

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

Direktor Prof. Dr. med. Martin Reincke

Neuroendokrine Tumoren - Charakterisierung der Rolle von cMET Inhibition und MDM2 Inhibition als neue molekular zielgerichtete Therapieoptionen am in vitro Model

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von:
Clemens Benjamin Reuther
aus München
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München:

Berichtersteller:
Prof. Dr. med. Christoph Auernhammer

Mitberichtersteller:
Prof. Dr. Hans Arnholdt
Priv. - Doz. Dr. Dorit Di Gioia

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:
PD Dr. med. G. Vlotides

Dekan:
Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2019

Eidesstattliche Versicherung

Reuther Clemens Benjamin

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Neuroendokrine Tumoren – Charakterisierung der Rolle von cMET Inhibition und MDM2 Inhibition als neue molekular zielgerichtete Therapieoptionen am in vitro Model“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Rimsting, den 5.06.2018

Clemens Benjamin Reuther

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Definition.....	6
1.2	Geschichte und Klassifikation	6
1.3	Klinik.....	8
1.4	Diagnostik.....	9
1.5	Therapie.....	11
1.6	Neue Therapieoptionen.....	13
1.6.1	Der Hepatocyte Growth Factor - (HGF) c-Met-Signalweg als „target“ in humanen neuroendokrinen Tumorzellen in vitro	13
1.6.2	Wiederherstellung der wildtyp-p53 Funktion in GEP-NET-Zellen durch MDM2 - Inhibition.....	17
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material.....	19
2.2	Methoden.....	23
3	Ergebnisse	30
3.1	Teil I	30
3.1.1	Humane neuroendokrine Tumorzelllinien exprimieren c-Met und seinen Liganden HGF	30
3.1.2	Die Multi-TKIs Cabozantinib und Tivantinib inhibieren die Viabilität von NETs, während der spezifische c-Met Inhibitor INC280 keinen Effekt hat.....	31
3.1.3	Die Inhibition der c-Met Expression durch siRNA hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität	33
3.1.4	Unterschiedliche Effekte von INC280, Cabozantinib und Tivantinib auf die c-Met Aktivität.....	33
3.1.5	Cabozantinib und Tivantinib bewirken einen G2-Arrest bei NET, im Gegensatz zu INC280.....	36
3.1.6	Unterschiedliche Effekte von INC280, Cabozantinib und Tivantinib auf die c-Met Aktivität und verschiedene Proteinmarker des Zellzyklus und der Apoptose.	38
3.1.7	Die Zellmigration der NET wird durch Cabozantinib und Tivantinib blockiert, jedoch nicht durch den spezifischen c-Met Inhibitor INC280	40
3.2	Teil II.....	42
3.2.1	Unterschiedliche Expressionsmuster des Tumorsuppressor p53 in humanen Neuroendokrinen Tumorzelllinien.	42
3.2.2	Effekte des MDM2 Inhibitors NVP-CGM097 auf die MDM2-p53-p21-Rb-E2F1 Kaskade. Der MDM2 Inhibitor NVP-CGM097 führt zu einer Erhöhung von MDM2, pMDM2, p53 und seinen bekannten „downstream-targets“ p21 und PUMA bei gleichzeitiger Erniedrigung von phosphoRb und E2F1 in GOT1 Tumorzellen.	43
3.2.3	Bon1 und NCI-H727 Tumorzellen weisen jeweils eine TP53 Genmutation auf.	44

3.2.4	Effekte des Inhibitors NVP-CGM097 auf die Viabilität der neuroendokrinen GOT1 Tumorzellen.	46
3.2.4.1.	Additive Effekte auf die Zellviabilität bei Kombination der MDM2 Inhibition mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001)	48
3.2.5	Additive Effekte der Kombination aus NVP-CGM097 mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001) auf Proteinebene.....	50
3.2.5.1	Additive Effekte der Kombination von NVP-CGM097 mit 5-Fluoruracil in p53 ^{wildtype} von GOT1-Tumorzellen.	50
3.2.5.2	Additive Effekte der Kombination von NVP-CGM097 mit Everolimus in p53 ^{wildtype} von GOT1-Tumorzellen.	50
3.2.5.3	Additive Effekte der Kombination von NVP-CGM097 mit Temozolomid in p53 ^{wildtype} von GOT1-Tumorzellen.	50
3.2.6	NVP-CGM097 zeigt einen Einfluss auf die Caspase-Aktivität und greift in den Zellzyklus der p53 ^{wildtype} GOT1-Tumorzellen ein.....	52
4	Diskussion.....	56
4.1	Teil I.....	56
4.2	Teil II.....	59
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis.....	64
7	Abkürzungsverzeichnis.....	79
8	Tabellenverzeichnis.....	82
9	Abbildungsverzeichnis.....	83
10	Publikationen	87
11	Danksagung.....	88

1 Einleitung

1.1 Definition

Neuroendokrine Tumore (NET) sind eine seltene Tumorentität mit hauptsächlichem Vorkommen im gastroenteropankreatischen Systems (GEP) sowie der Lunge [Frilling A et al, Endocr Relat Cancer 2012]. Ihre Inzidenz in Deutschland beträgt 2,5-3,3/100.000 pro Jahr [Tumorregister München, 2012 www.tumorregister-muenchen.de].

Der Begriff „Neuroendokrin“ leitet sich von den Eigenschaften der Zellen ab, bioaktive Substanzen mit Neurotransmitteraktivität (Synaptophysin, Chromogranin A und neuronenspezifische Enolase) freizusetzen, sowie Hormone bzw. hormonähnliche Stoffe zu produzieren.

