Neurotransmittern gespeichert ist (Taupenot, Harper, and O'Connor 2003) und auf bestimmte Reize hin sezerniert wird. Auch in neuroendokrinen Tumoren wird CgA mit Bioaminen zusammen gespeichert (Kulke et al. 2004). Es wird bei 95-99% Patienten mit endokrinen Neoplasien in erhöhten Mengen im Serum angetroffen.
Die Sekretion von CgA in BON-Zellen wird sowohl durch den Akt-, als auch durch den ERK-Signalweg positiv reguliert. Dabei unterliegt diese Funktion einem autokrinen IGF-1-Loop. Durch die selektiven Signalweginhibitoren LY294002 bzw. PD98059 kann die Sekretion von CgA gehemmt werden (von Wichert et al. 2000).
Bestimmte Substanzen steigern die CgA-Sekretion in BON-Zellen. Dazu gehört Phorbo-12-Myristat-13-Acetat (PMA), ein Phorbol-Ester (Jeng et al. 1991). Der PMA-induzierte Effekt wird durch die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) vermittelt (Zhang et al. 1995). PKC ist ein wichtiges regulatorisches Enzym, das eine bedeutende Rolle in Stimulations- und Sekretionsvorgängen in verschiedensten Zellarten spielt. Phorbol-Ester wie PMA binden an und aktivieren somit PKC (Zhang et al. 1995).

1.4 Rolle des IGF-1-Rezeptorinhibitors NVP-AEW541

In BON-Zellen ist die Interaktion von IGF-1 mit dem IGF-1R und die nachfolgende Aktivierung intrazellulärer Vorgänge ausschlaggebend für die Hormonsekretion. Auch die Zellproliferation der BON-Zellen unterliegt der IGF-1/IGF-1R-Interaktion (von Wichert et al. 2000). Somit stellt der IGF-1R einen wichtigen möglichen Angriffspunkt für neue therapeutische Substanzen in der Behandlung neuroendokriner Tumore dar.

Sog. „kleine Moleküle“, die zur Gruppe der Pyrrolol(2,3-d)pyrimidine gehören, hemmen die IGF-1R-*in-vitro*-Kinaseaktivität (Scotlandi et al. 2005). Eine dieser Verbindungen ist der selektive IGF-1R-Kinaseinhibitor NVP-AEW541. Diese Substanz hemmt die β-Untereinheit des IGF-1R und verhindert somit die Tyrosinkinaseaktivierung, Abbildung 3.

Die Effektivität und Selektivität dieser Substanz als Inhibitor des IGF-1R wurde mit verschiedenen rekombinanten Kinase-Domänen und synthetischen Peptidsubstanzen untersucht (Garcia-Echeverria et al. 2004).

NVP-AEW541 ist ein optimierter IGF-1R-Kinaseinhibitor, der selektiv zwischen dem IGF-1R und dem nahe verwandten Insulin-Rezeptor (Ins-R) unterscheidet. Die Affinität gegenüber dem IGF-1R auf zellulärer Ebene ist 27-fach höher als zum Ins-R (Garcia-Echeverria et al. 2004).

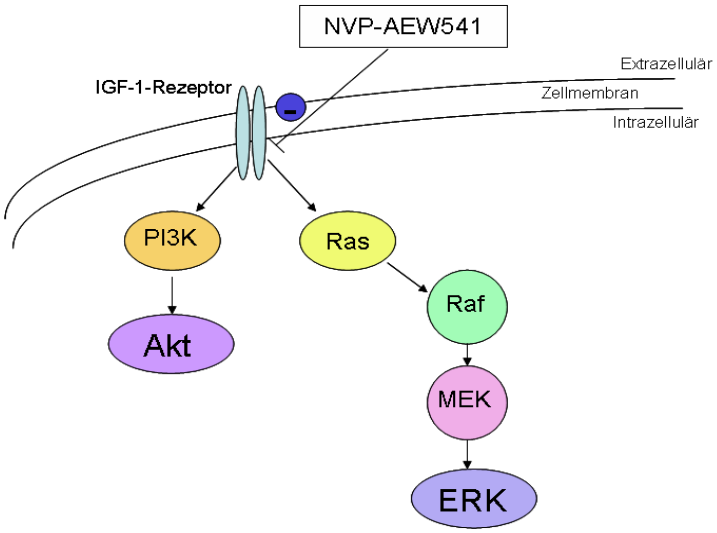


Abbildung 3: Wirkort des Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor-Inhibitors NVP-AEW541 (vereinfachte, schematische Darstellung). Über einen Liganden wird der Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor (IGF-1R) aktiviert und setzt intrazelluläre Kaskaden in Gang. Zum einen den Signalweg über Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Akt. Zu anderen einen Signalweg über rat sarcoma viral oncogene homolog (Ras), Mitogen-activated-protein(MAP)-Kinase-Kinase-Kinase (Raf), MAP-Kinase-Kinase (MEK) und extracellular signal regulated Kinase (ERK).
Der Inhibitor NVP-AEW541 hemmt selektiv den IGF-1R an der intrazellulären Einheit.

NVP-AEW541 inhibiert effektiv zellüberlebenswichtige Funktionen, die durch IGF-1 induziert werden. Zusätzlich hemmt NVP-AEW541 das substratunabhängige Wachstum von Tumorzellen (Garcia-Echeverria et al. 2004).

Der Phosphorylierungsgrad des IGF-1R hat Vorhersagewert für die Reaktion der Zellen auf NVP-AEW541 (Scotlandi et al. 2005). Nach Behandlung humaner Leukämiezellen mit NVP-AEW541 kommt es zu einer Herabregulation der Aktivität der IGF-1R-β-Untereinheit (Tazzari et al. 2007).
Weitere Studien zeigen, dass NVP-AEW541 selektiv IGF-1-vermitteltes Wachstum und IGF-1-vermittelte Signaltransduktion in Ewing-Sarkomzellen hemmt. Sarkomzellen exprimieren IGF-1R und werden parakrin und/oder autokrin durch IGF-1 stimuliert, ähnlich wie BON-Zellen (Scotlandi et al. 2005).

Unerwünschte Wirkung von NVP-AEW541

Unerwünschte Nebenwirkungen der IGF-1-Rezeptorblockade durch NVP-AEW541 ergeben sich aus der strukturellen Ähnlichkeit von IGF-1R und Ins-R. Der IGF-1R besteht, wie bereits erwähnt, aus einer α- und einer β-Untereinheit, die jeweils eine eigene Funktion haben. Aktiviert wird der Rezeptor durch seine verwandten Liganden, IGF-1 und -2, sowie von Insulin. Allerdings hat IGF-2 eine 2- bis 15-fach geringere, und Insulin eine 500- bis 1.000-fach schwächere Affinität zum IGF-1R.
Insulin kann aber durchaus als Ligand am IGF-1R wirken, da die Rezeptoren für Insulin und IGF-1 eine große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Die ATP Bindungsstelle von IGF1- und Insulinrezeptor zeigen eine 100%-ige Übereinstimmung der Aminosäurensequenz, die gesamte Kinase-Domäne ist immerhin noch zu 84% identisch (Garcia-Echeverria et al. 2004). Dies bedeutet, dass durch die Strukturähnlichkeit der Rezeptoren der IGF-1R-Inhibitor seine Wirkung auf beide Rezeptoren entfalten könnte. Sollte der Ins-R durch NVP-AEW541 gehemmt werden, würde das *in vivo* u.a. zu einem iatrogen induzierten Diabetes mellitus führen. Studien haben jedoch gezeigt, dass NVP-AEW541 eine wesentlich höhere inhibitorische Aktivität am IGF-1R als am Ins-R hat. NVP-AEW541 ist aktiver und selektiver als andere Pyrrol-2,3-Pyrrimidin-Derivate, was bereits in einer Serie von Tumorzelllinien untersucht wurde (Mitsiades et al. 2004).

1.5 Zielsetzung

BON–Zellen exprimieren funktionell aktive IGF-1R. Außerdem unterliegt in BON-Zellen das Zellwachstum und die Sekretion von CgA einer autokrinen IGF-1-Regulation (von Wichert et al. 2000).

Das Vorhandensein eines funktionellen IGF-1R und der endogenen IGF-1-Freisetzung im autokrinen Loop in neuroendokrinen Zellen, sowie die vom autokrinen IGF-1-Loop-abhängige CgA-Sekretion macht den IGF-1-Signalweg zu einem potentiellen Angriffspunkt für eine Behandlung der Hypersekretionssyndrome und des Wachstums von NETs.

Es wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass durch Einsatz eines spezifischen Anti-IGF-1-Antikörpers, der autokrines IGF-1 immunneutralisiert, die basale Aktivität von Akt und ERK in BON-Zellen deutlich gesenkt wird (von Wichert et al. 2000). Dieser Effekt entsprach dem der jeweiligen selektiven Kinase-Inhibitoren. Weiter wurde gezeigt, dass durch Immunneutralisation des endogenen IGF-1 in BON-Zellen eine wesentliche Reduktion der basalen CgA-Sekretion erzeugt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit soll mit Hilfe der BON-Zelllinie als Modell für NETs, untersucht werden, ob der selektive IGF-1-Tyrosinkinaseinhibitor NVP-AEW541 durch Hemmung des IGF-1R ähnliche Effekte erreicht wie die Immunoneutralisation von IGF-1 und sich somit als pharmakologische Therapieoption für neuroendokrine Tumore eignet.

Es soll gezeigt werden, wie sich eine Inhibierung des IGF-1R auf das Zellwachstum, die sekretorischen Fähigkeiten und intrazelluläre Vorgänge auswirkt und ob diese Effekte durch exogene Substanzen beeinflusst werden können.

Im Einzelnen wird der Einfluss des NVP-AEW541 auf den IGF-1R, die IGF-1-induzierten intrazellulären Signalwege Akt und ERK, die Sekretion von CgA und die Zellproliferation untersucht. Der Effekt auf die IGF-1-induzierten intrazellulären Signalwege und die CgA-Sekretion soll mit dem Effekt der jeweiligen selektiven Signalweginhibitoren verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Der Großteil aller Substanzen wurde in p.a. Qualität von den Firmen BioRad (Mannheim, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merk (Darmstadt, Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Auf weitere Bezugsquellen wird in der jeweiligen Methodenerklärung eingegangen.
Dulbecco`s Modified Eagles Medium (DMEM), Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) stammen von Gibco-Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland).

2.1.2 Puffer

Lysepuffer: Lysepuffer wurde immer an dem Tag des Gebrauchs frisch zusammengestellt und auf Eis bei 4°C gelagert. Es galt folgende Zusammensetzung: 10 mM Tris-HCL, pH 7,6, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM Na-Pyrophosphat, 50 mM NaF, 100 µM Na3VO4, 1% Triton. Benötigte Proteaseinhibitoren 10 µM AEBSF(4-(2-Aminoethyl)benzylsulfonylflourid), 10 µM Leupeptin und 10 µM Aprotinin wurden in Form einer Tablette complete Mini (Roche, Basel, Schweiz) für 10 ml Puffer zugegeben.
Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCL, pH 6,8 mit 4% Acrylamid
Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8 mit 10% Acrylamid
Trispuffer: 0,1 % SDS (w/v), 384 mM Glycin, 50 mM Tris
Transferpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
Lämmli-Puffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 0.1%SDS, pH 8.3

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Spezies	Spezifität	Verdünnung	Herkunft
Polyklonal Kaninchen	Phospho-Detect™ Anti-Insulin Rezeptor	1:1.000	Calbiochem Darmstadt, Deutschland
Polyklonal Kaninchen	Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor β (C-20): sc-713	1:1.000	Santa Cruz Santa Cruz, Kalifornien
Polyklonal Kaninchen	Phospho-p44/42 mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinase	1:1.000	Cell Signaling Boston, USA
Polyklonal Kaninchen	P44/42 mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinase	1:1.000	Cell Signaling Boston, USA
Monoklonal Kaninchen	Phospho-Akt (Ser 473)	1:1.000	Cell Signaling Boston, USA
Polyklonal Kaninchen	Akt	1:1.000	Cell Signaling Boston, USA
Polyklonal Kaninchen	Anti-human Chromogranin A	1:500	Dako Cytomation Glostrup, Dänemark

2.1.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Spezies	Spezifität	Verdünnung	Herkunft
Kaninchen	IgG Peroxidase Konjugat	1:3.000	BioRad Mannheim, Deutschland

2.1.4 Inhibitoren

Tabelle 4: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Wirkort	Konzentration	Herkunft
NVP-AEW541	Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor (IGF-1R)	2,5 µM	Novartis Basel, Schweiz
LY294002	Phosphatidylinositol 3 Kinase	25 µM	Cell Signaling Boston, USA
PD98059	mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinase	15 µM	Calbiochem Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Aktivatoren und Stimulatoren

Tabelle 5: Verwendete Aktivatoren und Stimulatoren

Aktivator	Wirkort	Konzentration	Herkunft
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Protein Kinase	400 nM	Sigma Deisenhofen, Deutschland
Insuline-like Growth Factor 1 (IGF 1)	Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor (IGF-1R)	100 nM	PeproTech Inc. New York, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Experimente dieser Arbeit wurden an der Zelllinie BON durchgeführt. BON-Zellen wurden aus einer Lymphknotenmetastase eines Pankreaskarzinoids isoliert (Evers et al., 1994) und dienen als Modell für neuroendokrine Tumorzellen.
Die Zellen wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FKS; PAA) und 1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (Pen/Strep) kultiviert und im

Brutschrank bei 37°C sowie 5% CO_2 inkubiert. Etwa alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin (Serva) passagiert.

2.2.1.1 Zellzählungen (Proliferationsversuche)

Zur Erstellung von Wachstums- oder Dosis-Wirkungs-Kurven wurden Zellzählungen durchgeführt. Eine Zählung erstreckte sich über sieben Tage, darum wurden pro Bedingung in sieben Schalen, ein cm im Durchmesser, je 10^4 Zellen ausplatiert und als erster Wert die anfänglichen 10^4 Zellen vermerkt, so dass nach Ablauf des Versuches acht Werte für ein Diagramm zur Verfügung standen. Ein Plateau des Zellwachstums wurde in diesem Zeitraum erreicht. Die Zellen wurden über sieben Tage an jedem Tag gezählt.

Zur Erstellung der Wachstumskurve wurden die Zellen mit 2,5 µM IGF-1-Rezeptor-Inhibitor NVP-AEW541, gelöst in DMSO, inkubiert. Für eine Kontrollreihe wurden ebenfalls in sieben Schalen je 10^4 Zellen ausplatiert, die jedoch keine weitere Substanzzugabe erhielten. Alle Zellen wurden über die ganze Versuchsdauer im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. An jedem der folgenden Tage wurde eine Schale pro Bedingung mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin suspendiert. Mit Hilfe der Neubauer`schen-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. An jedem zweiten bis dritten Tag wurde bei den noch restlichen Schalen einen Mediumwechsel mit erneuter Inhibitorzugabe durchgeführt, um die gleichen Wachstumsbedingungen zu erhalten.

Für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden ebenfalls in sieben Schalen, ein cm im Durchmesser, je 10^4 Zellen ausplatiert und mit einer aufsteigender Reihenfolge von Inhibitor-Konzentrationen inkubiert: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0 µM. Am fünften Tag nach der Inhibitorzugabe wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer`schen-Zählkammer ausgezählt.

Beide Versuche wurden drei Mal durchgeführt und ausgewertet.

2.2.2 Vorbereitung der Zellen und Behandlung mit Inhibitoren

Es wurden in 12 10-ml-Kulturschalen (Durchmesser 10 cm) à $1*10^4$ Zellen ausplatiert und solange inkubiert bis eine Konfluenz von 75% erreicht wurde. Ein Mediumwechsel wurde durchgeführt und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert.

Auf diese Weise wurde eine gleichmäßige Bewachsung der Schalen auf 75% erreicht, gleichzeitig war der CgA-Gehalt im Überstand aller Schalen gleich, so dass für alle Versuchsbedingungen die gleichen Voraussetzungen geschaffen wurden.

Am Tag nach dem Mediumwechsel wurden drei Schalen mit IGF1-Rezeptor-Inhibitor NVP-AEW541, drei Schalen mit Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor LY294002, drei Schalen mit MAP-Kinase-Inhibitor PD98059 für eine Stunde inkubiert. Die restlichen drei Schalen wurden mit keinen weiteren Substanzen versetzt. Im Anschluss an die Inhibitorbehandlung wurde in je eine der mit NVP-AEW541, LY294002, PD98059 versetzten Schalen und eine der unbehandelten Schalen IGF1 zugegeben. Weitere vier Schalen bekamen eine Zugabe von PMA. Die restlichen vier Schalen verblieben ohne zusätzliche Behandlung (Abbildung 4). Alle zwölf Zellkulturschalen wurden für eine Stunde unter üblichen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank zurückgelassen.

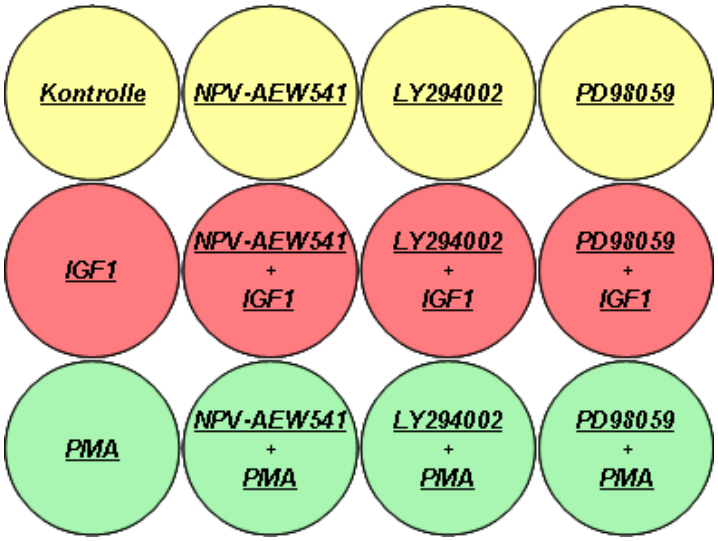


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Proben: Zellen in den Schalen wurden, wie dargestellt, mit den beschriebenen Chemikalien und Kombinationen versetzt. Selektiver Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor-Inhibitor NVP-AEW541 (NVP-AEW541), selektiver Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor LY204002 (LY294002), selektiver MEK-Inhibitor PD98059 (PD98059), Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF1), Phorbo-12-Myristat-13-Acetat (PMA). Kontrolle erhielt keine Wirtstoffe.

2.2.3 Herstellung der Zelllysate

Die nach der Beschreibung in 2.2.2 präparierten Zellen wurden nun zu Zelllysaten verarbeitet. Alle dazu nötigen Schritte erfolgten bei 4°C. Als Erstes wurde der Mediumüberstand jeder einzelnen Schale in einen separaten Falkon-Behälter überführt. Das weitere Vorgehen, den Überstand betreffend, wird in 2.2.3.1 näher beschrieben. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 500 ml Lysepuffer versetzt und für 10 min lysiert.
Die Lysate wurden in Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand jeder einzelnen Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, mit sechsfachem Lämmli-Puffer (Laemmli,U.K. 1970) versetzt und für fünf min bei 95°C denaturiert.

2.2.3.1 Proteinkonzentrationsmessung

Um in allen Proben die gleiche Proteinmenge zu erhalten, wurde mit allen Proben vor Zugabe des Lämmli-Puffers ein Bradford-Test durchgeführt und die Proben daraufhin angepasst. Zunächst wurde hierfür die Bradford Lösung (BioRad) 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und je ein ml dieser Verdünnung in Plastikküvetten (Plastibrand) überführt. Mit Hilfe von BSA in Konzentrationen von 0 bis 10 µg ließ sich eine Standardkurve erstellen. Je zwei µl jeder Probe wurden in eine Küvette mit der verdünnten Bradford Lösung gegeben und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe ließ sich nun an der Standardkurve ableiten. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden durch Zugabe von Lysepuffer angeglichen.

2.2.3.2 Herstellung der Proben zu Bestimmung des CgA-Gehaltes im Mediumüberstand

Die in 2.2.3.1 gewonnenen Mediumüberstände wurden bei 4°C 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, 250 µl des Überstandes wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit sechsfachem Lämmli-Puffer versetzt und bei 95°C fünf min denaturiert.

2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine in den Proben wurde ein diskontinuierliches SDS-Elektrophoresesystem nach Lämmli angewandt. Die Sammelgeltaschen (Sammelgelpuffer mit 4% Acrylamid) wurden mit 30 µg pro Probe befüllt. Bei den Proben aus dem Mediumüberstand wurden immer 7,5 µl pro Tasche eingebracht, die aufgetragene Proteinmenge wurde in einem angeschlossenen Coomassie-Assay (Beschreibung in 2.2.6) überprüft. Dem Sammelgel aus Sammelgelpuffer schloss sich das Trenngel aus Trenngelpuffer (10% Acrylamid) an. Für die Bestimmung der Molekulargewichte wurden die Proteingrößenstandards BENCHMARK *prestained protein ladder* (10-200 kDa, Life Technologies, San Diego, USA) oder Protein-*ladder* (11-170 kDa, Fermentas, Burlington, Kanada) verwendet. Die Elektrophorese wurde in Anwesenheit eines Trispuffers bei 150 V für eine Stunde durchgeführt.

2.2.5 Western Blot

Nach der Durchführung der SDS-Elektrophorese wurden die nun aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Dies geschah in Anwesenheit eines Transferpuffers bei 400 mA für sechs Stunden. Auf diese Weise wurden die im Gel enthaltenen Proteine auf die Membran übertragen. Die Immundetektion der untersuchten Proteine erfolgte mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen Zweitantikörpern nach Standardprotokollen.

Nach Ablauf des Transfers wurde die nun proteinbeladene Membran für 30 min bei Raumtemperatur in PBS mit 5% BSA inkubiert, um noch freie Bindungsstellen zu blocken. Im Anschluss daran wurden die Membranen in 5% BSA in TBS/0,1% Tween20 (TBS-Tween) mit einem Primärantikörper (aus 2.1.2.1) in der entsprechenden Verdünnung bei 4°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Im Falle des Anti-human-Chromogranin-A-Antikörpers erfolgte die Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden.

Daraufhin wurden die Membranen drei mal 10 min mit TBS-Tween gewaschen, für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem

Anti-Kaninchen IgG Antikörper in TBS-Tween als Sekundärantikörper (aus 2.1.2.2) behandelt und erneut drei mal 10 min mit TBS-Tween gewaschen.
Um die auf der Membran gebundenen Immunkomplexe sichtbar zu machen, wurden die Membranen in die Substratlösung SuperSignal Pico (Pierce, Rockford, USA) getaucht und anschließend im Chemilumineszenz-System ChemiSmart 5.000 (PeqLab, Erlangen, Deutschland) für 1 bis 20 min exprimiert.
Um dieselbe Membran auch mit anderen Antikörpern inkubieren zu können, wurde die Membran mit Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, USA) für ca. fünf min behandelt und anschließend drei mal 10 min mit TBS-Tween gewaschen. Danach wurde wie bei einer frisch transferierten Membran vorgegangen.

Quantifizierung und Darstellung der Ergebnisse

Für die Quantifizierung der Western Blots wurde Chemi-Capt 12,8 (Vilber Lourmat) und Bio1D 12,04 (Vilber Lourmat) angewandt.
Jeder Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Zunächst wurde die Signalstärke der phosphorylierten Form, dann die der unphosphorylierten ermittelt und in Relation gestellt. Im Diagramm wurde der Mittelwert relativ abgebildet. Mit Hilfe von Fehlerbalken wurde der Standardfehler ausgedrückt.

Statistik

Für die Signifikanzberechnung wurden die Medianwerte berechnet und aus diesen eine p-Wert-Berechnung mittels Student`s t-Test durchgeführt. Dafür wurden die Programme Excel und SPSS 15.0 für Windows (Microsoft) verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 angesehen.

2.2.6 Coomassie

Zur Darstellung der geladenen Proteinmenge in den Western Blots für den CgA-Gehalt im Mediumüberstand wurde ein Coomassie-Assay durchgeführt. Die Gele wurden folgender Maßen beladen: pro Bedingung wurden 7,5 µl der Probe, wie auch im Western Blot zum CgA-Gehalt, in die Geltasche geladen. Als Vergleichswert wurde BSA verwendet. Die BSA-Proben in verschiedenen

Konzentrationen, hier 10, 20 und 30 µg, wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und auf das gleiche Gel wie die CgA-Proben geladen, zur Trennung der beiden Gruppen wurde ein Marker aufgetragen. Nun wurde das beladene Gel der Elektrophorese unterzogen.
Um nun die aufgetrennten Proteine sichtbar machen zu können, wurde das ganze Gel in eine Coomassie-Färbelösung (0,5 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau, 7% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Methanol) für eine Stunde getaucht. Coomassie-Brillant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an das basische Seitenende der Aminosäuren anlagert und somit die Proteine unspezifisch anfärbt.

2.2.7 IGF1-Dosis-Wirkungs-Beziehung

In fünf 10-ml-Kulturschalen wurden je 10^4 Zellen platiert und solange inkubierte bis sie ein Konfluenz von 75% erreichen. Ein Mediumwechsel wurde durchgeführt und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert.
In aufsteigender Konzentration wurde IGF1 in die Schalen gegeben: 0; 50; 100; 200; 500 nM IGF1 und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert.
Im Anschluss wurden, wie oben beschrieben, Zelllysate angefertigt, mit den oben genannten spezifischen AK inkubiert und die Chemoluminiszenz-Signale quantifiziert.
Für die Dosis-Wirkung von IGF-1 auf CgA-Sekretion wurde der Überstand der mit entsprechender IGF-1-Konzentration inkubierten Zellen verarbeitet und analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkung von NVP-AEW541 auf Zellproliferation

Autokriner IGF-1-Loop ist maßgeblich an der Zellproliferation und dem Zellwachstum von BON-Zellen beteiligt. Durch Aktivierung des IGF-1R werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die zu Zellproliferation führen.
Zunächst ermittelten wir ob und in welcher Konzentration der Inhibitor NVP-AEW541 seine Wirkung auf BON-Zellen entfaltet. In Abbildung 5 ist die Wirkung verschiedener Konzentrationen des Inhibitors auf die Zellzahl am fünften Tag der Inkubation dargestellt.

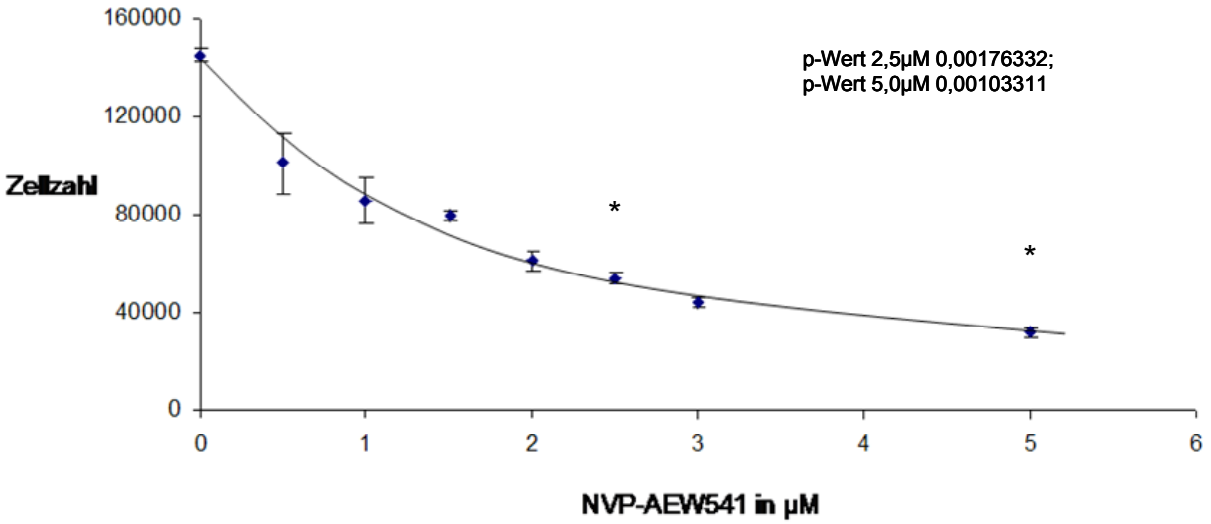


Abbildung 5: Dosis-Wirkungs-Kurve für Inhibition mit NVP-AEW541. BON-Zellen wurden zu 10^4 Zellen pro Schale ausplatiert und fünf Tage lang mit unterschiedlichen Konzentrationen, 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0 µM des Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor-Inhibitors NVP-AEW541 behandelt und am fünften Tag ausgezählt. Dargestellt ist ein Durchschnitt aus drei unabhängigen Zählungen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Signifikanzen werden durch p-Wert für Zellzahl bei Inhibierung mit 2,5 bzw. 5,0 µM angegeben. * drück $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

Es wurde eine aufsteigende Reihenfolge der Inhibitor-Konzentrationen angelegt: 0, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0 µM. Immer die gleiche Zellzahl, 10.000 Zellen, wurde mit einer Konzentration an NVP-AEW541 inkubiert. Am fünften Tag wurden die Zellen ausgezählt.

Während die unbehandelten Zellen ungehindert proliferieren konnten und die Zellzahl von 10.000 auf knapp 150.000 stieg, war die Zunahme der Zellzahl der Inhibierten Zellen deutlich geringer.

Je höher die Konzentration an Inhibitor in der Schale vorlag, desto höher war der Hemmeffekt auf das Zellwachstum. Bei einer Inhibitorkonzentration von 2,5 µM war nur noch ungefähr die Hälfte der maximalen Zellzahl vorhanden, was eine signifikante Hemmung des Zellwachstums darstellt (p=0,01).

Als Nächstes prüften wir die Entwicklung der Zellzahl unter Inhibierung mit 2,5 µM NVP-AEW541 über eine Dauer von acht Tagen. Täglich wurde die Zellzahl bestimmt. Abbildung 6 stellt das Ergebnis dar.

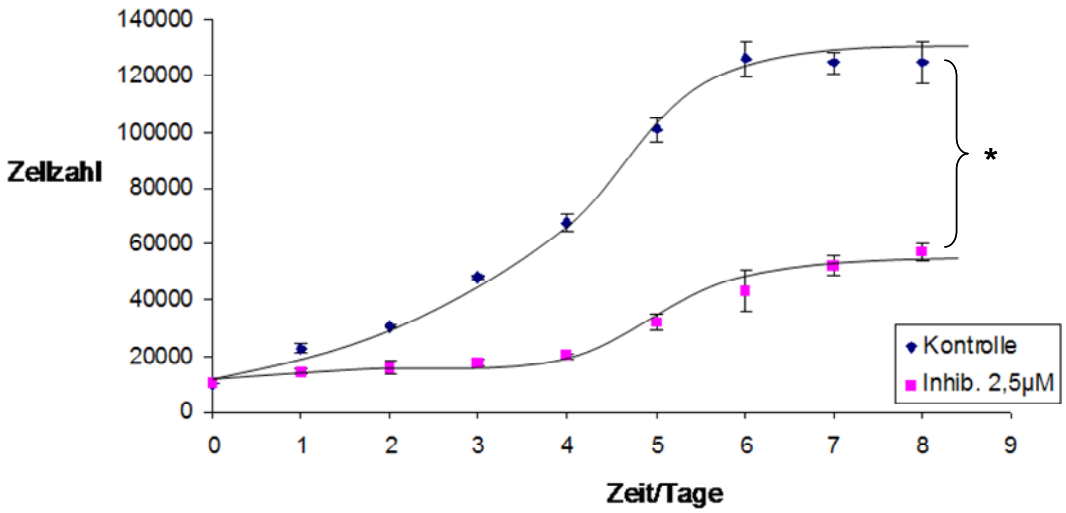


Abbildung 6: Zellproliferation im Zeitverlauf mit und ohne Inhibitor. 10^4 BON-Zellen pro Schale wurden mit 2,5 µM-Konzentration des Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor(IGF-1R)-Inhibitors NVP-AEW541 behandelt. Eine Kontrolllinie erfuhr keine Behandlung mit dem IGF-1R-Inhibitor. An jedem der acht Tage wurde die Zellzahl bestimmt. Abgebildet ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Zählungen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

Während die Anzahl der unbehandelten Zellen über die Versuchsdauer von anfänglichen 10.000 auf ein Plateau von ca. 120.000 anstieg, stellte sich das Wachstum der inhibierten Zellen nach acht Tagen bei einem Plateau von ca. 50.000 Zellen ein.

Somit zeigte sich, dass NVP-AEW541 nach einer Wachstumszeit von acht Tagen eine signifikante Hemmung (p=0,021) der Zellproliferation bewirkt. Unter

Inhibitorzugabe kommt es nicht zum Eintritt der Zellen in die Log-Phase der Zellproliferation.
Beide Versuche wurden dreimal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt und jeweils eine Grafik aus dem Durchschnitt dieser drei Werte angefertigt.

3.2 Wirkung von exogenem IGF-1 auf IGF-1R, intrazelluläre Signalwege und die CgA-Sekretion

Die intrazellulären Signalwege der BON-Zellen werden größtenteils über endogen freigesetztes IGF-1 reguliert. Dazu verfügen sie über einen autokrinen IGF-1-Loop. Wir untersuchten, ob neben endogenem IGF-1 auch exogen zugefügtes IGF-1 intrazelluläre Vorgänge in den BON-Zellen beeinflussen, bzw. weiter steigern, kann. So sollte überprüft werden, ob externe Stimuli das Aktivitätsniveau des Rezeptors und der zu untersuchenden Signalkaskaden, sowie die CgA-Sekretion beeinflussen können.

3.2.1 Wirkung von exogenem IGF-1 auf IGF-1R

Um zu prüfen ob exogenes IGF-1 die basale IGF-1R-Aktivität beeinflussen kann, inkubierten wir BON-Zellen mit IGF-1 in Konzentrationen von 50 bis 500 nM. Die Proteine der so behandelten BON-Zellen wurden extrahiert und einer Western Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-IGF-1R-Primärantikörper (Phospho-IGF-1R) unterzogen. Dieser AK detektiert autophosphorylierte β-Untereinheit des Rezeptors und damit den aktiven IGF-1R. Danach wurde mit Hilfe eines Anti-IGF-1R-β-Primärantikörpers (IGF-1Rβ), der alle ß-Untereinheiten von IGF-1R detektiert, die in den Proben enthaltene IGF-1R-Menge gezeigt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 7 dargestellt.

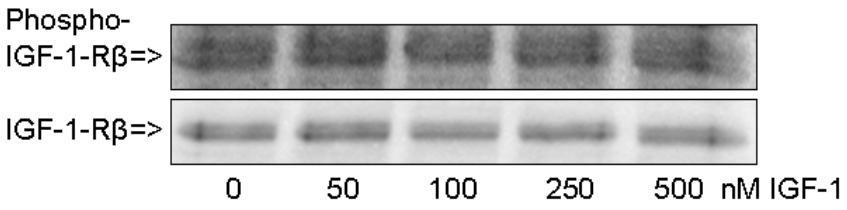


Abbildung 7: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF-1) auf den Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor (IGF-1R). BON-Zellen wurden eine Stunde mit 0; 50; 100; 200 und 500 nM IGF-1 inkubiert. Ganzzelllysate wurden angefertigt und eine Western Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-IGF-1-Rβ-Antikörper durchgeführt. Dieser detektiert autophosphorylierte β-Untereinheit des Rezeptors und damit den aktiven IGF-1R (Phospho-IGF-Rβ) (Oberer Blot). Total-IGF-1R (IGF-1-Rβ) wurde mit Anti-IGF-1-Rβ-Antikörper dargestellt (Unterer Blot).