1.2 Geschichte und Klassifikation

1907 beschrieb Siegfried Oberndorfer zum ersten Mal Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems, indem er Karzinoid von Karzinomen des Gastrointestinaltrakt differenzierte [Oberndorfer S. 1907, „Karzinoid des Dünndarms“, Frankfurter Z. Pathol. 1-426-432]. Die untersuchten Neoplasien im Darm, deren Ursprung Enterochromaffine (ECL)-Zellen waren und Serotonin produzierten, hielt er aufgrund ihrer Seltenheit und deren langsamen Wachstums, im Vergleich zu Adenokarzinomen, für benigne Tumore. Auf Grund dieser Feststellung bezeichnete er sie als „Karzinoid Tumore“ [Klöppel G, et al Ann NY Acad Sci 2007; Klöppel G, et al Endocr Pathol 2007]. Der Begriff Karzinoid ist für NET des GEP-Systems heute nicht mehr gebräuchlich, während er bei NET der Lunge noch Anwendung findet. Williams ED. und Sandler M. et al. beschrieben in den 1960er Jahren die erste genauere Einteilung dieser karzinoiden Tumore [Williams ED. & Sandler M. et al, Lancet 1963]. Diese Einteilung wurde aufgrund der Lokalisation des Primärtumors und der embryonalen Entwicklung durchgeführt und sie wurden in Karzinoid des Vorderdarms (Lunge, Magen, Duodenum und Pankreas), des Mitteldarms (Jejunum, Ileum, Blinddarm, Appendix) und des Enddarms (Colon bis Rektum) unterteilt. Jedoch erlaubte diese Einteilung, ebenso wie die erste WHO Klassifizierung von 1980, keine adäquate Aussage über den Verlauf der Erkrankung. Im Jahr 2000 wurde eine modifizierte WHO-Klassifikation [Solcia E. et al, International Histological Classification of Tumours 2000], basierend auf der Einteilung von Capella C. [Capella C. et al, Virchows Arch 1995], veröffentlicht.

Nach der WHO-Klassifikation 2000 wurden die NET nach Lokalisation des Primarius (Lunge, Magen, Duodenum, Pankreas, Jejunum/Ileum Appendix Colon und Rektum), sowie nach ihrer biologischen funktionellen Aktivität in „funktionell-aktiv“ versus „funktionell-inaktiv“ unterteilt. In der WHO-Klassifikation 2000 wurden die NET nicht mehr einheitlich als Karzinoid bezeichnet, sondern anhand ihrer Größe, Wachstumsverhalten und Grad der Entartung in

- 1) hoch differenzierte neuroendokrine Tumore mit benignem oder unklarem Verhalten
- 2) hoch differenzierte neuroendokrine Tumore mit niedrig malignem Verhalten
- 3) schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome mit hochmalignem Verlauf

unterteilt.

Aktuell werden die GEP-NET nach der derzeit gültigen WHO-Klassifikation von 2010 für Gastrointestinale Tumoren [Bosman F. et al, IRAC Press 2010] und der WHO Klassifikation von 2017 für Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas [Lloyd RV et al, LARC 2017] klassifiziert (Tabelle 1).

Diese Klassifikation löste frühere WHO-Einteilungen ab. Die neue Einteilung der neuroendokrinen Neoplasien (NEN), folgt einem zweistufigen Algorithmus mit der prinzipiellen Annahme, dass alle NEN ein malignes Potenzial besitzen [Klöppel G. et al, Endocr Relat Cancer 2011]. Desweiteren wird die hormonelle Aktivität beurteilt. Eine Hormonproduktion lässt sich bei vielen NET im Serum nachweisen [Ferolla P. et al, J Endocrinol Invest. 2008], jedoch ist ein klinisches hormonelles Syndrom, mit einhergehendem erhöhtem Serumhormonwert nur bei wenigen NET festzustellen. Somit werden sie als funktionell-inaktiv bezeichnet. Ein funktionell-aktiver GEP-NET wird typischer Weise über die klinische Symptomatik definiert [Anlauf M. et al, World J Gastro 2006].

Das zur Histologie benötigte Material wird durch eine Biopsie bzw. durch operative Entfernung des Primärtumors oder dessen Metastasen bereitgestellt [Köppel G. et al, Virchows Arch 2007].

Der Nachweis des Vorliegens einer neuroendokrinen Neoplasie erfolgt durch immunhistochemische Untersuchungen mit speziellen Antikörpern gegen Synaptophysin und Chromogranin A. Dabei muss Synaptophysin in allen untersuchten NEN positiv sein, da dieses Protein, unabhängig von seinem Hormongehalt, in vesikulären (kleinen) Granula des Zytoplasmas neuroendokriner Zellen vorkommt. Chromogranin A (CgA) ist ein saures Glykoprotein welches mit einer Sensitivität von 50-90% und Spezifität von 83-99% [Köppel G. et al, ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors 2009] in den „großen“ Vesikeln (Sekretionsgranula) von NET-Zellen vorkommt.

Da ein Großteil der NET (80-95%) Somatostatin-Rezeptoren (SSTR) auf der Zelloberfläche exprimieren, wird das NET-Gewebe auf Vorliegen von SSTR, mittels Immunfärbung, untersucht. Dabei ist der Rezeptor-Subtyp 2 der wichtigste Marker, da dieser mehrheitlich von NET exprimiert wird [Reudi JC et al, J Steroid Biochem Mol Biol. 1992; Bombardieri E. et al, Oncology Committee of the EANM 2010].

Die Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien (NEN) erfolgt auf der Basis des histomorphologischen Differenzierungsgrads sowie der Proliferationsaktivität und dem daraus abgeleiteten Grading entsprechend den WHO Klassifikationen von 2010 [Bosman F. et al, IRAC Press 2010] und 2017 [Lloyd RV et al. IARC 2017].

Entsprechend ihrer histomorphologischen Differenzierung werden gut differenzierte neuroendokrine Tumoren (NET) und gering differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC) unterschieden.

Das Grading-System wurde von Rindi G. im Jahr 2006 und 2007 erstmalig vorgestellt [Rindi G. et al, Virchows Arch 2006+2007]. Mittlerweile wurde dieses Grading-System in die WHO Klassifikationen mit übernommen. Anhand des Grading werden die NET in NET G1 (Karzinoid), NET G2 und die sehr seltenen NET G3 unterschieden; NEC weisen dagegen immer ein Grading G3 auf (Tabelle 1). Die WHO empfiehlt die Proliferationsaktivität und das Grading, entweder über die Zahl der Mitosen auf 10 HPF (high power field = 2mm²), oder durch die Bestimmung des Proliferationsindex mittels Antikörperfärbung für MIB-1 / Ki-67 (in %) zu ermitteln (Tabelle 2). In der Praxis zeigte sich aufgrund der guten Anwendbarkeit, die Bestimmung des MIB-1/Ki-67 basierten Proliferationsindex als Vorteil, da sich die MIB-1/Ki67-positiven Zellen besser zählen lassen. Bei Ki-67 handelt es sich um ein Antigen (Protein Ki-67) aus dem Zellkern, das zum Zeitpunkt der Mitose in der G1-, S-, G2 und M-Phase nachgewiesen werden kann, jedoch nicht bei ruhenden (G0-Phase) Zellen. Dadurch wird Ki-67 zu einem guten Marker um die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen, da dieses Antigen nicht in DNA-Reparatur-Mechanismen eingebunden ist [Vilar E. et al, Endocr Relat Cancer 2007]. Das Antigen Ki-67 wird mit Hilfe des MIB-1-Antikörper (Molecular Immunology Borstel), durch Immunfärbung, markiert. Gefärbte Areale im Gewebe werden gescannt und Abschnitte mit hoher Farbintensität beurteilt. Um den MIB-1- / Ki-67- Proliferationsindex zu bestimmen, wird der Prozentsatz, der immunhistochemisch positiv angefärbten Zellen, bestimmt. (Tabelle 2) [Rindi G. et al, Virchows Arch 2006+2007].

Tumortyp	Neuroendokriner Tumor – NET G1	Neuroendokriner Tumor – NET G2	Neuroendokrines Karzinom – NEC
Histologie	gut differenziert	gut differenziert	gering differenziert
Grading	G1	G2	G3
KI-67	< 2 %	3 – 20 %	> 20 %

Tabelle 1 - WHO-Klassifikation 2010 der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien [Bosman F. et al, IRAC Press 2010; Lloyd RV. et al, IRAC 2017].

Das Tumorigradung hat einen erheblichen Einfluss auf die Prognose der Patienten hinsichtlich des Gesamtüberlebens [Dasari A et al, JAMA Oncol. 2017].

Grad	Mitosezahl (10HPF*)	MIB-1-Index (%) **
G1	< 2	≤ 2
G2	2-20	3-20
G3	> 20	> 20
* 10 HPF (high power fields) = 2 mm ²		
** MIB-1/Ki-67-Antikörper: % von 2000 Zellen im Bereich der stärksten Proliferation (sog. Hot-Spot-Region)		

Tabelle 2 - Grading NEN des GEP-System [MANUAL Endokrine Tumore, 2013 3.Auflage].

Auf Basis der Proliferationsaktivität werden bei den NET G1-Tumore (Ki-67 ≤ 2%), G2-Tumore (Ki-67 3-20%) und G3-Tumore (Ki-67 ≥ 20%) unterteilt.

Für Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas werden nach der WHO Klassifikation 2017 aktuell zusätzlich noch die seltenen gut differenzierten neuroendokrinen Tumore (NET) G3 von den gering differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (NEC) unterschieden [Lloyd RV et al. IARC 2017].

1.3 Klinik

Da es sich bei NET-GEP meist um sehr langsam wachsende Neoplasien, mit unspezifischen klinischen Symptomen handelt, kommt es erst bei größeren Tumormassen zu Beschwerden und daraufhin zur Diagnose. Vor allem *funktionell inaktive NET* bleiben häufig lange unentdeckt, sodass sich der Zeitpunkt zur Erstdiagnose um teilweise mehr als 5 Jahre verzögern kann [Toth-Fejel S. & Pommier RF, American J Surgery 2004]. Sie bleiben daher meist lange klinisch unauffällig und es kommt erst im späteren Verlauf durch lokalverdrängendes Wachstum (Bauchschmerzen), Cholestase und Ikterus zur Diagnose [Massironi S. et al., World j Gastroenterol 2008]. Aufgrund des späten Zeitpunkts bei Diagnosestellung liegt häufig bereits ein fortgeschrittenes Krankheitsbild mit Fernmetastasen vor. Die meisten Metastasen befinden sich in der Leber (85%) gefolgt von der Peritonealhöhle und den Knochen [Pape UF. et al., Endocr Relat Cancer 2008].

Funktionell aktive NET des Pankreas und des Ileum / Jejunum lassen sich wie folgt übersichtsartig darstellen:

NET des Pankreas haben ihren Ursprung aus verschiedenen Zelltypen der Langerhans-Inseln.