Exogenes IGF-1 in verschiedenen Dosierungen führte zu keiner weiteren Steigerung der Phosphorylierung des IGF-1-Rezeptors. Allein durch endogen freigesetztes IGF-1 wird offenbar eine so hohe basale Phosphorylierungsrate des IGF-1R erreicht, dass eine weitere Steigerung durch exogenes IGF-1 nicht möglich war. Auch höhere Konzentrationen von 500 nM können die basale IGF-1R-Aktivität nicht weiter steigern (Daten nicht gezeigt).

Die Phosphorylierung des IGF-1R durch seinen Liganden IGF-1 induziert unterschiedliche intrazelluläre Signalwege. In dieser Dissertation wurden zwei dieser Kaskaden betrachtet: PI3K/Akt/mTOR und Ras/Raf/MEK/ERK. Es sollte weiter untersucht werden, ob exogenes IGF-1 die Aktivierung intrazellulärer Signalwege beeinflusst.

3.2.2 Wirkung von exogenem IGF-1 auf Akt-Phosphorylierung

Nach der IGF-1R-Aktivierung kommt es durch Phosphorylierung der membranständigen PI3K über mehrere Schritte zur Aktivierung von Akt.

Durch Stimulation mit exogenem IGF-1 in unterschiedlichen Konzentrationen von 50 bis 500 nM überprüften wir, ob sich die basale Aktivität von Akt in BON-Zellen steigern lässt. Zelllysate wurden mit einem spezifischen Anti-Phospho-Akt-Antikörper (Phospho-Akt) inkubiert. Dieser AK detektiert die phosphorylierte Form von Akt, die die Aktivierung repräsentiert. Akt-Protein wurde mit Hilfe des

spezifischen Anti-Akt-Antikörpers (Akt) dargestellt. Abbildung 8 präsentiert das Ergebnis.

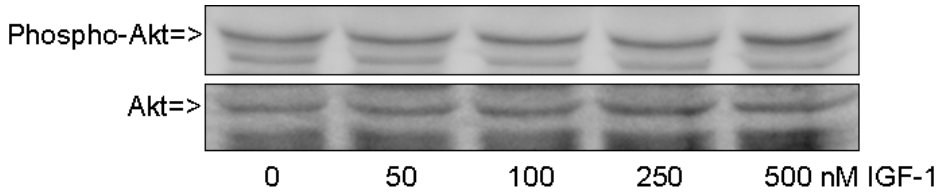


Abbildung 8: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Insulin-like-Growth-factror-1 (IGF-1) auf Akt-Phosphorylierung. BON-Zellen wurden eine Stunde mit 0; 50; 100; 200 und 500 nM IGF-1 inkubiert. Ganzzelllysate wurden angefertigt und eine Western Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-Akt-Antikörper durchgeführt Dieser detektiert die phosphorylierte Form von Akt (Phospho-Akt) (Oberer Blot). Total-Akt (Akt) wurde mit Anti-Akt-Antikörper dargestellt (Unterer Blot).

Akt wurde durch zugegebenes IGF-1 nicht zusätzlich phosphoryliert. Somit wurde durch endogenes IGF-1 bereits ein hohes Aktivitätsniveau von Akt erreicht, das nicht durch exogenes IGF-1 weiter gesteigert werden kann.
Auch höhere IGF-1-Konzentrationen von 500 nM steigerten die Akt-Phosphorylierung nicht weiter (Daten nicht gezeigt).
Neben dem PI3K/Akt-Signalweg untersuchten wir einen zweiten IGF-1 induzierten Signalweg, die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade.

3.2.3 Wirkung von exogenem IGF-1 auf ERK-Phosphorylierung

ERK wird nach Phosphorylierung des IGF-1R über die Aktivierung des mitogen aktivierten Proteins (MEK) selbst phosphoryliert. Wie sich exogen zugefügtes IGF-1 über den IGF-1R auf diesen Signalweg auswirkt, untersuchten wir mit Hilfe einer aufsteigenden IGF-1-Konzentrationsreihe von 50 bis 500 nM.
Die Proben der BON-Zellen wurden mit einem spezifischen Anti-Phospho-ERK-Antikörper (Phospho-ERK) behandelt. Dieser AK richtet sich gegen phosphorylierte, aktive MAP-Kinasen. Auf dem Elektrophoresegel ließen sich mit Hilfe des Phospho-spezifischen Antikörpers Doppelbanden detektieren, eine für Phospho-ERK 1 (44 kDa) und eine für Phospho-ERK 2 (42 kDa). Beide Banden wurden zusammen genommen, um die gesamte ERK-Aktivität darzustellen

Ein spezifischer Anti-ERK-Antikörper (ERK) detektierte das ERK1/2-Gesamtprotein. Abbildung 9 stellt die Ergebnisse dar.

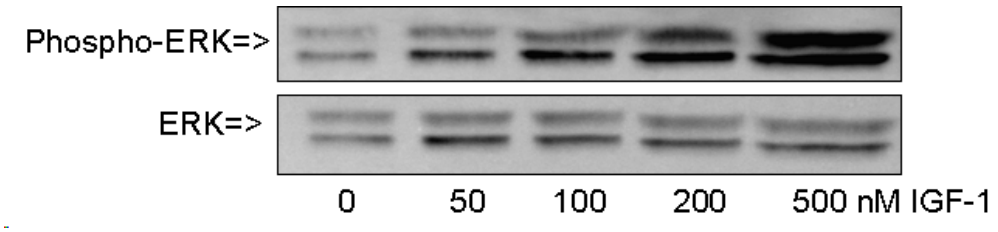


Abbildung 9: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF-1) auf extracellular signal regulated Proteinkinase(ERK)-Phosphorylierung. BON-Zellen wurden eine Stunde mit 0; 50; 100; 200 und 500 nM IGF-1 inkubiert. Ganzzelllysate wurden angefertigt und eine Western Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-ERK-Antikörper durchgeführt. Dieser detektiert phosphorylierte, aktive MAP-Kinasen (Phospho-ERK). (Oberer Blot). Total-ERK (ERK) wurde mit Anti-ERK-Antikörper dargestellt (Unterer Blot). Dargestellt sind Doppelbanden (ERK1, ERK2)

Anders als bei Akt und IGF-1R ließ sich eine Aktivitätssteigerung von ERK in der mit exogenem IGF-1 behandelten Probe im Vergleich zu den Kontrollzellen erzielen.

Bereits mit einer Konzentration von 50 nM an IGF-1 konnte eine Steigerung der basalen ERK-Aktivität induziert werden. Mit 100 nM IGF-1 konnte die ERK-Aktivität weiter gesteigert werden. Höhere Konzentrationen von 200 oder 500 nM führten zu weiteren Phosphorylierungssteigerung.

3.2.4 Wirkung von exogenem IGF-1 auf CgA-Sekretion

Nachdem die Wirkung von exogenem IGF-1 auf die intrazellulären IGF-1 induzierten Signalwege in den BON-Zellen untersucht wurden, galt es nun herauszufinden, ob exogenes IGF-1 auch einen Einfluss auf die neuroendokrine Sekretion in diesen Zellen hat. Beurteilen ließ sich diese Wirkung an Hand der Sekretion von CgA in den Mediumüberstand der Zellen. BON-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an IGF-1, zw. 50 und 1000 nM, inkubiert. Das sezernierte CgA wurde mit Hilfe eines Anti-CgA-Antikörpers detektiert. Das im

Mediumüberstand vorhandene Gesamtprotein wurde mittels Coomassie-Färbung dargestellt. Abbildung 10 zeigt das Resultat.

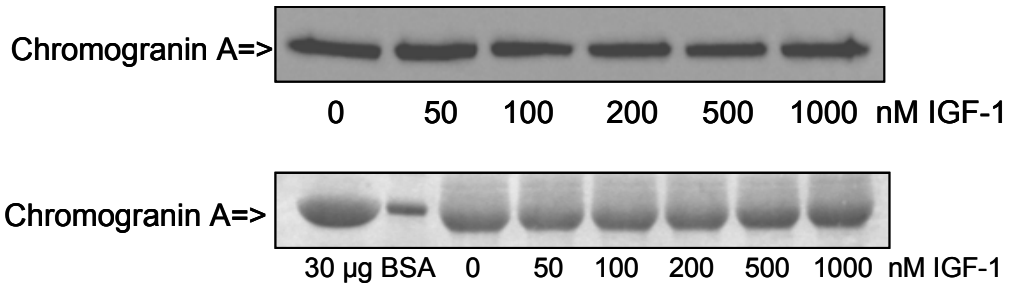


Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF-1) auf Chromogranin-A. BON-Zellen wurden eine Stunde mit 0; 50; 100; 200, 500 und 1000 nM IGF-1 inkubiert. Proben aus Mediumüberstand wurden angefertigt und eine Western Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Chromogranin-A-Antikörper durchgeführt (Oberer Blot). Zur Ladekontrolle wurde ein Coomassie-Assay mit 30 µg bovinem Serumalbumin (BSA) durchgeführt (Unterer Blot).

Die CgA-Konzentration in der Kontrolle und in den mit exogenem IGF-1 stimulierten Bedingungen waren gleich, was darauf hindeutet, dass sich die CgA–Sekretion in den Zellkulturüberstand nicht durch exogenes IGF-1 weiter steigern lässt. Auch höhere IGF-1-Konzerntrationen als 1.000 nM führten nicht zu weiteren Anstiegen der basalen CgA-Sekretion in BON-Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.1 PMA und die CgA-Sekretion in BON-Zellen

Bereits 1991 konnte Jeng et. al. zeigen, dass zu den Stimulatoren der CgA-Sekretion in BON-Zellen Phorbol-Ester-Verbindungen gehören, wie z.B. Phorbo-12-Myristat-13-Acetat (PMA). Der PMA-induzierte Effekt wird, laut einer weiteren Studie, durch eine Aktivierung von PKC vermittelt.

Im folgenden Versuch bestimmten wir den CgA-Gehalt im Medium der Zellkulturschalen unter Kontrollbedingungen, nach IGF-1-Inkubation und nach PMA–Stimulation der Zellen. Die für diesen Versuch benötigten Proben wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, angefertigt und analysiert. Das Ergebnis wird in Abbildung 11 A und B präsentiert.

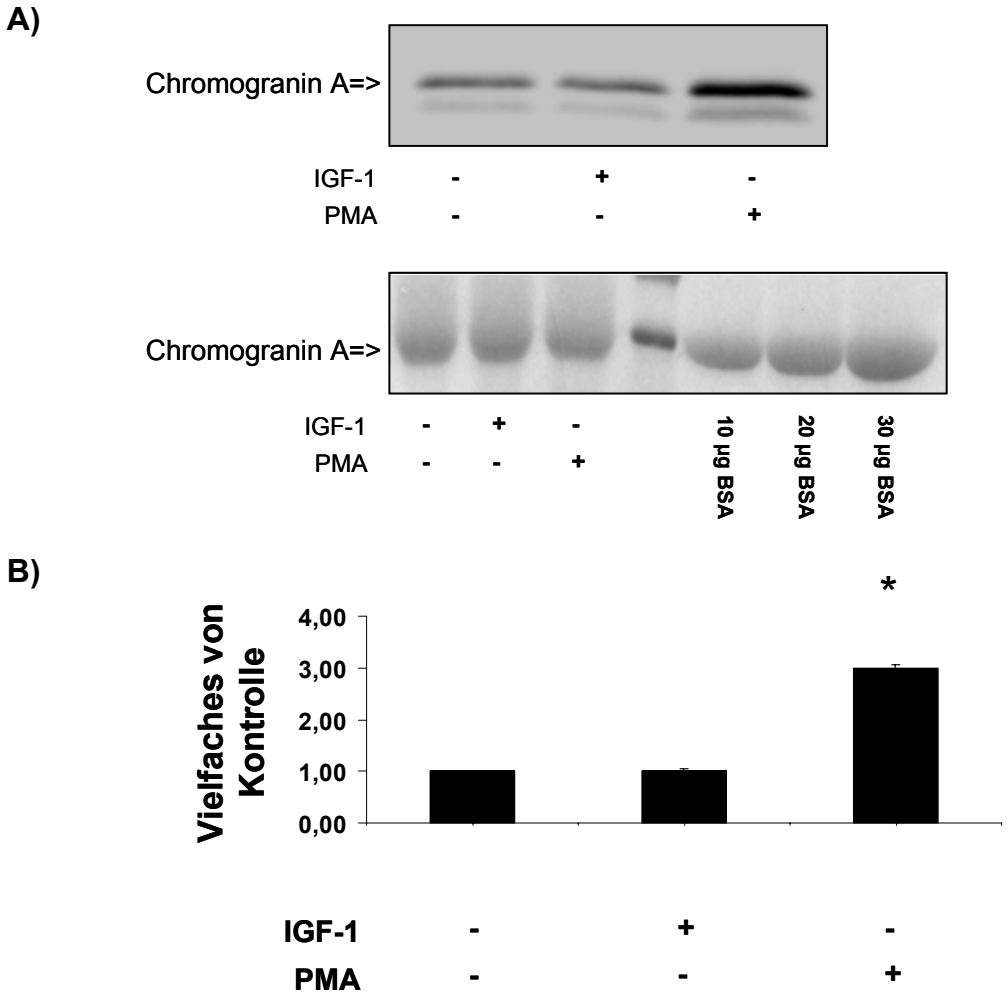


Abbildung 11: Chromogranin-A(CgA)–Sekretion unter Kontrollbedingungen, nach Stimulation mit exogenem Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF-1) und nach Phorbol-12-Myristat-13-Acetat(PMA)-Stimulation.

A) BON-Zellen wurden eine Stunde mit 100 nM IGF-1 oder 400 nM PMA inkubiert. Proben aus Mediumüberstand wurden angefertigt und eine Western Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-CgA-Antikörper durchgeführt (Oberer Blot). Zur Ladekontrolle wurde ein Coomassie-Assay mit 10, 20 und 30 µg bovinem Serumalbumin (BSA) durchgeführt (Unterer Blot).

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

Die Stimulation mit PMA zeigte eine signifikante ($p=0,0018$) Erhöhung des CgA-Gehaltes um ca. das dreifache im Überstand der mit PMA inkubierten Zellen, im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Stimulation mit IGF-1 führte, wie schon zuvor gezeigt, zu keinem signifikanten zusätzlichen Effekt.

3.3 Einfluss von NVP-AEW451 auf basale Phosphorylierung von IGF-1R in BON-Zellen

Wir konnten zeigen, dass exogen zugefügtes IGF-1 die basale Aktivität des IGF-1-Rezeptors der BON-Zellen nicht weiter steigern kann. Von den untersuchten intrazellulären Signalwegen wird der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg durch exogenes IGF-1 stimuliert, während die Aktivität von PI3K/Akt/mTOR nicht weiter gesteigert werden kann. Auch die basale CgA-Sekretion der BON-Zellen kann durch exogenes IGF-1 nicht erhöht werden, jedoch durch PMA, das die Sekretion wahrscheinlich über andere Mechanismen induziert als das IGF-System.

Als nächstes untersuchten wir, ob der autokrine IGF-1-Loop der BON-Zellen durch den selektiven IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 unterbrochen werden kann. Zuerst sollte die Wirkung des Inhibitors auf die Aktivität des IGF-1R in BON-Zellen untersucht werden.

Dazu inkubierten wir BON-Zellen mit NVP-AEW541, exogenem IGF-1 und PMA. Weitere Zellen wurden nach Inkubation mit NVP-AEW541 zusätzlich mit exogenem IGF-1 oder PMA versetzt. Abbildung 12 A zeigt die Ergebnisse eines Western Blots mit einem spezifischen Anti-Phospho-IGF-1R-Antikörper, der den phosphorylierten, d.h. aktiven, IGF-1R detektiert und eine Western-Blot-Kontrolle unter Verwendung eines Antikörpers gegen den IGF-1R. Die Grafik in Abbildung 12 B gibt das Ergebnis quantifiziert wieder.

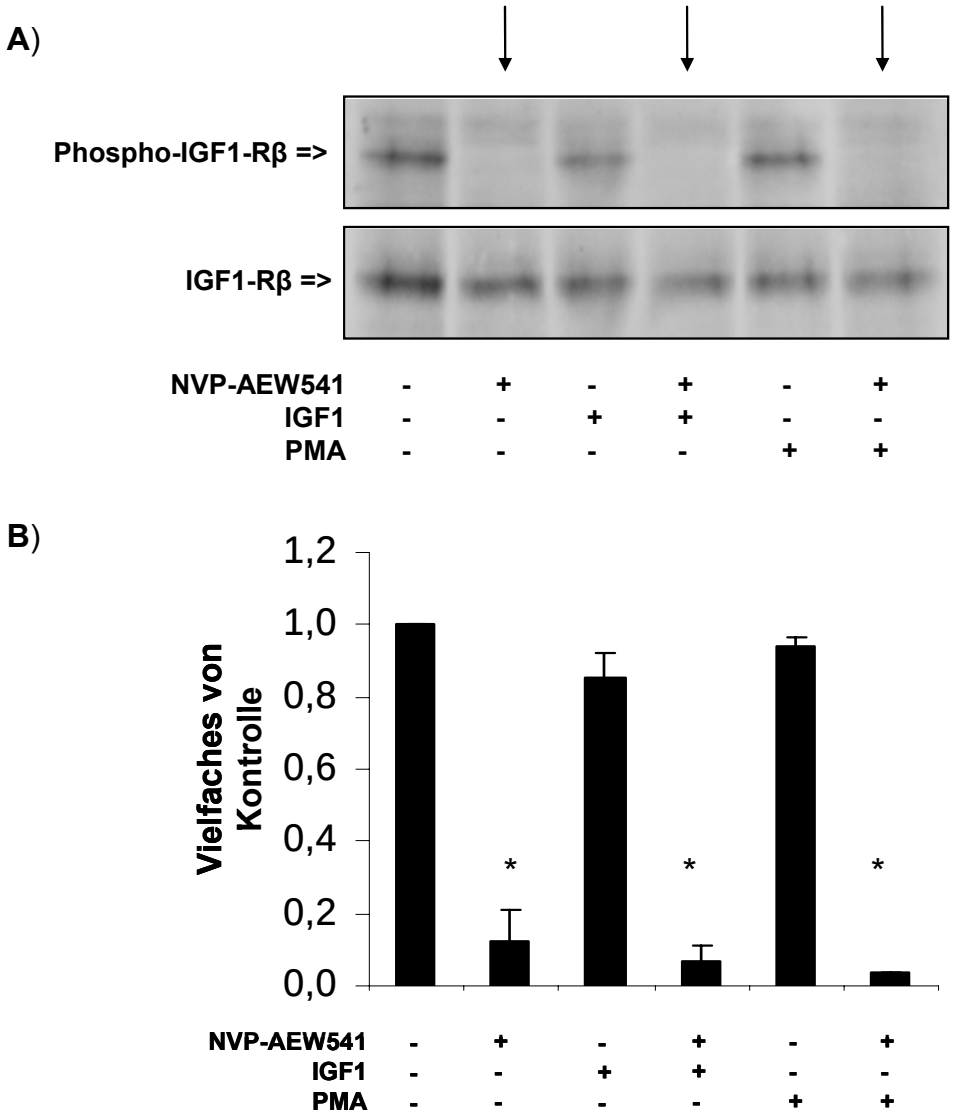


Abbildung 12: Einfluss des Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor-Inhibitors NVP-AEW 541 auf den Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor (IGF-1R).