Beispiel für den häufigsten funktionell-aktiven NET des Pankreas, sind *Insulinome* mit einer Inzidenz von 1-3 / 1.000.000 pro Jahr. Sie machen 40-70% aller funktionell-aktiven NET des Pankreas aus und kommen somit am häufigsten vor [MANUAL Endokrine Tumore, 2013 3. Aufl. Zuckerschwerdt]. Diese Tumore entstehen aus den β-Zellen der endokrinen Zellinseln [Öberg K. et al, Best Pract Res Clin Gastroenterol 2008], haben eine Größe von ca. 1-2 cm und meist einen benignen Verlauf [MANUAL Endokrine Tumore, 2013 3. Aufl. Zuckerschwerdt]. Sie treten meist sporadisch auf und in nur 4-7% der Fälle im Rahmen einer familiären multiplen endokrinen Neoplasie 1 (MEN1) [Massironi S. et al, World j Gastroenterol 2008]. Insulinome führen zur Hypoglykämie neigung - bei klinischem Verdacht auf ein Insulinom erfolgt zur Diagnosesicherung ein 72h-Hungerversuch. Mit Hilfe des Hungerversuches erkennt man die Dissoziation zwischen hypoglykämischen Blutzuckerwerten und inadäquat erhöhten Konzentrationen von Insulin-, Proinsulin- und C-Peptid im Sinne der autonomen Hormonproduktion durch das Insulinom [The Endocrine Society's Clinical Guidelines: „Evaluation and Management of Adult Hypoglycemic Disorders“, www.endo-society.org 2009; Auernhammer CJ et al, Internist (Berl). 2018].

In Tabelle 3 befinden sich weitere funktionell-aktive NET des Pankreas / Duodenum mit ihren klinischen Symptomen.

Tumor	Hauptlokalisierung	Ausgeschüttete Botenstoffe / Hormone	Klinik	Metastasen (%)
Insulinom	Pankreas	Insulin	Nüchternhypoglykämie; Whipple-Trias	5-10
Gastrinom	Pankreas; Duodenum	Gastrin	Zollinger-Ellison-Syndrom; <i>Hyperazidität</i> ; <i>Ulcer im oberen GI-Trakt</i> ; teilweise auch chronische Diarrhoe	60-90
Glukagonom	Pankreas	Glukagon	<i>Diabetes mellitus</i> ; Kachexie; <i>Erythema necrolyticum migrans</i>	5-17
Somatostatinom	Pankreas; Duodenum	Somatostatin	Gallensteine; Diabetes mellitus	5-10
Vipom	Pankreas	Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)	<i>Werner-Morrison-Syndrom</i> ; Hypokaliämie; massive Durchfälle	10

Tabelle 3 - Funktional-aktive NET des Pankreas und Duodenums nach [Kaltsas G. et al, Endocrine Reviews 2004]

Als „Karzinoide“ wurden früher (und teilweise noch heute in der angelsächsischen / amerikanischen Fachliteratur) NET mit extrapancreatischen Ursprungs bezeichnet, die sich aus entarteten (EC)-Zellen entwickeln. Die Primärtumore befinden sich hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge. Diese Gruppe von Tumoren synthetisiert zahlreichen Mediatoren wie Serotonin, Kinine, Kallikrein und Prostaglandine, sind aber zum Großteil funktionell-inaktiv [MANUAL Endokrine Tumoren 3.Aufl. Zuckschwerdt 2013]. Bei funktionell-aktiven Tumoren tritt das Karzinoide-Syndrom, als Folge der Sekretion von Serotonin, fast immer erst nach Lebermetastasierung auf. Grund hierfür ist die hepatische Clearance der Sekretionsprodukte und der damit verbunden Umgehung des First-Pass-Effekts durch die Lebermetastasen [Pape UF Et al, Neuroendocrin. 2012]. Leitsymptome sind Flush (60-85% im Gesicht und Oberkörper), Diarrhö (60-80%) und seltener Bronchospastik (< 10%). Durch Manipulation am Tumor (peri- und intraoperativ) oder schweren körperlichen Belastungen kann es zur sogenannten „Karzinoide-Krise“ kommen die einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen kann. Dies äußert sich mit intensiven Dauerflushs, Abdominalkrämpfen, Diarrhöen mit Exsikkose, tachykarden Herzrhythmusstörungen, Bronchialobstruktionen und Hypo- sowie Hypertensionen [MANUAL Endokrine Tumore, 2013; 3. Aufl. Zuckerschwerdt]. In etwa 20-30 % aller Fälle kommt es bei den Patienten mit Karzinoide-Syndrom zur Herzbeteiligung in Form einer Endokardfibrose, die vor allem das rechtsseitige Herz betrifft und zu einer Trikuspidal- und Pulmonalklappeninsuffizienz führen kann. Diese Entwicklung bestimmt nicht selten die Prognose der Erkrankung bei den betroffenen Patienten [Pape UF Et al, Neuroendocrinology. 2012; Bhattacharyya S. et al, Circulation 2012; Jin XF. & Auernhammer CJ. et al, Rev Endocr Metab Disord. 2018]

1.4 Diagnostik

Um einen vorliegenden klinischen Verdacht auf einen NET des GEP-Systems zu bestätigen, stehen Diagnostikalgorithmien zur Verfügung. In Form von Guidelines, wurden unter anderem von der „European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS)“ und der „North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS)“ jeweils Empfehlungen für Diagnostik und Therapie vorgeschlagen [ENETS-Guidelines: www.neuroendocrine.net; NANETS-Guidelines. <http://nanets.net>].

Drei Hauptsäulen der Diagnostik sollen nachfolgend kurz dargestellt werden:

i) Histologie in der Diagnose von NEN:

Das zur Histologie benötigte Material wird durch eine Biopsie bzw. durch operative Entfernung des Primärtumors oder dessen Metastasen bereitgestellt [Köppel G. et al, Virchows Arch 2007].

ii) Tumormarker im Serum und Urin

Eine der generell empfohlenen Untersuchungen bei histologisch gesichertem Vorliegen eines NET, ist die Bestimmung des Tumormarkers Chromogranin A (CgA) im Serum. Der CgA-Serumspiegel ist stark abhängig von der Anzahl der neurosekretorischen Granula in der Zelle und dem Zelltyp. Aufgrund dessen weist Chromogranin A als Tumormarker nur eine eingeschränkte Sensitivität auf [Modlin IM et al, Neuroendocrinology 2010]. Chromogranin A im Serum eignet sich besonders gut als Verlaufsparmeter, da gezeigt werden konnte, dass die Höhe des CgA-Siegels gut mit der Tumormasse korreliert und auch ein prädiktiver Marker für eine Tumorphoresion ist [Arnold R. et al, Clin Gastroenterol Hepatol 2008].