A) Bon-Zellen wurden mit 2,5 µM IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 für eine Stunde inkubiert und im Anschluss mit 100 nM Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF-1) oder 400 nM Phorbol-12-Maristat-13-Acetat (PMA) für eine weitere Stunde stimuliert. Weitere Zellen wurden nur mit NVP-AEW541, IGF-1 oder PMA behandelt. Kontrollzellen erfuhren keine zusätzliche Behandlung. Zelllysate wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte eine Westen Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-IGF-1-Rezeptor-Antikörper, der den phosphorylierten, und somit aktiven, IGF-1-Rezeptor detektiert (Phospho-IGF-1Rβ) (Oberer Blot). Pfeile kennzeichnen mit NVP-AEW541 inkubierte Proben.

Danach erfolgte eine Analyse desselben Blots nach Inkubation mit einem spezifischen Anti-IGF-1-Rezeptor-Antikörper, der die β-Kette des IGF-1-Rezeptors detektiert (IGF-1Rβ) (Unterer Blot).

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Standartfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

Es wird deutlich, dass weder exogenes IGF-1 noch PMA zu einer zusätzlichen Rezeptorphosphorylierung führten.

Die Rezeptorphosphorylierung der mit NVP-AEW541 behandelten Proben hingegen lag in allen drei Proben bei ca. 3% des Kontrollsignals. Somit inhibierte NVP-AEW541 signifikant die konstitutive Aktivierung des IGF-1R, auch in Gegenwart von exogenem IGF-1 und PMA (p[NVP-AEW541]=0,010; p[IGF1+NVP-AEW541]=0,001; p[PMA+NVP-AEW541]=0,002). Außerdem wurde somit demonstriert, dass PMA den IGF-1R nicht Moduliert.

Die Wirkung von NVP-AEW541 auf den IGF-1R, die IGF-1-induzierte Signalwege und die CgA-Sekretion wurde in dieser Dissertation mit dem Effekt selektiver Inhibitoren der jeweiligen Signalkaskaden verglichen. Dazu wurden zwei weitere Inhibitoren in unsere Untersuchungen eingebunden, die ebenfalls auf ihre Wirkung unter Kontrollbedingungen, IGF-1-Inkubation und PMA-Inkubation untersucht wurden.

Es handelte sich hierbei um einen selektiven MEK-Inhibitor PD98059, der effektiv den ERK-Signalweg unterbindet, indem er die Phosphorylierung von MEK durch die Proteinkinase Raf inhibiert.

Der zweite Inhibitor, LY294002, ist ein selektiver PI3K-Inhibitor. Die Hemmung erfolgt durch eine reversible Blockade der katalytischen Untereinheit von PI3K.

Inkubation der BON-Zellen mit dem NVP-AEW541-Inhibitor resultierte erneut in einer signifikanten Inhibierung der basalen IGF-1R-Aktivität (p=0,01), wie auch schon in Abbildung 12. Wie erwartet, hatte eine Inkubation der Zellen mit selektivem MEK- oder PI3K-Inhibitor keinen Effekt auf die Phosphorylierung des IGF-1R. Somit waren die Inhibitoren PD98059 und LY294002 selektiv und hemmten nicht die Tyrosinphosphorylierung am IGF-1R.

Auch eine Inkubation mit PMA hatte erneut keinerlei zusätzliche stimulierende Auswirkung auf die Rezeptorphosphorylierung. Umgekehrt wurde eine durch NVP-AEW541 hervorgerufene Blockade der IGF-1-Rezeptorphosphorylierung nicht durch eine zusätzliche PMA-Stimulation beeinflusst. Es kam zu einer signifikanten Hemmung der IGF-1R-Aktivität (p=0,035). In Abbildung 13 A werden diese Ergebnisse im Western Blot deutlich, Abbildung 13 B stellt die relative Bandenintensität dar.

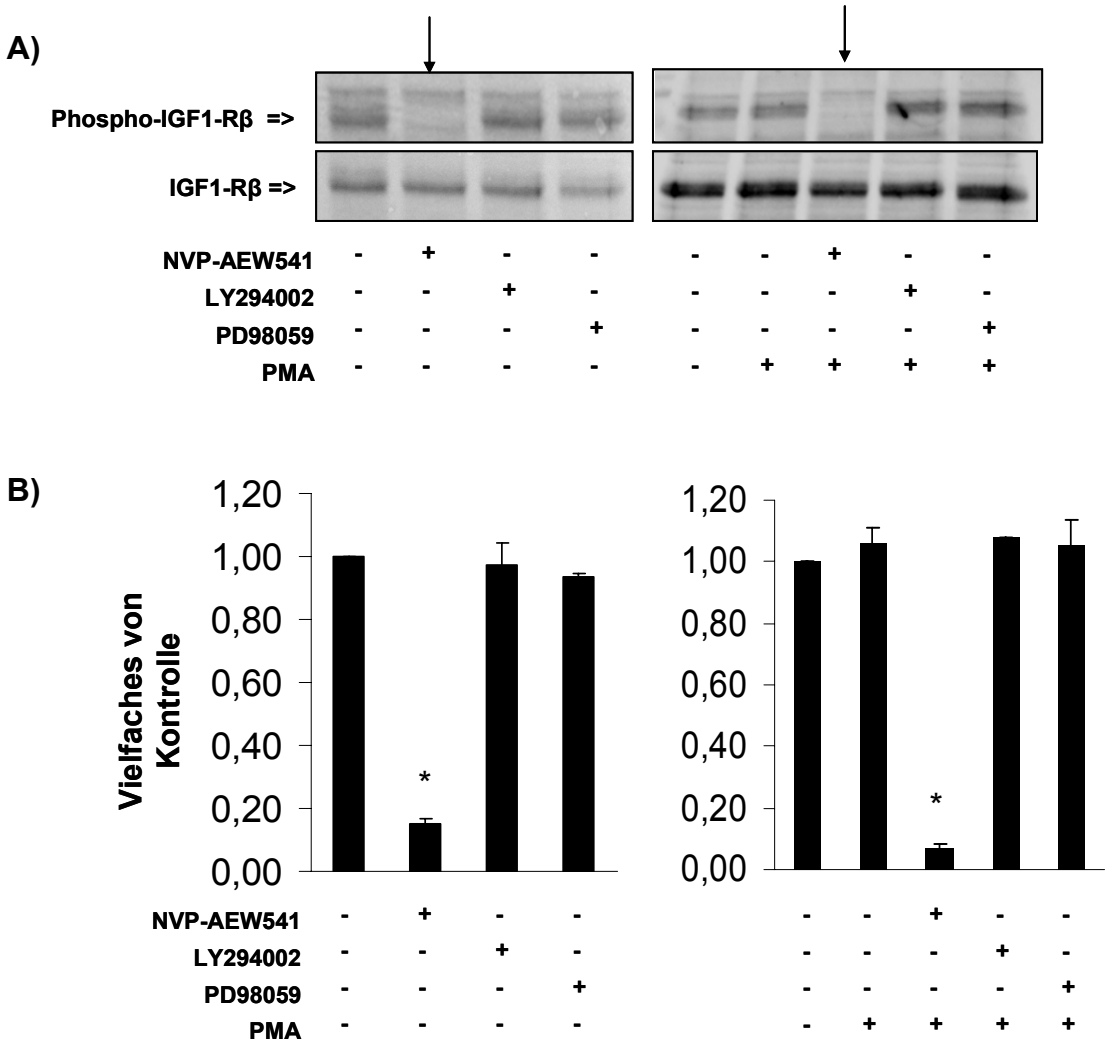


Abbildung 13: Einfluss des Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor(IGF-1R)-Inhibitors NVP-AEW541, des MEK-Inhibitors PD98059 und des Phosphatidy-Inositol-3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die Phosphorylierung des IGF-1R.

A) Bon-Zellen wurden mit 2,5 µM IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541, 25 µM LY294002 oder 15 µM PD98059 für eine Stunde inkubiert und im Anschluss mit 400 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) für eine weitere Stunde stimuliert. Weitere Zellen wurden nur mit NVP-AEW541, LY294002, PD98059 oder PMA behandelt. Kontrollzellen erfuhren keine zusätzliche Behandlung. Zelllysate wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte eine Westen Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-IGF1-Rezeptor-Antikörper, der die phosphorylierte, und somit aktive, IGF-1-Rezeptoren detektiert (Phospho-IGF-1Rβ) (Oberer Blot). Pfeile kennzeichnen mit NVP-AEW541 inkubierte Proben.

Danach erfolgte eine Analyse desselben Blots nach Inkubation mit einem spezifischen Anti-IGF1-Rezeptor-Antikörper, der die β-Kette des IGF-1-Rezeptors detektiert (IGF-1Rβ) (Unterer Blot).

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

3.4 Einfluss von NVP-AEW541 auf den IGF-1-induzierten ERK-Signalweg in BON-Zellen

Zunächst wurde der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg unter Einfluss des IGF-1-Rezeptorinhibitors betrachtet. Im selben Experiment wurde der Effekt der exogenen IGF-1-Stimulation und einer PMA-Inkubation auf die ERK-Phosphorylierung geprüft. Aus anderen Publikationen ist bekannt, dass Substanzen aus der Gruppe der Phorbolester, wie Phorbo-12-Myristat-13-Acetat (PMA), eine ERK-Aktivierung in Epithelzellen bewirken. In diesem Experiment wurde untersucht, ob dieser Effekt sich auch in BON-Zellen zeigen lässt und ob der IGF-1-Rezeptorinhibitor NVP-AEW541 Einfluss auf diesen Effekt nehmen kann.

Es konnte bereits demonstriert werden, dass eine Stimulation der BON-Zellen mit IGF-1 zur vermehrten Phosphorylierung von ERK führt (Abbildung 9). Demzufolge untersuchten wir, ob der selektive IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 einen Effekt auf die IGF-1 induzierte ERK-Phosphorylierung in BON-Zellen hat Abbildung 14 A stellt das Ergebnis im Western Blot dar, 14 B gibt die quantifizierten Ergebnisse wieder.

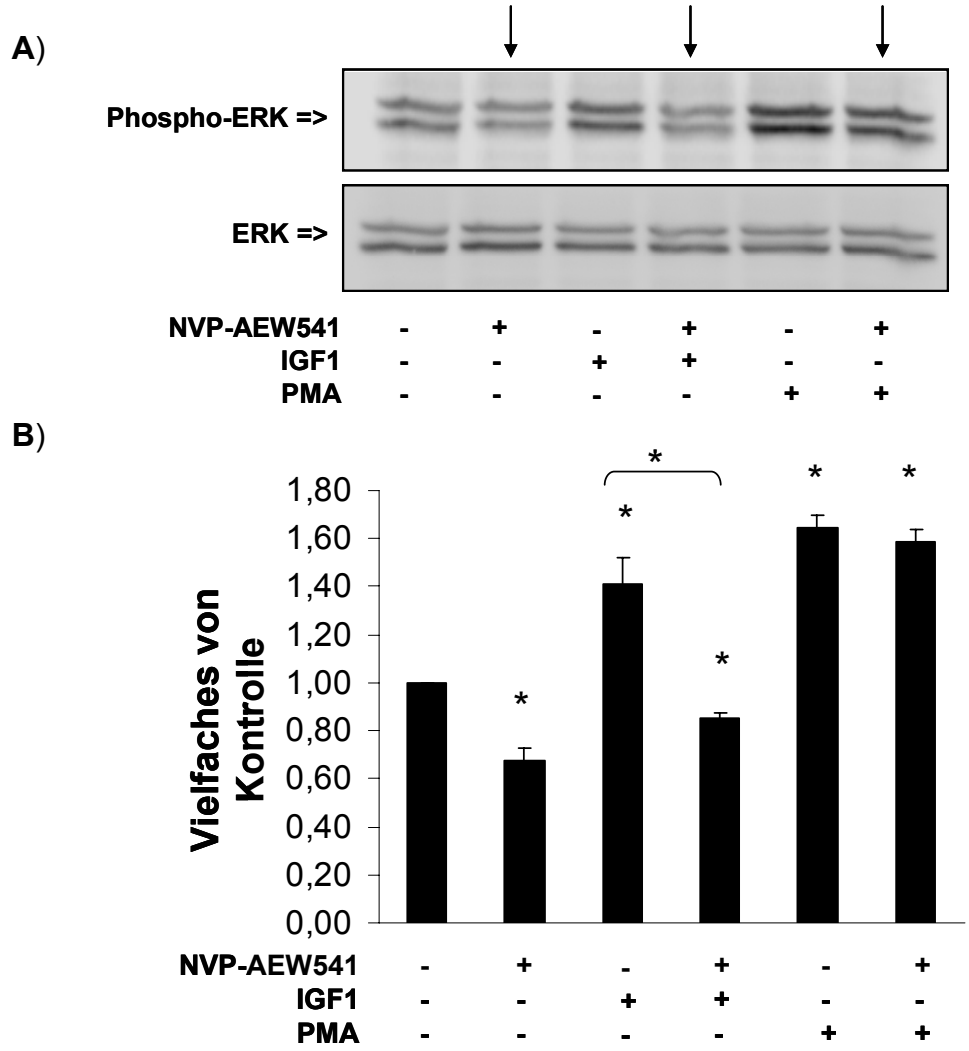


Abbildung 14: Einfluss des Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor(IGF-1R)-Inhibitors NVP-AEW541 auf den Insulin-like-Growth-factor-1(IGF-1)-induzierten extracellular signal regulated Proteinkinase (ERK)-Signalweg in BON-Zellen.

A) BON-Zellen wurden mit 2,5 µM IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 für eine Stunde inkubiert und im Anschluss mit 100 nM IGF-1 oder 400 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) für eine weitere Stunde stimuliert. Weitere Zellen wurden nur mit NVP-AEW541, IGF-1 oder PMA behandelt. Kontrollzellen erfuhren keine zusätzliche Behandlung. Zelllysate wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte eine Westen Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-ERK-Antikörper. Dieser detektiert phosphorylierte, aktive MAP-Kinasen (Phospho-ERK) (Oberer Blot). Pfeile kennzeichnen mit NVP-AEW541 inkubierte Proben.

Danach erfolgte eine Analyse desselben Blots nach Inkubation mit einem spezifischen Anti-ERK Antikörper, der Total-ERK detektiert (ERK) (Unterer Blot). Dargestellt sind Doppelbanden (ERK1, ERK2)

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus, Klammer mit * $p<0,05$ gegen einander.

Wie bereits in Abbildung 9 gezeigt wurde, konnte erneut eine signifikanten Steigerung der ERK-Phosphorylierung (p=0,049) in den mit exogenem IGF-1-stimulierten Zellen erzielt werden.

Die mit NVP-AEW541 behandelten Zellen und auch die, die zunächst mit dem IGF-1-Inhibitor behandelt wurden und anschließend eine Stimulation mit IGF-1 erfahren haben, zeigten eine geringere ERK-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. Somit resultierte die Inkubation mit NVP-AEW541 in einer signifikanten Abnahme der basalen und IGF-1 induzierten ERK-Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle (p[NVP-EAW541]=0,026; p[IGF1+NVP-AEW541]=0,029).

Auch die Aktivitätssenkung von ERK durch NVP-AEW541 unter IGF-1-Stimulation war als signifikant zu verzeichnen (p=0,017) (In Abbildung 14 mit Klammer ausgedrückt).

Damit konnte gezeigt werden, dass der ERK-Signalweg sowohl von exogenem IGF-1 stimuliert, als auch durch den IGF-1R-Inhibitor gehemmt werden kann.

Die beiden Proben, die mit PMA inkubiert wurden, wiesen eine signifikante Steigerung der ERK-Phosphorylierung auf (p[PMA]=0,006; p[PMA+NVP-AEW541]=0,008), unabhängig davon, dass eine der PMA-inkubierten Proben eine Behandlung mit NVP-AEW541 vorausgegangen war. Dieses Ergebnis zeigt, dass die von PMA ausgelöste intrazelluläre ERK-Aktivierung unabhängig von der Aktivierung des IGF-1R und des IGF-Systems ist.

Als Nächstes wurde die Wirkung des selektiven PI3K-Inhibitors LY294002 und des selektiven MEK-Inhibitors PD98059 auf die ERK-Signalkette im Vergleich zum IGF-1-Rezeptorinhibitor NVP-AEW541 untersucht. PD98059 ist ein bekannter Inhibitor von MEK und reduziert dadurch die ERK-Aktivität. Im Vergleich zu anderen bekannten Kinase-Inhibitoren bietet PD98059 eine hohe Selektivität. In Abbildung 15 A und B ist das Ergebnis ausgedrückt.

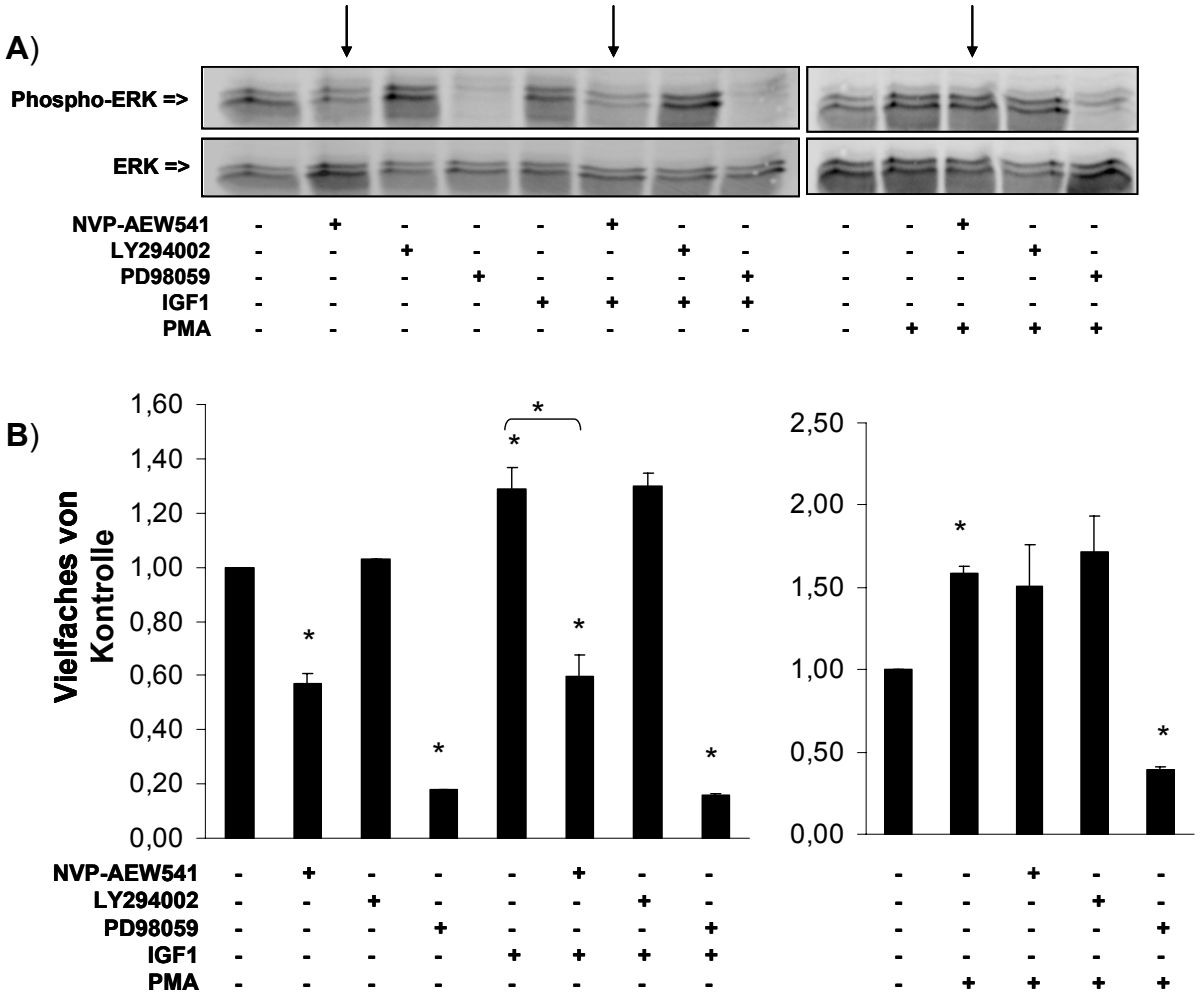


Abbildung 15: Einfluss des Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor(IGF-1R)-Inhibitors NVP-AEW541, des MEK-Inhibitors PD98059 und des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die Phosphorylierung von extracellular signal regulated Proteinkinase (ERK) in BON-Zellen.

A) BON-Zellen wurden mit 2,5 µM IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541, 25 µM LY294002 oder 15 µM PD98059 für eine Stunde inkubiert und im Anschluss mit 100 nM IGF-1 oder 400 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) für eine weitere Stunde stimuliert. Weitere Zellen wurden nur mit NVP-AEW541, LY294002, PD98059, IGF-1 und PMA behandelt. Kontrollzellen erfuhren keine zusätzliche Behandlung. Zelllysate wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte eine Westen Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-ERK-Antikörper. Dieser detektiert phosphorylierte, aktive MAP-Kinasen (Phospho-ERK) (Oberer Blot). Pfeile kennzeichnen mit NVP-AEW541 inkubierte Proben.

Danach erfolgte eine Analyse desselben Blots nach Inkubation mit einem spezifischen Anti-ERK Antikörper, der Total-ERK detektiert (ERK) (Unterer Blot). Dargestellt sind Doppelbanden (ERK1, ERK2)

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Standerdfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus, Klammer mit * $p<0,05$ gegen einander.

Die Inkubation der Zellen mit NVP-AEW541 führte erneut zu einer Abnahme der ERK-Phosphorylierung, die Stimulation mit IGF-1 zu einer Zunahme und die Stimulation mit PMA zu einer noch größeren Zunahme der ERK-Aktivität. Alle Proben, die mit PD98059 behandelt wurden, auch die die zusätzlich mit IGF-1 oder PMA stimuliert wurden, zeigen eine signifikante Abnahme der ERK-Phosphorylierung um etwa 80% ($p[PD]<0,01$; $p[PD+IGF1]=0,01$; $p[PD+PMA]=0,02$).

Die durch exogenes IGF-1 induzierte ERK-Aktivierung konnte also durch eine Behandlung der Zellen mit einem selektiven MEK-Inhibitor PD98059 vermindert werden. PD98059 konnte auch die basale, endogene ERK-Aktivierung reduzieren. Dieses Ergebnis unterstreicht zum einen, dass ERK auch konstitutiv in BON-Zellen aktiv ist, zum anderen aber auch, dass diese ERK-Aktivität grundsätzlich durch externe Stimuli beeinflussbar ist.

Da PD98059 ein selektiver Inhibitor für den ERK-Signalweg ist, ließ sich an Hand seiner Wirkung die Wirkpotenz des selektiven IGF-1-Rezeptorinhibitors NVP-AEW541 vergleichen. Die Phosphorylierung von ERK wurde durch den selektiven MEK-Inhibitor PD98059 am effektivsten unterbunden.

Wie zu erwarten war, zeigte eine Behandlung der Zellen mit dem selektiven PI3K-Inhibitor LY294002 keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK in BON-Zellen. Proben, die mit exogenem IGF-1 oder PMA stimuliert wurden und anschließend mit LY294002 behandelt wurden, zeigten das gleiche Verhalten, wie die Proben, die mit IGF-1 oder PMA ohne zusätzliche Ihnhibitorbeigabe stimuliert wurden. Der fehlende Effekt bei einer Behandlung der Zellen mit LY294002 unterstreicht die Selektivität von PD98059.

3.5 Einfluss von NVP-AEW541 auf den IGF-1-induzierten Akt-Signalweg in BON-Zellen

Die zweite, in dieser Dissertation untersuchte, IGF-1-induzierte intrazelluläre Transduktionskaskade ist der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg. Motilität, Differenzierung und Tumorgenese sind nur einige der von Akt beeinflussten Vorgänge in Tumorzellen. Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist ein wachstumsvermittelndes System, das in vielen Tumoren aktiv ist.

Wie schon für den ERK-Weg gezeigt, wurde untersucht in wieweit der selektive IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 den IGF-1-induzierten Signalweg bestehend aus PI3K/Akt/mTOR inhibiert. Abbildung 16 A zeigt das Ergebnis im Western Blot und 16 B in quantifizierter Form.

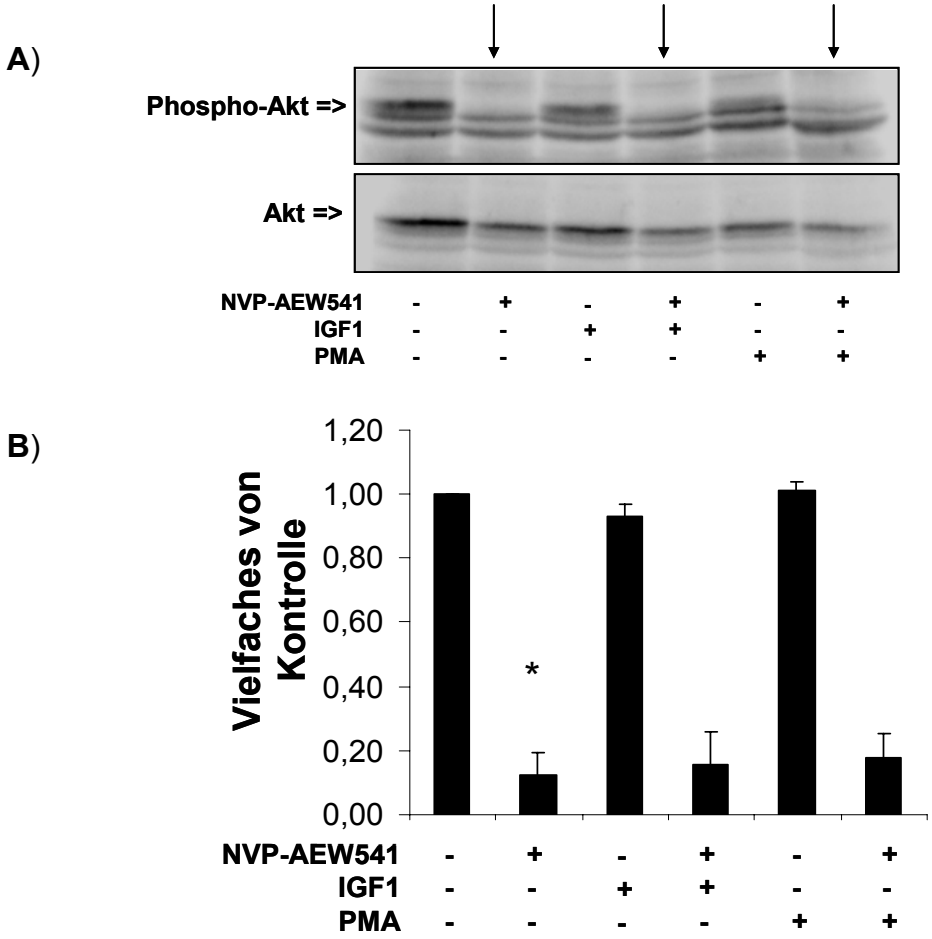


Abbildung 16: Einfluss des Insulin-like-Growth-factor-1-Receptor(IGF-1R)-Inhibitors NVP-AEW541 auf den Insulin-like-Growth-factor-1(IGF-1)-induzierten Akt-Signalweg in BON-Zellen.

A) BON-Zellen wurden mit 2,5 µM IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 für eine Stunde inkubiert und im Anschluss mit 100 nM IGF-1 oder 400 nM Phorbol-12-Maristat-13-Acetat (PMA) für eine weitere Stunde stimuliert. Weitere Zellen wurden nur mit NVP-AEW541, IGF-1 und PMA behandelt. Kontrollzellen erfuhren keine zusätzliche Behandlung. Zelllysate wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte eine Westen Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-Akt-Antikörper. Dieser detektiert die phosphorylierte Form von Akt (Phospho-Akt) (Oberer Blot) Pfeile kennzeichnen mit NVP-AEW541 inkubierte Proben.

Danach erfolgte eine Analyse desselben Blots nach Inkubation mit einem spezifischen Anti-Akt-Antikörper, der Total-Akt detektiert (Akt) (Unterer Blot).

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

Die mit NVP-AEW541 behandelten Proben zeigten eine signifikante Reduktion der Akt-Phosphorylierung (p=0,048).

Die mit NVP-AEW541 inkubierten Zellen mit zusätzlicher IGF-1- oder PMA-Stimulation zeigten ebenfalls eine sehr deutliche, jedoch nicht statistisch signifikante Reduktion der Akt-Aktivität (p[NVP-AEW541+IGF1]=0,076; p[NVP-AEW541+PMA]=0,059). Eine Inkubation mit NVP-AEW541 resultierte somit in einem Rückgang der basalen Akt-Aktivität und verhinderte die Stimulation von Akt durch exogenes IGF-1. Auch wenn die p-Werte der Proben „NVP-AEW541+IGF1“ und „NVP-AEW541+PMA“ im Vergleich zur Kontrolle als nicht statistisch signifikant angesehen werden können, so lassen die Werte eine sehr deutliche Tendenz erkennen.

Eine Stimulation mit PMA führte nicht zu einer Änderung der Akt-Aktivität in BON-Zellen. Offensichtlich beeinflusst PMA den Akt-Signalweg in BON-Zellen nicht.

Um den Effekt des IGF-1-Rezeptorinhibitors auf die Akt-Phosphorylierung besser beurteilen zu können, wurde seine Wirkung im Vergleich zu den selektiven Inhibitoren LY294002 und PD98059 untersucht. Dies wird in Abbildung 17 A und B demonstriert.

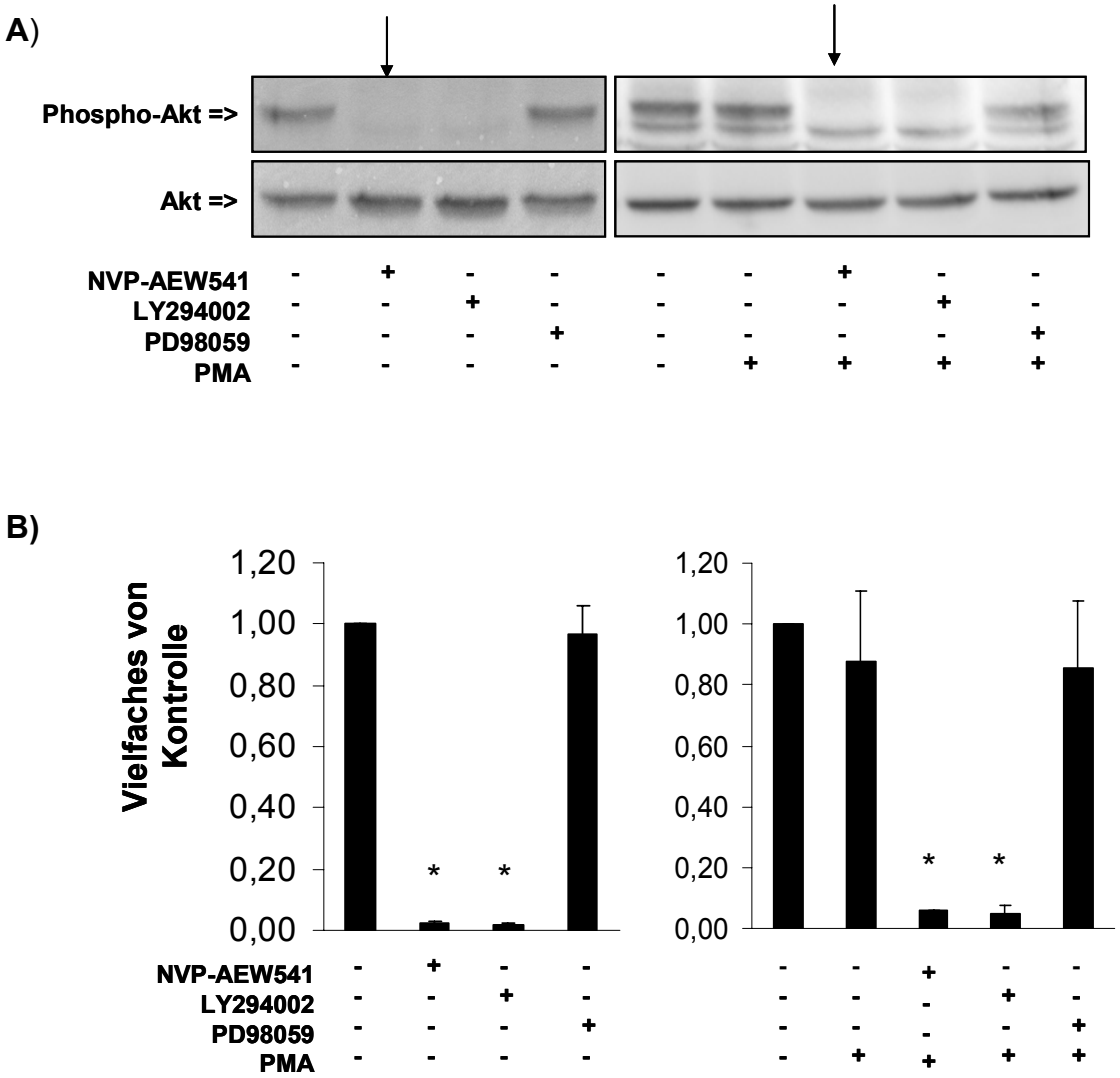


Abbildung 17: Einfluss des Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor(IGF-1R)-Inhibitors NVP-AEW541, des MEK-Inhibitors PD98059 und des Phosphatidy-Inositol-3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die Phosphorylierung von Akt in BON-Zellen.