Der spezifische Tumormarker für funktionell-aktive NET des Mitteldarms, die mit einem Karzinoid-Syndrom in der Klinik einhergehen, ist die 5-Hydroxy-Indoleessigsäure (5-HIES). Der Serotoninmetabolit kann in angesäuerten 24h-Sammelurin mit einer Sensitivität von bis zu 100% und einer Spezifität von etwa 85-90% [Pape UF et al, Neuroendocrinology 2012] bestimmt werden. Jedoch kann die Bestimmung der 5-HIES durch einige Nahrungsmittel und Medikamente falsch positiv bzw. falsch negativ beeinflusst werden. Die beeinflussenden Substanzen sollten entsprechend drei Tage vor der Urinsammlung vermieden oder abgesetzt werden [ENETS-Guidelines – Biochemical Markers, Neuroendocrinology 2009; MANUAL Endokrine Tumore, 2013 3. Aufl. Zuckerschwerdt].

Weitere wichtige spezifische Marker und Funktionsteste bei Verdacht auf einen funktionell aktiven NET (Pankreas) in der Klinik sind, Hungerversuch mit Bestimmung von Insulin, C-Peptid und Proinsulin, Sekretinstimulationstest und Bestimmung von Gastrin im Serum, sowie die Bestimmung von Glukagon oder Vasoaktive Intestinalen Peptid [Auernhammer CJ et al, Internist (Berl). 2018; Jin XF & Auernhammer CJ et al, Rev Endocr Metab Disord. 2018]

iii) Spezialisierte Bildgebung

Neben der histologischen Beurteilung ist die genaue Lokalisation des Primärtumors und der evtl. vorliegenden Metastasierung besonders wichtig, um eine optimale Therapie, eine Einschätzung der Prognose sowie das Monitoring des Verlaufs und den Erfolg oder Misserfolg der Therapie zu beobachten. Hierzu ist seit 20 Jahren die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS) als Standarddiagnostik etabliert. Klinisch wird das mit ¹¹¹Indium markierte synthetische SMS-Analogon ¹¹¹In-DTPA-Octreotid (OctreoScan®) verwendet, um die exprimierten Somatostatin-Rezeptoren und damit die Verteilung von NET-Tumoren im Körper zu detektieren.

Eine Neuerung und signifikante Verbesserung in der Diagnostik stellt die Positronenemissionstomographie mit ⁶⁸Gallium-markierten Peptiden dar. Die hauptsächlich zum Einsatz kommenden Somatostatin-Analoga ⁶⁸Ga-DOTATOC (⁶⁸Gallium-DOTA⁰-Tyr³-Ocreotid) und ⁶⁸Ga-DOTATATE (⁶⁸Gallium-DOTA⁰-Tyr³-Ocreotate) konnten ihre Überlegenheit gegenüber der SRS in neueren Studien beweisen [Buchmann I. et al, Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007]. Um sowohl an die funktionellen als auch an die anatomischen Informationen der NET-Erkrankung in einem Untersuchungsschritt zu gelangen, wird aktuell die nuklearmedizinische PET und die radiologischen Verfahren (CT/MRT) kombiniert. [Sundin A et al, Neuroendocrinology. 2017; Buchmann I. et al, Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007]. In verschiedenen Studien konnte der hohe Wert des SSR-PET/CT Verfahrens gezeigt werden – es resultiert hieraus in etwa 40 % der Fälle eine Änderung des therapeutischen Vorgehens. Hilfreich ist die SSR-PET / CT auch bei der Überprüfung eines klinischen Verdachts auf einen NET. So konnte bei dieser Fragestellung bei 104 untersuchten Verdachtsfällen, mit einer Sensitivität von 81% ein NET nachgewiesen und mit 90%iger Spezifität einen NET ausgeschlossen werden [HAUG AR. et al, J Nucl Med 2012].

Da neuroendokrine Tumore und ihre Metastasen zu den stark vaskularisierten Tumoren zählen, ist eine intravenöse Kontrastmittelgabe für die Detektion, bei einer CT- und der MRT-Bildgebung, unabdingbar. So können die Tumore besonders gut in der frühen arteriellen Phase detektiert werden [MANUAL Endokrine Tumore, 2013 3. Aufl. Zuckerschwerdt].

1.5 Therapie

Therapie der Wahl und bisher einzige Möglichkeit der Kuration bei vorliegendem NET, ist die vollständige Resektion des Tumors [Auernhammer CJ. et al, Gut 2011, Auernhammer CJ et al, Lancet Diabetes Endocrinol. 2017]. Allerdings ist dieses Verfahren – welches bei einer vollständigen Resektion zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von 80-100% [Öberg K. et al, Ann Oncol 2008] führt - meist nur bei lokoregional begrenzten Tumoren möglich.

Das Tumorstadium hat einen erheblichen Einfluss auf die Prognose und die Überlebensrate der Patienten [Dasari A et al. JAMA Oncol. 2017]. Da bei Diagnosestellung viele (44-73%) NET des GEP-Systems bereits metastasiert sind und dies einen wichtigen Prognosefaktor darstellt, ist dies bei der Therapie zu berücksichtigen [Pape UF. et al, Endocr Relat Cancer 2008].

Es wird bei gut-differenzierten NET bei Vorhandensein von Lebermetastasen auch eine Debulking-Operation empfohlen, wenn mehr als 70 – 90 % der hepatischen Tumorlast reseziert werden können [Partelli S et al, ENETS Consensus Guidelines for Standard of Care in Neuroendocrine Tumours, Neuroendocrinology. 2017; Howe JR et al, Pancreas. 2017]

Für die Therapie von inoperablen Lebermetastasen von NET kommen verschiedene lokal-ablative und lokoregionäre Therapieansätze wie die Radiofrequenzablation (RFA), die Mikrowellenablation (MWA), die transarterielle Embolisation (TAE) oder die transarterielle Chemoembolisation (TACE) sowie eine Radioembolisation mittels selektiver intraarterieller Radiotherapie (SIRT) in Frage [Auernhammer CJ et al, Lancet Diabetes Endocrinol. 2017].

Als systemische Therapieansätze bei metastasierten NET kommen die Biotherapie mit Somatostatinanaloga, die Peptid Rezeptor basierte Radionuklid Therapie (PRRT), die Chemotherapie und molekular zielgerichtete Therapieansätze jeweils in Frage [Auernhammer CJ et al, Lancet Diabetes Endocrinol. 2017].

Die Wirkung der Biotherapie mit Somatostatinanaloga bei NET wird hauptsächlich über die Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 vermittelt die als Zielstruktur bei 80-95 % aller NET auf der Zelloberfläche nachweisbar sind [Reudi JC. et al, J Steroid Biochem Mol Biol. 1992; MANUAL Endokrine Tumore, 2013 3. Aufl. Zuckerschwerdt]. Für die Biotherapie bei NET kommen die Somatostatinanaloga Octreotid und Lanreotid zum Einsatz. Unter der Biotherapie mit Somatostatinanaloga kommt es bei funktionell aktiven NET mit Karzinoïdsyndrom in 70 - 75 % zu einer Symptomkontrolle, als auch in 50 % zu einem Rückgang von CgA und 5-HIES im Sinne einer biochemischen Antwort [Modlin IM. et al, Aliment Pharmacol Ther 2010]. In älteren retrospektiven Studien konnte mit Hilfe der Somatostatinanaloga auch eine Tumorstabilisierung in 30-50 % beobachtet werden [Plöckinger U. et al, Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol 2007; Strosberg JR. et al, Cancer 2010]. Die antiproliferativen Effekte von Octreotid LAR konnte in der placebokontrollierten Phase-IIIb-PROMID Studie belegt werden. Es wurde eine signifikante Verlängerung der mittleren Zeit bis zur Tumorprogression von 14,3 versus 6 Monaten gezeigt [Rinke A. et al, J Clin Oncol. 2009]. In der CLARINET-Studie (placebokontrolliert; doppelblind-Phase III-Studie), konnte für NET G1 und G2 bis Ki-67 10 % mit teils gastrointestinales / teils pankreatischen Primarius, jeweils ein signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens gezeigt werden. Bei den Patienten die mit Lanreotid (n=101) behandelt wurden, wurde das mediane PFS nach 2 Jahren nicht erreicht. Im Placebo-Arm (n=103) wurde das PFS in 18 Monaten erreicht (Hazard Ratio 0,47, 95 % CI 0,30-0,73; p=0,0002). [Caplin ME. et al, N Engl J Med. 2014].

Aufgrund dieser Datenlage empfehlen die aktuellen Leitlinien die Somatostatinanaloga sowohl bei funktionell aktiven als auch bei funktionell nicht aktiven NET zur Tumorkontrolle [Pavel M et al, ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site Neuroendocrinology 2016; Pavel M et al ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms Neuroendocrinology 2017].

Für metastasierte und inoperable NET steht als weitere antitumorale Therapie auch die sogenannte Peptide Receptor basierte Radionuklid Therapie (PRRT) zur Verfügung [Kwekkeboom DJ. et al, Neuroendocrinology 2009; Hicks RJ et al, ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasia Neuroendocrinology 2017]. Grundlage der PRRT ist – wie bei der Biotherapie mit Somatostatinanaloga - die Expression der SSTR auf der Zelloberfläche der NET. Ein Nachweis der Expression der SSTR muss im Vorfeld mittels Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie oder spezifischem PET erfolgen. Das Kriterium für

die mögliche Anwendung einer PRRT, ist eine höhere Speicherkapazität des Tumors im Vergleich zur physiologischen Anreicherung im normalen Lebergewebe [Kwekkeboom DJ. et al, Neuroendocrinology 2009]. Ähnlich wie bei den nuklearmedizinisch- diagnostischen Untersuchungen (siehe Diagnostik), wird bei der PRRT ein Somatostatin-Analogon mit einem Radionuklid gekoppelt – im Fall der PRRT wird hierzu jedoch ein therapeutisch wirksamer β -Emitter verwandt. Klinisch eingesetzt wird heutzutage am häufigsten das Radionuklid ^{117}Lu (Lutetium) als ^{117}Lu -DOTATATE; einige Zentren haben in der Vergangenheit und teilweise bis dato auch ^{90}Y (Yttrium) in Form von ^{90}Y -DOTATOC angewandt. Kwekkeboom DJ et al, untersuchte bei einer Fallserie mit knapp 500 Patienten die Ergebnisse einer PRRT mit ^{117}Lu -DOTATATE. In 28 % der Fälle konnte eine partielle Remission und in 35 % eine Stabilisierung der Erkrankung, sowie in 2 % der Fälle sogar eine komplette Remission beobachtet werden [Kwekkeboom DJ. et al, J clin. Oncol. 2008]. Das Nebenwirkungsspektrum der PRRT umfasst häufiger milde und akute (innerhalb von 24 h nach Applikation) Nebenwirkungen und nur selten in ca. 1 – 2 % schwerwiegende Nebenwirkungen, welche häufig erst subakut oder deutlich protrahiert auftreten.