A) BON-Zellen wurden mit 2,5 µM NVP-AEW541, 25 µM LY294002 oder 15 µM PD98059 für eine Stunde inkubiert und im Anschluss mit 400 nM Phorbol-12-Maristat-13-Acetat (PMA) für eine weitere Stunde stimuliert. Weitere Zellen wurden nur mit NVP-AEW541, LY294002, PD98059 und PMA behandelt. Kontrollzellen erfuhren keine zusätzliche Behandlung. Zelllysate wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte eine Westen Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Phospho-Akt-Antikörper. Dieser detektiert die phosphorylierte Form von Akt (Phospho-Akt) (Oberer Blot) Pfeile kennzeichnen mit NVP-AEW541 inkubierte Proben.
Danach erfolgte eine Analyse desselben Blots nach Inkubation mit einem spezifischen Anti-Akt-Antikörper, der Total-Akt detektiert (Akt) (Unterer Blot).

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

LY294002 ist ein selektiver Inhibitor der PI3K. Diese Substanz hemmt reversibel die katalytischen Untereinheit p110 von PI3K und hebt die PI3K-Aktivität nahezu vollkommen auf.

Die Ergebnisse in Abbildung 17 zeigen, dass die Inkubation mit LY294002 die konstitutive Aktivierung des Akt-Signalwegs signifikant (p=0,002) hemmt. Auch unter zusätzlicher Stimulation mit PMA ist die Hemmung der Akt-Phosphorylierung signifikant (p=0,01).

Der selektive MEK-Inhibitor PD98059 hatte dagegen, wie erwartet, keine Auswirkungen auf die Aktivität von Akt.

Der IGF-1-Inhibitor NVP-AEW541 hemmte die Akt-Aktivität, auch unabhängig von einer Zugabe von PMA. Es kam hier zu einer signifikanten Reduktion der Akt-Phosphorylierung (p[NVP-AEW541=0,004]; p[PMA+NVP-AEW541]=0,002) Das heißt, die Aktivierung von Akt durch den autokrinen IGF-1-Loop in BON-Zellen wird durch die Phosphorylierung des IGF-1-Rezeptors vermittelt und kann durch NVP-AEW541 unterbrochen werden. PMA besitzt in der Akt-Kaskade keinen Angriffspunkt.

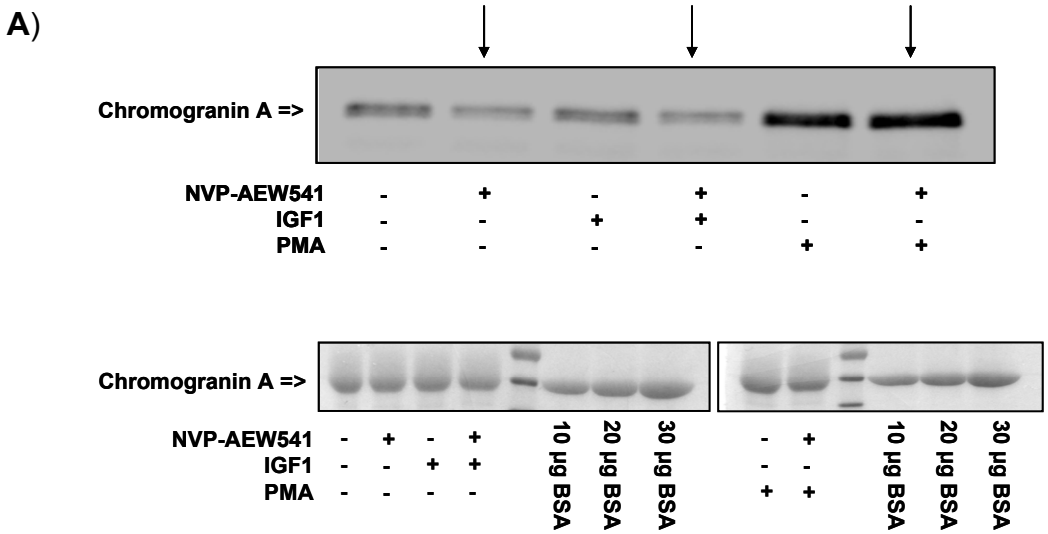
Die Reduktion der Akt-Aktivität durch NVP-AEW541 entspricht der Akt-Aktivitätssenkung durch den selektiven PI3-Kinase-Inhibitor LY294002. Das heißt, die Effektivität beider Inhibitoren auf den Akt-Signalweg ist zumindest in den untersuchten Konzentrationen vergleichbar.

3.6 Einfluss von NVP-AEW541 auf Sekretion von CgA

Sowohl der ERK- als auch der Akt-Signalweg vermitteln die Sekretion von CgA in BON-Zellen. Durch Behandlung der Zellen mit den jeweiligen selektiven Signalweginhibitoren LY294002 bzw. PD98059 wird die Sekretion gehemmt.

Als nächstes sollte an Hand der Sekretion von CgA in den Mediumüberstand untersucht werden, ob durch Hemmung mit NVP-AEW541 auch die CgA-Sekretion beeinflusst werden kann.

Inkubation der BON-Zellen mit dem NVP-AEW541 führte zu einer signifikanten (p=0,013) Reduktion der CgA-Menge im Kulturüberstand, wie in Abbildung 18 A und B gezeigt wird.



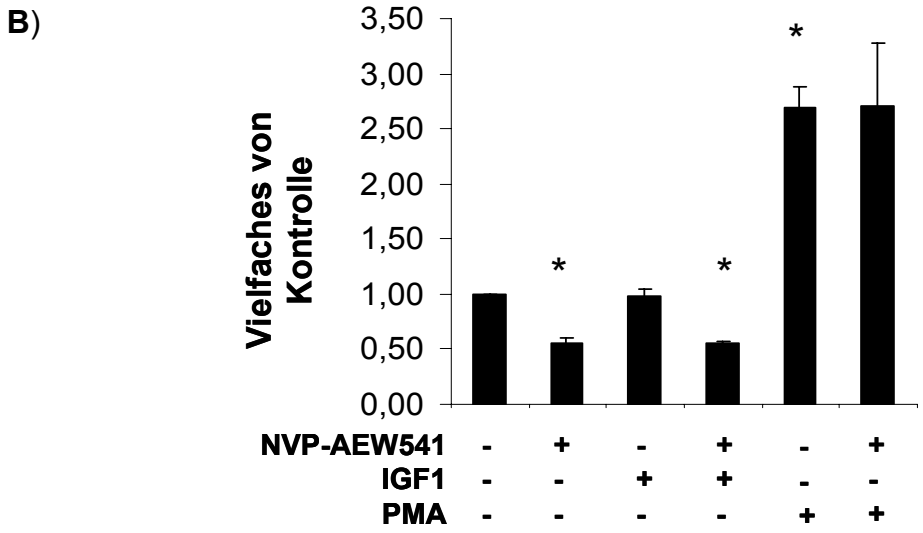


Abbildung 18: Einfluss des neuen Insulin-like-Growth-factor-1-Rezeptor(IGF-1R)-Inhibitors NVP-AEW541 auf die Sekretion von Chromogranin A in BON-Zellen.

A) BON-Zellen wurden mit 2,5 µM IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 für eine Stunde inkubiert und im Anschluss mit 100 nM IGF-1 oder 400 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) für eine weitere Stunde stimuliert. Weitere Zellen wurden nur mit NVP-AEW541, IGF-1 oder PMA behandelt. Kontrollzellen erfuhren keine zusätzliche Behandlung. Mediumüberstände wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte eine Westen Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Chromogranin-A-Antikörper. Pfeile kennzeichnen mit NVP-AEW541 inkubierte Proben (Oberer Blot).

Als Ladekontrolle erfolgte eine Coomassie-Färbung des Gels (Unterer Blot). Proben wurden im Vergleich zu 10, 20 und 30 µg bovinem Serumalbumin (BSA) aufgetragen.

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

Wurden BON-Zellen mit exogenem IGF-1 stimuliert, erfolgte keine weitere Steigerung der basalen CgA-Sekretion, wie auch schon in Abbildung 10 und 11. Durch Zugabe des IGF-1R-Inhibitors kam es auch in mit exogenem IGF-1 stimulierten Zellen zu einem signifikanten ($p=0,013$) Rückgang der CgA-Sekretion. Die durch PMA induzierte signifikante ($p=0,013$) CgA-Sekretionssteigerung im Kulturüberstand konnte nicht durch Inhibition mit NVP-AEW541 beeinflusst werden.

In Abbildung 19 wird weiter gezeigt, dass auch die selektiven Inhibitoren PD98059 und LY294002 die PMA-induzierte CgA-Sekretion nicht hemmen können.

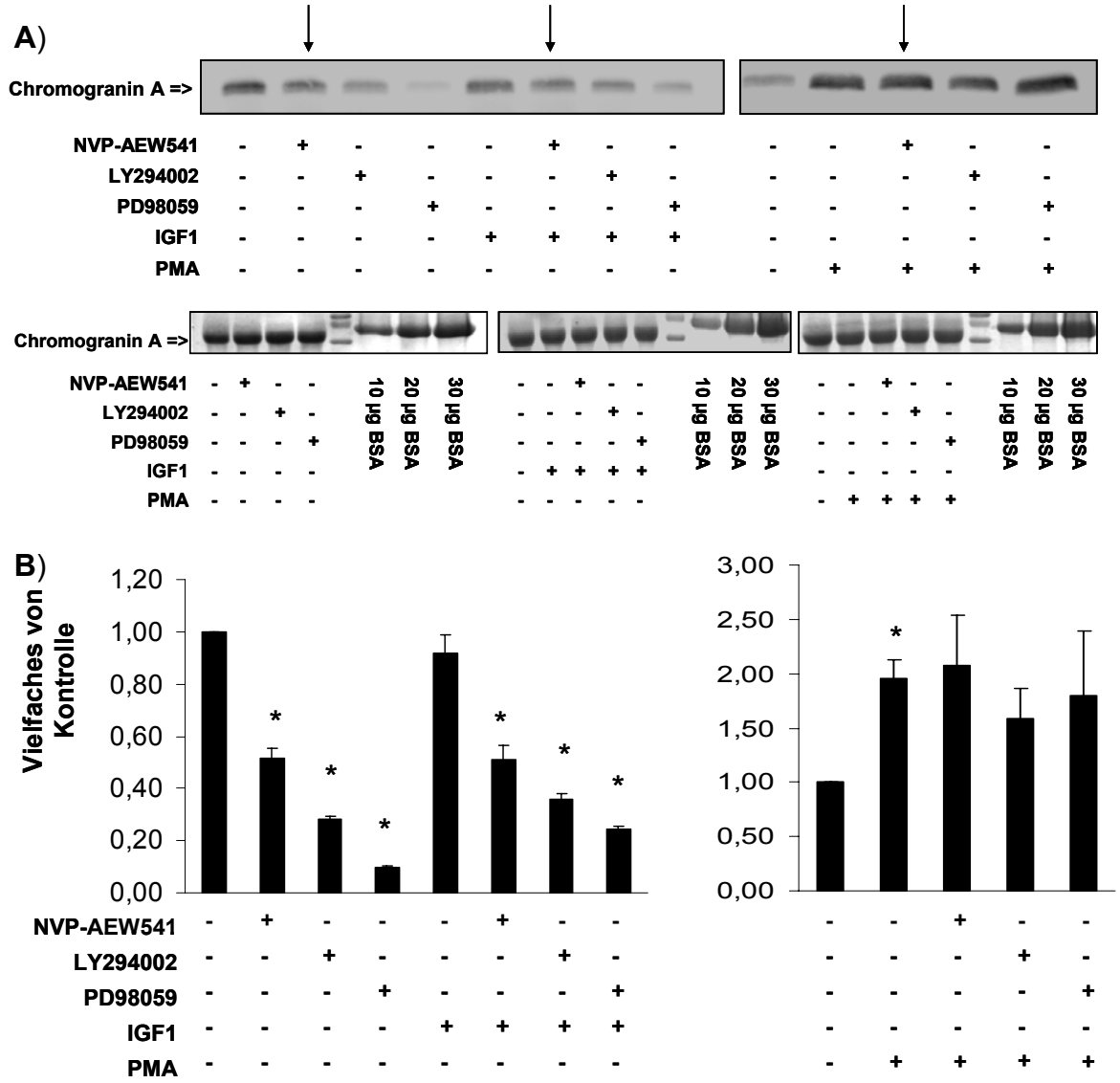


Abbildung 19: Einfluss des Insulin-like-Growth-factor-1-Receptor(IGF-1R)-Inhibitors NVP-AEW541, des MEK-Inhibitors PD98059 und des Phosphatidy-Inositol-3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die Sekretion von Chromogranin A in BON-Zellen.

A) BON-Zellen wurden mit 2,5 µM IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541, 25 µM LY294002 oder 15 µM PD98059 für eine Stunde inkubierte und im Anschluss mit 100 nM Insulin-like-Growth-factor-1 (IGF-1) oder 400 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) für eine weitere Stunde stimuliert. Weitere Zellen wurden nur mit NVP-AEW541, LY294002, PD98059, IGF-1 oder PMA behandelt. Kontrollzellen erfuhren keine zusätzliche Behandlung. Mediumüberstände wurden wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte eine Westen Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-Chromogranin-A-Antikörper (Oberer Blot). Pfeile kennzeichnen mit NVP-AEW541 inkubierte Proben.

Als Ladekontrolle erfolgte eine Coomassie-Färbung des Gels (Unterer Blot). Proben wurden gegen 10, 20 und 30 µg bovinem Serumalbumin (BSA) aufgetragen.

B) Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Proteinbandenintensität. Fehlerbalken repräsentieren den Satndardfehler dreier unabhängiger Experimente. * drückt $p<0,05$ gegen Kontrolle aus.

Durch Inkubation der BON-Zellen mit allen Inhibitoren kam es zu einer signifikanten Reduktion der CgA-Sekretion. NVP-AEW541 reduzierte die basale CgA-Sekretion auf unter 50% ($p>0,01$). Eine Inkubation mit dem selektiven PI3Kinase-Inhibitor LY294002 bewirkte eine Reduktion der CgA-Sekretion auf etwa 30% des basalen CgA ($p<0,01$). Der stärkste Effekt auf die CgA-Sekretion ließ sich durch Hemmung mit dem selektiven MEK-Inhibitor PD98059 erzielen. Hier kam es zu einem Rückgang der CgA-Sekretion auf etwa 10% des basalen CgA ($p<0,01$). Auch in Zellen, die zusätzlich zum Inhibitor mit exogenem IGF-1 stimuliert wurden, zeigten eine signifikante Hemmung der CgA-Sekretion ($p[IGF-1+NVP-AEW541]=0,01$; $p[IGF-1+LY294002]=0,001$; $p[IGF-1+PD98059]>0,01$).

Diese Ergebnisse bestätigten, dass die CgA-Sekretion in BON-Zellen durch IGF-1 induzierte Phosphorylierung des IGF-1-Rezeptors und der damit ausgelösten intrazellulären Signalwege ERK und Akt stimuliert wird. Durch Einsatz des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 wird die basale Sekretion signifikant reduziert.

PMA-Stimulation hingegen führt zu einer signifikanten Steigerung der CgA-Sekretion ($p=0,03$). Weiter zeigen unsere Daten, dass die Modulation der CgA-Sekretion in BON-Zellen durch PMA, weder durch eine Phosphorylierung des IGF-1R, noch des ERK- und PI-3-Kinase-Signalwegs vermittelt wird. Im Vergleich zu PMA-stimulierten Zellen, erfahren die zusätzlich mit LY294002, PD98059 und NVP-AEW541 behandelten Zellen keine signifikante Hemmung

4. Diskussion

Neuroendokrine Tumore des Gastrointestinaltraktes stellen eine heterogene Gruppe von Neoplasien dar. Die Tumorzellen können, spezifische Proteine, biogene Amine, Hormone und Neuropeptide synthetisieren und sezernieren (Klöppel et al. 2003).

Der größte Teil der NETs ist funktionell-inaktiv, sie fallen vor allem durch verdrängendes Wachstum und dadurch hervorgerufene unspezifische Symptome auf (Arnold C., 2007). Funktionell-aktive NETs stellen dagegen eine kleinere Gruppe dar. Ihre Symptome richten sich nach dem im Überschuss produziertem Hormon.

Die einzige kurative Therapie stellt eine operative Entfernung des Primarius und solitärer Organmetastasen dar. Da in den meisten Fällen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits multiple, kurativ inoperable Metastasen vorliegen, kommt der symptomatischen Therapie eine große Bedeutung zu. Substanzen wie Somatostatinanaloga und Interferon sind dabei derzeit führende Therapeutika.

Möglich ist die medikamentöse Behandlung, da von NETs exprimierte Rezeptoren von diesen Substanzen als Angriffspunkte genutzt werden können. Dazu zählt neben dem Somatostatin-Rezeptor auch der IGF-1-Rezeptor. Auch BON-Zellen, die als Modell für NETs eingesetzt werden, exprimieren funktionelle IGF-1-Rezeptoren.

In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe eines Antikörpers, der IGF-1 immunneutralisiert, ein funktionell aktiver, autokriner IGF-1-Loop in humanen neuroendokrinen BON-Tumorzellen gezeigt (von Wichert et al. 2000). Dieser Loop wird über einen positiven Rückkopplungsmechanismus reguliert. Immunneutralisation von IGF-1 inhibiert die Zellproliferation, sowie die Aktivität der intrazellulären Kinasen Akt und ERK und reduziert außerdem die CgA-Sekretion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein selektiver Inhibitor des IGF-1R, NVP-AEW541, ebenfalls den autokrinen IGF-1-Loop unterbrechen kann und eine ähnliche Wirkung entfaltet wie der anti-IGF-1-Antikörper.