Die systemische Chemotherapie stellt bei nicht mehr operablen NET des Pankreas eine wichtige Behandlungssäule dar. Als Standardprotokoll wird bei hochdifferenzierten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas die Kombination von Streptozocin + 5-Fluoruracil verwendet. Diese Chemotherapie wird in den ENETS-Leitlinien als „First-Line-Therapie“ empfohlen [ENETS-Guidelines: www.neuroendocrine.net]. Das mittlere progressionsfreie Überleben (PFS) der Streptozocin-basierten Therapie liegt bei 15-18 Monaten und die „Response rate“ bei etwa 40% [Auernhammer CJ et al, Lancet Diabetes Endocrinol. 2017].

Eine alternative erfolgsversprechende Therapieoption für NET der Pankreas ist die Kombination aus Temozolomid (orales Prodrug von Dacarbazin) und Capecitabine – hierunter können objektive Response Raten (ORR) von über 50 % erreicht werden [Strosberg JR. et al, Cancer 2011; Cives M et al, Endocr Relat Cancer. 2016; Auernhammer CJ et al, Lancet Diabetes Endocrinol. 2017].

Die Behandlung von gering differenzierten kleinzelligen sowie großzelligen neuroendokrinen Karzinomen basiert – bei jedweder Primärlokalisation - auf der Erstlinienchemotherapie mit der Kombination von Etoposid mit Cisplatin [ENETS-Guidelines: www.neuroendocrine.net; NANETS-Guidelines: <http://nanets.net>]. Die Prognose dieser Tumorentität ist jedoch mit einer 2-Jahres-Überlebensrate von etwa 15 % insgesamt sehr schlecht [Auernhammer CJ et al, Lancet Diabetes Endocrinol. 2017].

In den letzten Jahren wurden zielgerichtete Therapiestrategien in der Behandlung von GEP-NET etabliert [Auernhammer CJ et al, Lancet Diabetes Endocrinol. 2017].

Diese Strategien verfolgen das Ziel, sich gegen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, sowie Rezeptor-tyrosinkinasen und intrazelluläre Signalkaskaden zu richten. Durch zielgerichtete Inhibierung wird versucht Einfluss auf das Tumorwachstum, die Tumorangiogenese bzw. Apoptose zu nehmen. Die Wirkung dieser zielgerichteten Therapien liegt in der Hemmung von überaktiven und überexprimierten Signalkaskaden, welche sehr häufig in entarteten Zellen vorzufinden sind. So sind zum Beispiel für inoperable bzw. metastasierende progrediente NET G1 / G2 des Pankreas jeweils der mTOR-Inhibitor Everolimus und der Multityrosinkinase-Inhibitor Sunitinib als Monotherapie zugelassen. Bei dem Rapamycin-Analogon Everolimus handelt es sich um einen mTORC-1-Inhibitor, der sich gegen den überaktivierten PI(3)K-AKT-mTOR-Signalweg richtet. In der Zulassungsstudie (Phase-III-Studie) von Everolimus konnte bei 410 Patienten, mit NET des Pankreas, eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (11,0 versus 4,6 Monate) gezeigt werden [Yao JC. et al, N Engl J Med 2011]. Der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib richtet sich unter anderem gegen VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR und c-kit. Die prospektive randomisierte klinische Phase-III-Zulassungsstudie von Sunitinib bei NET des Pankreas wurde aufgrund der deutlichen Überlegenheit gegenüber der Placebo-Gruppe in Bezug auf verbessertes progressionsfreies Überleben (11,4 versus 5,5 Monaten) und verlängertem Gesamtüberleben (Hazard-Ratio von 0,41) frühzeitig abgebrochen und in die Therapieplan aufgenommen [Raymond E. et al, N Engl J Med 2010].

Everolimus zeigte außerdem in einer weiteren Phase 3 Studien auch ein verbessertes progressionsfreies Überleben bei NET des Gastrointestinaltrakts und der Lunge [Yao JC et al Lancet. 2016] und ist somit auch für die Therapie von NET des Gastrointestinaltrakts und der Lunge zugelassen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine vollständige Remission von GEP-NET-Erkrankung nur dann gelingt, wenn der NET lokalisiert vorliegt und operativ entfernt werden kann. In allen anderen Fällen stehen

in der palliativen Situation zwar schon einige verschiedene Methoden zur Verfügung um zumindest die klinischen Symptome einer GEP-NET-Erkrankung zu reduzieren und eine Tumorstabilisierung zu erreichen. Jedoch werden weitere neue Therapieoptionen benötigt und eine Weiterentwicklung der translationalen Forschung ist deshalb im Bereich der GEP-NET wünschenswert und notwendig.

1.6 Neue Therapieoptionen

1.6.1 Der Hepatocyte Growth Factor - (HGF) c-Met-Signalweg als „target“ in humanen neuroendokrinen Tumorzellen in vitro

Das Wachstum und die Entstehung transformierter Zellen sind abhängig von der Aktivierung sogenannter „survival pathways“. So können entartete Zellen, durch die konstitutive Aktivierung dieser „survival pathways“, häufig pro-apoptotischen, zellzyklus-inhibierenden und wachstums-hemmenden Signalen entgehen. Diese Erkenntnis wurde für den ersten Teil dieser Arbeit aufgegriffen und es wurde versucht, durch gezielte Inhibition spezifischer Signalwege, einen Einfluss auf das Wachstum und die Zellteilung zu nehmen.

Aus der Subfamilie der Rezeptortyrosinkinasen unterscheidet sich die c-Met Kinase strukturell von den anderen. Die etablierte Form des c-Met-Rezeptors ist ein über zwei Disulfid-Brücken verankertes Heterodimer, bestehend aus einer extrazellulären α -Einheit und der transmembranen β -Einheit (Abbildung 1). An der intrazellulären Seite der β -Einheit liegt die TK-Domäne, die essentiell für den Downstream Signalweg der c-Met ist [Blumenschein GR Jr et al, J Clin Onco 2012]. Der natürliche Ligand der c-Met ist der Hepatocyte Growth Factor (HGF) [Organ SL et al, Ther Adv Med Oncol 2011].