4.1 NVP-AEW541 hemmt IGF-1R-Phosphorylierung in BON-Zellen

Unsere Daten zeigen, dass NVP-AEW541 signifikant die basale Tyrosinkinasenaktivität des IGF-1R in BON-Zellen hemmt und damit die Autophosphorylierung des IGF-1-Rezeptors inhibiert. Unsere Ergebnisse stehen auch mit Publikationen anderer Studien im Einklang. So kommt es nach Behandlung humaner Leukämiezellen mit NVP-AEW541 ebenfalls zu einer Hemmung der Aktivität der IGF-1R-β-Untereinheit (Tazzari et al. 2007).
Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass die Hemmung des IGF-1R mit NVP-AEW541 durch exogene Stimulation mit IGF-1 nicht aufgehoben werden kann. Wie zu erwarten war, ist IGF-1R durch die Blockade mit NVP-AEW541 nicht für externe Stimuli mit den Liganden zugängig. Auch höhere Konzentrationen an exogenem IGF-1 können die Inhibition des Rezeptors nicht überwinden.
Allerdings zeigte sich der IGF-1R exogenem IGF-1 gegenüber nicht sensibel. Es konnte keine signifikante Steigerung des IGF-1R in BON-Zellen durch zusätzliche IGF-1-Stimulation erzeugt werden. Das spricht für eine hohe basale Aktivität des Rezeptors durch autokrin sezerniertes IGF-1.
PMA hatte, wie erwartet, keinen Einfluss auf die Rezeptoraktivität.

4.2 NVP-AEW541 inhibiert intrazelluläre Signalwege in BON-Zellen

Die Aktivierung von IGF-1R in BON-Zellen ist ein entscheidender Signalgeber für die intrazelluläre Signaltransduktion.
Akt- und ERK-Signalweg werden durch die IGF-1-induzierte Phosphorylierung des IGF-1R aktiviert. Da NVP-AEW541 durch Blockade der β-Untereinheit des IGF-1R dessen Autophosphorylierung und damit die gemeinsame Schlüsselsequenz beider Signalwege hemmt, wäre anzunehmen, dass durch Hemmung des IGF-1R auch die IGF-1 induzierten Signalwege ERK und Akt inhibiert werden.

Um diese Hypothese zu prüfen, untersuchten wir mit NVP-AEW541 inhibierte Zellen, im Vergleich zu den mit dem jeweiligen selektiven Inhibitor inkubierten Zellen, auf die Aktivität der einzelnen Kaskaden.

ERK

Tatsächlich zeigen unsere Daten, dass eine Inkubation von BON-Zellen mit NVP-AEW541 zu einer signifikanten Reduktion der basalen Kinasenaktivität von ERK führt.

Unklar war dabei, ob diese Hemmung durch direkte Inhibierung von MEK/ERK oder durch die Inhibierung von IGF-1R und damit seiner nachgeschalteten Kaskaden erfolgte. Um das zu differenzieren, benutzten wir Phorbo-12-Myristat-13-Acetat (PMA), das zu Phosphorylierung von ERK führt. Diese Substanz zählt zur Gruppe der Phorbolester. Studien berichteten über ERK-Aktivierung in intestinalen Epithelzellen durch PMA, die durch eine Proteinkinase C (PKC) vermittelt wird (Clark,J.A. 2004) und somit unabhängig von IGF-1 induzierten Vorgängen ist. Es zeigte sich in unseren Experimenten, dass PMA die ERK-Phosphorylierung in BON-Zellen signifikant steigerte. Der selektive MEK-Inhibitor PD98059 senkte die ERK-Phosphorylierung in mit PMA stimulierten Zellen.

NVP-AEW541 führte bei PMA-stimulierten Zellen nicht zu einer Reduktion der ERK-Aktivität. Da PMA über IGF-1 unabhängige Signalwege zu ERK-Phosphorylierung führt, erfolgte durch Unterbrechung der IGF-1-induzierten ERK-Kaskade am IGF-1-Rezeptor mit NVP-AEW541 keine Abschwächung der PMA-induzierten ERK-Aktivität. NVP-AEW541 hatte somit keine direkte Wirkung auf MEK/ERK. Die durch NVP-AEW541 hervorgerufene Hemmung der ERK-Aktivität ist somit auf die Inhibierung des IGF-1R und damit verbundener Inhibierung IGF-1 abhängiger intrazellulärer Transduktionskaskaden zurückzuführen.

Wir konnten im Weiteren zeigen, dass exogen zugefügtes IGF-1 die basal erhöhte ERK-Aktivität signifikant um etwa 30% steigert. Durch Blockade des IGF-1-Rezeptors mit NVP-AEW51 und direkte Inhibierung von MEK mit PD98059 konnte diese Aktivitätssteigerung signifikant inhibiert werden. Dabei war der Effekt beider Substanzen vergleichbar.

AKT

Ein weiterer IGF-1 induzierter intrazellulärer Signalweg besteht aus PI3K, Akt und mTOR.

Wir konnten demonstrieren, dass durch die Blockade des IGF-1R mit NVP-AEW541 eine signifikante Hemmung der basalen Akt-Aktivität in BON-Zellen erzeugt wird. Dieser Effekt ist vergleichbar mit dem des selektiven PI3K-Inhibitors LY294002.

Ähnliche Ergebnisse wurden für andere Tumore gezeigt. Scotlandi et al. fanden, dass NVP-AEW541 eine stabile Inhibierung des PI3K/Akt-Signalweges in Ewing-Sarkomzellen bewirkt (Scotlandi et al. 2005). Auch in synovialen Sarkomzellen wird die IGF-1R/PI3K/Akt-Achse durch NVP-AEW541 inhibiert (Friedrichs et al. 2008).

Außerdem zeigten wir, dass eine Stimulation mit exogenem IGF-1 keine weitere Aktivitätssteigerung von Akt bewirkt. So wäre es anzunehmen, dass die basale Aktivität von Akt hoch ist (wahrscheinlich durch eine ausreichende Stimulierung über autokrin freigesetztes IGF-1), und sich durch exogene Stimulation mit IGF-1 nicht noch weiter steigern lässt.

Zellen, die zusätzlich zur IGF-1-Stimulation mit NVP-AEW541 inkubiert wurden, zeigten eine deutliche Inhibition der Akt-Aktivität.

Zellen, die mit PMA inkubiert wurden, erfuhren keine Änderung der Aktivität für Akt. Zellen, die zusätzlich mit NVP-AEW541 inhibiert wurden, erfuhren eine Aktivitätssenkung von Akt wie die Kontrolle. Damit induzieren Phorbolester via PKC in BON-Zellen keine (weitere) Aktivierung des AKT Signalwegs.

Unsere Daten zeigen somit eine signifikante Reduktion der Aktivität von IGF-1 vermittelter ERK- und Akt-Aktivierung durch NVP-AEW541. Die Hemmung von Akt ist im Vergleich jedoch effektiver als die Hemmung von ERK. Zu vergleichbaren Erkenntnissen sind auch Scotlandi et al. gelangt (Scotlandi et al. 2005). Sie fanden in einem anderen Modell einen kurzzeitigen Effekt von NVP-AEW541 auf die ERK-Phosphorylierung, während der Akt-Signalweg stabil inhibiert wurde.

Eventuell ist dies darauf zurückzuführen, dass die ERK-Phosphorylierung auch auf IGF-1 unabhängigen Wegen hervorgerufen werden kann, die nicht durch NVP-AEW541 beeinflusst werden (z.B. PMA).

4.3 NVP-AEW541 hemmt CgA-Sekretion in BON-Zellen

Die Aktivierung IGF-1 induzierter Signalwege führt in BON-Zellen zu Sekretion von CgA. Dabei ist CgA ein wichtiges Markerprotein für die neuroendokrine Sekretion der NETs und kann im Serum gemessen werden (Taupenot, Harper, and O'Connor 2003). In etwa 80% der Karzinoiderkrankungen findet sich eine Erhöhung des CgA-Serumwertes. Die Höhe des Wertes korreliert mit der Tumormasse und hat eine prognostische Bedeutung (Caplin et al. 1998; Oberg 2004). Aus diesen Gründen dient CgA als wichtiger Parameter zur Diagnose von NETs und zur Kontrolle des Therapieverlaufs.

In dieser Arbeit untersuchten wir, ob eine Hemmung des IGF-1R sich auch auf die neuroendokrine Hormonsekretion, bestimmt an Hand der Chromograninsekretion, auswirkt.

Dass die Sekretion von CgA in BON-Zellen IGF-1 abhängig ist, wurde in einer früheren Publikation gezeigt. Durch Immunneutralisation von IGF-1 mit Hilfe eines IGF-1-blockierenden-Antikörpers konnte die basale CgA-Sekretion in BON-Zellen um 45% gesenkt werden (von Wichert et al. 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch selektive Hemmung des IGF-1R mit Hilfe von NVP-AEW541 die basale CgA-Sekretion signifikant auf die Hälfte reduziert werden kann. *In vivo* würden ähnliche Ergebnisse als Therapieerfolg betrachtet werden. Weiter konnte feststellen werden, dass exogenes IGF-1 zu keiner weitere Steigerung der CgA-Sekretion in unseren Untersuchungen führte. Dies kann auf eine hohe basale Sekretionsrate durch endogene IGF-1-Stimulation zurückgeführt werden.

Die Sekretion von CgA ist maßgeblich durch den Akt- und den ERK-Signalweg induziert (von Wichert et al. 2000). Der jeweilige selektive Inhibitor der beiden Kinasen, LY294002 bzw. PD98059, induziert ebenfalls eine signifikante Abnahme des sezernierten CgA auf 20% bis 10% des Ausgangswertes. Die Wirkung des NVP-AEW541 ist somit in Bezug auf die CgA-Sekretion weniger ausgeprägt als die der jeweiligen selektiven Signalweginhibitoren.

Außer dem IGF-1-System existieren noch weitere, IGF-1-unabhängige, Wege zur Regulation der neuroendokrinen Hormonsekretion. Seit Anfang der 90-er Jahre ist bekannt, dass Phorbol-Ester die CgA-Sekretion in BON-Zellen induzieren (Jeng et

al. 1991) und dass dieser Effekt durch Phorbol-Ester-sensitive Mitglieder der PKC-Familie vermittelt wird (Zhang et al. 1995).
Auch wir konnten zeigen, dass eine Phorbolester-Verbindung, in diesem Fall PMA, die basale CgA-Sekretion in BON-Zellen signifikant steigert. Dieser Effekt wurde weder über den Akt- noch den ERK-Signalweg vermittelt. Weder mit selektivem PI3K-Inhibitor noch mit MEK-Inhibitor konnten die PMA-induzierte Steigerung der CgA-Sekretion aufgehoben werden.
Durch Inhibierung der Autophosphorylierung des IGF-1R mit NVP-AEW541 und damit der IGF-1 induzierten Signalwege konnte die PMA-induzierte Erhöhung der CgA-Sekretion ebenfalls nicht inhibiert werden. NVP-AEW541 hatte somit keinen Einfluss auf eine IGF-1-unabhängige durch PMA-vermittelte CgA-Sekretion und zeigte sich somit als selektiver Inhibitor des IGF-1-Systems.

4.4 NVP-AEW541 hemmt Proliferation der BON-Zellen

In dieser Dissertation konnten wir weiter demonstrieren, dass durch eine Inhibierung der BON-Zellen mit dem selektiven IGF-1R-Ihnibitor NVP-AEW541 der autokrine-IGF-1-Loop der BON-Zellen unterbrochen und die Zellproliferation zum Stillstand gebracht wird. In Konzentrationen zw. 0,5 und 5,0 µM hemmte NVP-AEW541 signifikant die Proliferation der BON-Zellen in unseren Experimenten. Bei einer Konzentration von 2,5 µM kam es zu einer 50%-igen Hemmung.
Unter Inkubation von BON-Zellen mit 2,5 µM NVP-AEW541 kam es weiter über acht Tage zu einer signifikanten Hemmung der Zellvermehrung im Verlauf.
Unsere Daten stimmen mit Ergebnissen von Höpfner et al. überein (Höpfner et al. 2006). Diese Studie zeigte ebenfalls, dass NVP-AEW541 potent das Wachstum humaner gastrointestinaler neuroendokriner Tumorzellen inhibiert. NVP-AEW541 wurde auch in anderen Gewebezellen auf sein anti-proliferatifes Potential getestet. Die Ergebnisse waren ebenfalls mit unseren Daten vergleichbar. Scotlandi und Mitarbeiter berichteten z.B. über einen wachstumshemmenden Effekt von NVP-AEW541 in Osteosarkomzellen bei einer Konzentration zwischen 1 und 6 µM (Scotlandi et al. 2005).
Im Organismus bedeutet ein Proliferationsstopp ein Ende der Tumorgrößenzunahme. Bei Karzinioden bedeutet eine Hemmung der

Hormonsekretion eine Erleichterung der Krankheitssymptome für den Patienten, beides sind in der Therapie von NETs gewünschte Wirkungen.
NVP-AEW541 unterbricht den endogenen IGF-1-Loop der BON-Zellen, hemmt damit die Proliferation und die neuroendokrine Hormonsekretion.

4.5 NVP-AEW541 und möglicher Einsatz als Therapeutikum

Die zentrale Frage dieser Arbeit war die Eignung von NVP-AEW541 als potentielles Therapeutikum in der Behandlung von NETs.
Von unseren Ergebnissen ausgehend, kann man postulieren, dass sich Inhibitoren vom Typ NVP-AEW541 zu therapeutischen Zwecken bei der Behandlung neuroendokriner Tumoren grundsätzlich eignen können.
Zudem ist NVP-AEW541 oral bioverfügbar und somit unkompliziert in seiner Darreichungsform.
Unsere Daten zeigen, dass NVP-AEW541 *in vitro* nicht nur einen antiproliferativen Effekt auf BON-Zellen ausübt, sondern dass die beobachtete Senkung der CgA-Sekretion auch für eine funktionelle Hemmung der Zellen spricht. So kann Einfluss auf das Hypersekretionssyndrom mit Flush, Diarrhöe, abdominellen Krämpfen usw. Einfluss genommen werden, während gleichzeitig das Tumorwachstum gehemmt wird.
Allerdings gibt es Hinweise für die Existenz IGF-1 unabhängiger Stimulationswege für die CgA-Sekretion, die durch alleinige Hemmung mit NVP-AEW541 nicht beeinflusst werden können.
Ein weiteres Argument für den Einsatz von NVP-AEW541 ist die Kombinationsmöglichkeit mit anderen Substanzen. Es wurde berichtet, dass IGF-1 die Reaktion der Krebszellen auf Chemotherapeutika abschwächt (LeRoith and Roberts 2003; Baserga, Peruzzi, and Reiss 2003). Eine Hemmung der IGF-1-Aktivität könnte ein sinnvoller Begleiter jeder cytotoxischen Chemotherapie sein und geringere Medikamentendosen gestatten (Tazzari et al. 2007).
Doxorubicin und 5-Fluorouracil (5-FU) sind etablierte cytostatische Substanzen für eine Behandlung der NET-Erkrankung (Oberg 2001). Chemotherapeutika sind jedoch nicht immer eine erfolgreiche Behandlungsstrategie, da die Ansprechraten

aufgrund der niedrigen Proliferationsrate der NETs nur gering sind (Oberg 2001; Oberg 2002). Die Kombination aus NVP-AEW541 und Doxorubicin bzw. 5-FU führte zu additiven antiproliferativen Effekten in BON-Zellen und humanen Insulinomzellen (CM) (Hopfner et al. 2006).
Eine mögliche Nebenwirkung von NVP-AEW541, die auf der hohen Homologie der Kinase-Region des IGF-1- und des Insulin-Rezeptors basiert, könnte die Verursachung von iatrogenem Diabetes mellitus sein.
In vitro Untersuchungen zeigten jedoch eine 27-fach höhere Selektivität von NVP-AEW541 gegenüber dem IGF-1-Rezeptor (Garcia-Echeverria et al. 2004). Eine *in vivo* durchgeführte Studie zeigte keine Erhöhung der Blutglukosewerte oder andere Nebenwirkungen in den mit NVP-AEW541 behandelten Tieren (Manara MC. 2007). Ein zusätzlicher Effekt auf den Insulin-R *in vivo* kann trotz allem nicht ausgeschlossen werden.

4.6 Schlussfolgerung

Alle unsere Untersuchungen fanden *in vitro* an BON-Zellen, die humanen Pankreaskarzinoidtumoren entstammen, statt.
Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass der selektive IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 effektiv den IGF-1-Rezeptor inhibiert. Die Aktivität der IGF-1 induzierten Signalwege Akt und ERK wird in Abhängigkeit der Inhibierung des IGF-1-Rezeptors mit NVP-AEW541 gehemmt. Des Weiteren kommt es zu Inhibierung der CgA-Sekretion und der Zellproliferation der BON-Zellen.
Somit scheint die Inhibierung des IGF-1-Rezeptors durch NVP-AEW541 eine pharmakologische Therapieoption für neuroendokrine Tumore darzustellen.

5. Zusammenfassung

Funktionell-aktive und –inaktive neuroendokrine Tumore (NETs) sind seltene gastrointestinale Tumore, deren Inzidenz jedoch stetig zunimmt. Ein Modell für die neuroendokrinen Tumorzellen ist die Zelllinie BON. Mit Hilfe von Chromogranin-A(CgA)-Bestimmung im Serum gelingt die Diagnostik.

Zellwachstum und Sekretion von CgA in BON-Zellen unterliegen einer Insulin-like-Growth-factor-1(IGF-1)-autokrinen Regulation. Über die Aktivierung des IGF-1-Rezeptors (IGF-1R) werden verschiedene Signalwege in Gang gesetzt. Einer davon besteht aus Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR), ein weiterer aus mitogen aktivierter Proteinkinase/MAPK-Kinase/extracellular signal-regulated Proteinkinase (MAPK/MEK/ERK). Beide Signaltransduktionskaskaden sind maßgeblich an Zellproliferation und Hormonsekretion beteiligt.

Mit Hilfe des oral bioverfügbaren, selektiven IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541, der zur Gruppe der Pyrrolol(2,3-d)pyrimidine gehört, kann die IGF-1-Rezeptor-*in-vitro*-Tyrosikinaseaktivität inhibiert werden.

In dieser Dissertation wurde erstmalig demonstriert, dass der endogene IGF-1-Loop der BON-Zellen durch NVP-AEW541 unterbrochen werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass der IGF-1R der BON-Zellen durch NVP-AEW541 in seiner basalen Aktivität signifikant gehemmt wird.

Im Weiteren wurde gezeigt, dass eine Behandlung der BON-Zellen mit NVP-AEW541 zu einer signifikanten Reduktion der basalen Kinasenaktivität von Akt und ERK führt, die mit dem Effekt von selektiven Signalweg-Inhibitoren vergleichbar ist.

Die von NVP-AEW541 auf die neuroendokrine Sekretion der BON-Zellen ließ sich an Hand der Sekretion von CgA in das Medium überprüfen. Die CgA-Sekretion wurde durch Inhibierung des IGF-1-Rezeptors mit NVP-AEW541 konsekutiv gehemmt. Dieser Effekt war schwächer im Vergleich mit dem der selektiven Akt- und ERK-Signalweg-Inhibitoren. Dabei war dieser Effekt unabhängig von Phorbolester-induzierten Signalwegen.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zu der konstitutiven Kinasenaktivität konnte auch die Zellproliferation der BON-Zellen mit Hilfe des IGF-1R-Inhibitors signifikant gehemmt werden.

Das Risiko für Nebenwirkungen von NVP-AEW541 birgt die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem IGF-1- und dem Insulin-Rezeptor. Vor allem die Auslösung von Diabetes gilt als gravierendster Nebeneffekt.

Der IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 kann als ein vielversprechendes potentielles Therapeutikum zur Behandlung neuroendokriner Gastrointestinaltumore gelten, vor allem aufgrund der Möglichkeit Proliferation und neuroendokrine (Hyper-) Sekretion, zwei zentrale Eigenschaften von NETs, zu inhibieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Alessi, D. R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. T., Saltiel A. R.: PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. Journal of Biological Chemistry 270, 27489-27494 (1995).
2. Altomare D. A., Testa J. R.: Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. Oncogene 24, 7455-7464 (2005).
3. Arnold R.: Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Introduction: Definition, historical aspects, classification, staging, prognosis and therapeutic options. Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology 19, 491-505 (2005).
4. Arnold C.: Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis 96, 19-28 (2007).
5. Baserga R.: The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. Oncogene 19, 5574-5581 (2000).
6. Baserga R., Peruzzi F., Reiss K.: The IGF-1 receptor in cancer biology. International Journal of Cancer 107, 873-877 (2003).
7. Bentires-Alj M., Kontaridis M. I., Neel B. G.: Stops along the RAS pathway in human genetic disease. Nature Medicine 12, 283-285 (2006).
8. Blume-Jensen, P., and T. Hunter. Oncogenic kinase signalling. Nature 411, 355-365 (2001)
9. Boule N., Logie A., Gicque C., Perin L., LeBouc Y.: Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumours. Journal of Clinical. Endocrinology and Metabolism 83, 1713-1720 (1998).
10. Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J., Greenberg M. E.: Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. Cell 96, 857-868 (1999).
11. Caplin M. E., Buscombe J. R., Hilson A. J., Jones A. L., Watkinson A. F., Burroughs A. K.: Carcinoid tumours. Lancet 325, 799-805 (1998)
12. Clark J. A., Black A. R., Leontieva O. V., Frey M. R., Pysz M. A., Kunneva L., Woloszynska-Read A., Roy D., Black J. D.: Involvement of the ERK signaling cascade in protein kinase C-mediated cell cycle arrestin intestinal epitheliai cells. Journal of Biological Chemistry 279, 9233-9247 (2004).
13. Cullen K. J., Yee D., Sly W. S., Perdue J., Hampton B., Lippman M. E., Rosen N.: Insulin-like growth factor receptor expression and function in human breast cancer. Cancer Research 50, 48-53 (1990).
14. Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y, Greenberg M. E.: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 91, 231-241 (1997).
15. Davies S. P., Reddy H., Caivano M., Cohen P.: Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochemical Journal 351, 95-105 (2000).
16. de Herder W. W., Krenning E. P., Van Eijck C. H., Lamberts S. W.: Considerations concerning a tailored, individualized therapeutic management of patients with (neuro)endocrine tumours of the

gastrointestinal tract and pancreas. Endocrine-Related Cancer 11, 19-34 (2004).
17. del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., Nunez G.: Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase akt. Science 278, 687-689 (1997).
18. Delafontaine P., Song Y. H., Li Y.: Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology 24, 435-444 (2004).
19. Dudley D. T., Pang L., Decker S. J., Bridges A. J., Saltiel A. R.: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 7686-7689 (1995).
20. Evers B. M., Ishuzuka J., Townsend C. M. Jr., Thompson J. C.: The human carcinoid cell line,BON. A Modell system for the study of carcinoid tumors. Annals of the New York Academy of Sciences 733, 393-406 (1994).
21. Forrer F., Uusijävi H., Waldherr C., et al.: A comparison of 111In-DOTATOC and 111In-DOTATATE biodistribution and dosimetrie in the same patients with metastasic neuroendocrine tumour. European Journal of Nuclear Medicin and Molecular Imaging 31, 1257-1262 (2004). E.
22. Fottner C., Hoeflich A., Wolf, Weber M. M.: Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. Hormone & Metabolic Research 36, 397-405 (2004).
23. Friedrichs N., Kuchler J., Endl E., Koch A., Czerwitzki J., Wurst P., Metzger D.: Insulin-like growth factor-1 receptor acts as a growth regulator in synovial sarcoma. Journal of Pathology 216, 428-439 (2008).
24. Garcia-Echeverria C., Pearson M. A., Marti A., Meyer T., Mestan J., Zimmermann J., Gao J.,: In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. Cancer Cell 5, 231-239 (2004).
25. Gumpp V., Henß H.: www.krebs-webweiser.de/Wir-ueber-uns/Klin-Krebsregister/dokumentation/kodierung/cccf_kkr_kodierhilfe_net_git.pdf: Neuroendokriner Tumor des Gastrointestinaltrakts (04.09.2010).
26. Hoeflich A., Yang Y., Huber S., Rascer W., Koepf G., Blum W. F., Heinz-Erian P., Kolb H. J., Kiess W.: Expression of IGFBP-2, -3 and -4 mRNA during differentation of CaCo-2 colon epithelial cells. American Journal of Physiology 270, 922-931 (1996).
27. Hopfner M., Baradari V., Huether A., Schofl C., Scherubl H.: The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours. Endocrine-Related Cancer 13, 135-149 (2006).
28. Jacob A., Lee T. X., Neff B. A., Miller S., Welling B., Chang L. S.: Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation in human vestibular schwannoma. Otology & Neurotology 29, 58-68 (2008).
29. Jeng Y. J., Townsend C. M. Jr, Nagasawa S., Chuo S., Kern K., Yanaihara N., Ferrar R. S., Hill F. L., Thompson J. C., Greeley G. H.Jr.: Regulation of pancreastatin release from a human pancreatic carcinoid cell line in vitro. Endocrinology 128, 220-225 (1991).
30. Kim S. K., Abdelmegeed M. A., Novak R. F.: The mitogen-activated protein kinase kinase (mek) inhibitor PD98059 elevates primary cultured rat

hepatocyte glutathione levels independent of inhibiting mek. Drug Metabolism & Disposition 34, 683-689 (2006).
31. Kloppel G., Perren A., Heitz P. U.: The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: The WHO classification. Annals of the New York Academy of Sciences 1014, 13-27 (2004).
32. Kulke M. H.: Gastrointestinal neuroendocrine tumors: A role for targeted therapies? Endocrine-Related Cancer 14, 207-219 (2007).
33. Kulke M. H., Kim H., Clark J. W., Enzinger P. C., Lynch T. J., Morgan J. A., Vincitore M., Michelini A., Fuchs C. S.: A phase II trial of gemcitabine for metastatic neuroendocrine tumors. Cancer 101, 934-939 (2004).
34. Kunnimalaiyaan M., Chen H.: The raf-1 pathway: A molecular target for treatment of select neuroendocrine tumors? Anti-Cancer Drugs 17, 139-142 (2006).
35. Langley K.: The neuroendocrine concept today. Annals of the New York Academy of Sciences 733, 1-17 (1994).
36. LeRoith D., Roberts C. T. Jr.: The insulin-like growth factor system and cancer. Cancer Letters 195, 127-137 (2003).
37. Lloyd A. C.: Distinct functions for ERKs? Journal of Biology 5, 13 (2006).
38. Manara M. C., Landuzzi L., Nanni P., Nicoletti G., Zambelli D., Lollini P. L., Nanni C.: Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor--specific inhibitor in ewing's sarcoma. Clinical Cancer Research 13, 1322-1330 (2007).
39. Menounty M., Binoux M., Bajako S.: IGFBP-2 expression in a human cell line is associated with increased IGFBP-3 proteolysis, decreased IGFBP-1 expression and increased tumourigenicity. International Journal of Cancer 77, 874-879 (1998).
40. Mitsiades C. S., Mitsiades N. S., McMullan C. J., Poulaki V., Shringarpure R., Akiyama M., Hideshima T.: Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. Cancer Cell 5, 221-230 (2004).
41. Modlin I. M., Lye K. D., Kidd M.: A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. Cancer 97, 934-959 (2003).
42. Mora A., Komander D., van Aalten D. M., Alessi D. R.: PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. Seminars in Cell & Developmental Biology 15, 161-170 (2004).
43. Morgensztern D., McLeod H. L.: PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. Anti-Cancer Drugs 16, 797-803 (2005).
44. Nilsson O., Wangberg B., Kolby L., Schultz G. S, Ahlman H.: Expression of transforming growth factor alpha and its receptor in human neuroendocrine tumours. International Journal of Cancer 60, 645-651 (1995).
45. Oberg K.: Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: Recent advances in molecular genetics, diagnosis, and treatment. Current Opinion in Oncology 17, 386-391 (2005).
46. Oberg K.: Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumours. Annals of Oncology 12, 111-114 (2001)
47. Oberg K., Astrup L., Eriksson B., Falkmer S. E., Falkmer U. G., Gustafsen J., Haglund C.: Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (including bronchopulmonary and thymic neoplasms). part I-general overview. Acta Oncologica 43, 617-625 (2004).

48. Oberg K., Kvols L., Caplin M., Delle Fave G., de Herder W., Rindi G., Ruszniewski P., Woltering E. A., Wiedenmann B.: Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. Annals of Oncology 15, 966-973 (2004).
49. Pearse A. G.: The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 17, 303-313 (1969).
50. Pearse A. G.: Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C cells and calcitonin. Proceedings of the Royal Society of London.Series B, Containing Papers of a Biological Character 170, 71-80 (1968).
51. Ouinn K. A., Treston M. A., Unsworth E. J., Miller M. J., Vos M., Grimley C., Battey J., Mulshine J.L., Cuttitta F.: Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. Journal of Biologocal Chemistry 271, 11477-11483 (1996).
52. Ricke J., Klose K. J.: Imaging procedures in neuroendocrine tumours. Digestion 62, 39-44 (2000).
53. Rindi G., Kloppel G., Alhman H., Caplin M., Couvelard A., de Herder W. W,. Erikssson B., Falchetti A., Falconi M., Komminoth P. S., Korner M., Lopes J. M., McNicol A. M., Nilsson O., Perren A., Scarpa A., Scoazec J. Y., Wiedenmann B.: Consensus Conference participants. European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS). TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: A consensus proposal including a grading system. Virchows Archiv 449, 395-401 (2006).
54. Rothenstein J., Cleary S. P., Pond G. R., Dale D., Gallinger S., Moore M. J., Brierley J., Siu L. L.: Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: A decade of experience at the princess margaret hospital. American Journal of Clinical Oncology 31, 64-70 (2008).
55. Sandhu M. S., Dunger D. B., Giovannucci E. L.: Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. Journal of the National Cancer Institute 94, 972-980 (2002).
56. Scharf J. G., Braulke T.: The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. Hormone & Metabolic Research 35, 685-693 (2003).
57. Scotlandi K., Manara M. C., Nicoletti G., Lollini P. L., Lukas S., Benini S., Croci S., et al.: Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. Cancer Research 65, 3868-3876 (2005).
58. Seregni E., Ferrari L., Bajetta E., Martinetti A., Bombardieri E.: Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours. Annals of Oncology 12, 69-72 (2001).
59. Stivanello M., Berruti A., Torta M., Termine A., Tampellini M., Gorzegno G., Angeli A., Dogliotti L.: Circulating chromogranin A in the assessment of patients with neuroendocrine tumours. A single institution experience. Annals of Oncology 12, 73-77 (2001).

60. Stewart C. E. H., Rotwein P.: Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions of insulin-like growth factors. Physiological Reviews 76, 1005-1026 (1996).
61. Tanno B., Mancini C., Vitali R., Mancuso M., McDowell H. P., Dominici C., Raschellà G.: Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo. Clinical Cancer Research 12, 6772-6780 (2006).
62. Taupenot L., Harper K. L., O'Connor D. T.: The chromogranin-secretogranin family. New England Journal of Medicine 348, 1134-1149 (2003).
63. Tazzari P. L., Tabellini G., Bortul R., Papa V., Evangelisti C., Grafone T., Martinelli G., McCubrey J. A., Martelli A. M.: The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells exhibiting autocrine insulin-like growth factor-I secretion. Leukemia 21, 886-896 (2007).
64. Thiel G., Rössler O. G.: Rezeptor-Tyrosinkinasen und intrazelluläre Signalkaskasen. Biologie Unserer Zeit 35, 312-319 (2005).
65. Toker A., Newton A. C.: Cellular signaling: Pivoting around PDK-1. Cell 103, 185-188 (2000).
66. Toker A., Yoeli-Lerner M.: Akt signaling and cancer: Surviving but not moving on. Cancer Research 66, 3963-3966 (2006).
67. Tomassetti P., Migliori M., Simoni P., Casadei R., De Iasio R., Corinaldesi R., Gullo L.: Diagnostic value of plasma chromogranin A in neuroendocrine tumours. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 13, 55-58 (2001)
68. Vilar E., Salazar R., Perez-Garcia J., Cortes J., Oberg K., Tabernero J.: Chemotherapy and role of the proliferation marker ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. Endocrine-Related Cancer 14, 221-32 (2007).
69. Vlahos C. J., Matter W. F., Hui K. Y., Brown R. F.: A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). Journal of Biological Chemistry 269, 5241-5248 (1994).
70. von Wichert G., Jehle P. M., Hoeflich A., Koschnick S., Dralle H., Wolf E., Wiedenmann B., Boehm B. O., Adler G., Seufferlein T.: Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. Cancer Research 60, 4573-4581 (2000).
71. Wang Y., Sun Y.: Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: Blocking transformation and inducing apoptosis. Current Cancer Drug Targets 2, 191-207 (2002).
72. Wang Z., Ruan Y. B., Guan Y., Liu S. H.: Expression of IGF-II in early experimental hepatocellular carcinomas and its significance in early diagnosis. World Journal of Gastroenterology 9, 267-270 (2003).
73. Welin S. V., Janson E. T., Sundin A., Stridsberg M., Lavenius E., Granberg D., Skogseid B., Oberg K. E., Eriksson B. K.: High-dose treatment with a long-acting somatostatin analogue in patients with advanced midgut carcinoid tumours. European Journal of Endocrinology 151, 107-112 (2004).
74. Winkler H., Fischer-Colbrie R.: The chromogranins A and B: The first 25 years and future perspectives. Neuroscience 49, 497-528 (1992).
75. Wulbrand U., Remmert G., Zofel P., Wied M., Arnold R., Fehmann H. C.: mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours. European Journal of Clinical Investigation 30, 729-739 (2000).

76. Yao X., Hu J. F., Daniels M., Yien H., Lu H., Sharan H., Zhou X.: A novel orthotopic tumor model to study growth factors and oncogenes in hepatocarcinogenesis. Clinical Cancer Research 9, 2719-2726 (2003).
77. Yoon S., Seger R.: The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors 24, 21-44 (2006).
78. Zapf J.: Physiological role of the insulin-like growth factor binding proteins. European Journal of Endocrinology. 132, 645-654 (1995).
79. Zhang H., Yee D.: The therapeutic potential of agents targeting the type I insulin-like growth factor receptor. Expert Opinion on Investigational Drugs 13, 1569-1577 (2004).
80. Zhang J., Jia Z., Li Q., Wang L., Rashid A., Zhu Z., Evans D. B., Vauthey J. N., Xie K., Yao J. C.: Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. Cancer 109, 1478-1486 (2007)
81. Zhang T., Townsend C. M. Jr, Udupi V., Yanaihara N., Rajaraman S., Beauchamp R. D., Ishizuka J., Evers B. M., Gomez G., Thompson J. C.: Phorbol ester-induced alteration in the pattern of secretion and storage of chromogranin A and neurotensin in a human pancreatic carcinoid cell line. Endocrinology 136, 2252-2261 (1995).
82. Zhou B. P., Liao Y., Xia W., Zou Y., Spohn B., Hung M. C.: HER-2/neu induces p53 ubiquitination via akt-mediated MDM2 phosphorylation. Nature Cell Biology 3, 973-982 (2001).

7. Danksagung

Mein Dank gilt

…Herrn Prof. Götz von Wichert und Prof. Dr. Adler für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation in der Abteilung Innere Medizin I.

…meinem Doktorvater Herrn Thomas Seufferlein für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, für die nette Betreuung, die fachliche Anleitung und die vielen geduldigen Korrekturen.

…allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die tatkräftige Unterstützung, die große Hilfe beim Erlernen der Methoden und die gute Atmosphäre im Labor.

… Luci Levit, Stefanie Rankl und Melanie Güthle für schnelles Korrekturlesen und anhaltende Motivation.

…meinen Eltern und Oma für die selbstlose Unterstützung, grenzenloses Vertrauen und bedingungslose Liebe!

…Markus für die Geduld, das Mutmachen und den Glauben an mich!

8. Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.