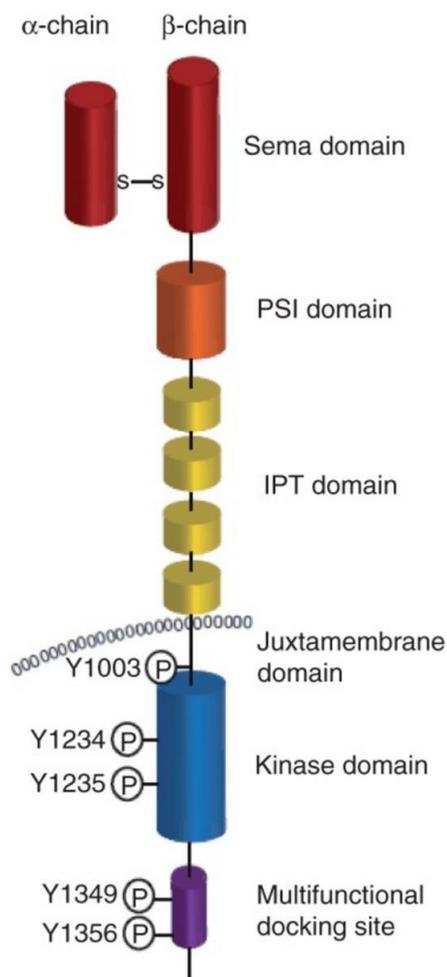


Abbildung 1 - Struktur der c-MET-Rezeptortyrosinkinase nach Organ SL, et al, Ther Adv Med Oncol 2011.

Nachdem HGF an seiner Bindungsstelle am c-Met-Rezeptor gebunden hat, führt dies zur Dimerisation der Rezeptoren. Durch die daraus resultierende Lageveränderung des Rezeptors, kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosinreste (Tyr 1349 und Tyr 1356) in der C-terminalen Region und dadurch zur katalytischen Aktivität von c-Met. So werden, unter physiologischen Bedingungen, viele natürliche Prozesse wie Wundheilung, Proliferation, Zellüberleben, Migration und Invasion der Zellen reguliert [Blumenschein GR. Jr. et al, J Clin Onco 2012]. Neben der RTK c-Met sind weitere durch Wachstumsfaktoren aktivierte wichtige RTKs zum Beispiel die Epidermal-Growth-Factor-Receptor Familie (EGF-R), die Vascular-Endothelial-Growth-Receptor Familie (VEGF-R) und die Platelet-derived-Growth-Factor-Receptor Familie (PDGF-R) (Abbildung 2) [Zitzmann K et al, Expert Rev. Endocrinol. Metab. 2008; Lai et al, 2009; Aristizabal Prada ET, Auernhammer CJ et al, Endocr Connect 2018]. Normalerweise sind diese Rezeptorfamilien streng reguliert, jedoch werden diese Signalwege durch eine konstitutive Aktivierung zu sogenannten „survival pathways“, in onkologisch transformierten Tumorzellen.

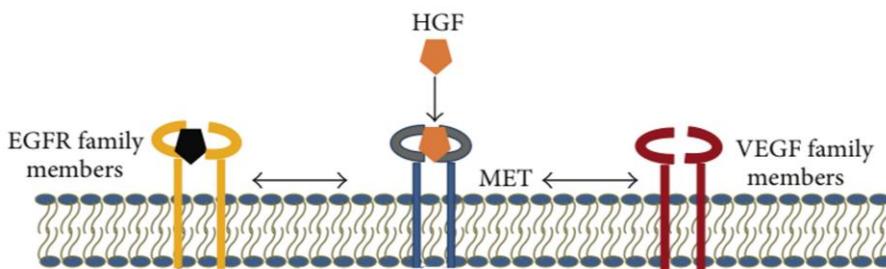


Abbildung 2 - Weitere RTK die in räumlichen Nähe zu der c-Met-Kinase stehen. Adaptiert aus: Neeta K. Venepalli and Laura Goff et al, International Journal of Hepatology 2013.

Wichtige Signalwege, die durch die HGF- c-Met-Achse stimuliert werden, sind der PI(3)K-AKT-mTOR-, der RAS-RAF-MEK-ERK- und der JAK-STAT-Signalweg. Kommt es zu Störungen in diesen komplexen Signalkaskaden kann einerseits Tumorentstehung gefördert werden und andererseits eine Resistenzentwicklung gegenüber natürlichen Tumorsuppressoren auftreten. Erfolgt die Aktivierung der c-Met über HGF, katalysiert PI(3)K die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3, 4, 5,-Triphosphat (PIP3). Dies hat zur Folge, dass die *Serin/ Threonin-Kinase AKT (Proteinkinase B)* aktiviert wird. In NET ist eine wichtige Zielstruktur von AKT, der „*mammalian target of rapamycin*“ *mTOR-Komplex1 (mTORC1)*. Dieser Komplex beeinflusst die Apoptose, die Proliferation und das Zellwachstum über eine Modulation des Zellzyklus. Über den Translationsinitiationsfaktor 4E-bindendes Protein (4EBP1) und die p70 ribosomalen Protein S6 Kinase (p70S6K) vermittelt mTOR den Übergang von der G1- in die S-Phase. Dies geschieht mittels zyklus-fördernder Proteine wie c-Myc und Cyclin D1 und gleichzeitiger Inhibierung von zellzyklus-hemmender Proteine wie p27 und p21 (Abbildung 3).

Im RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg kommt es nach der Phosphorylierung der RTK zu einer Aktivierung von RAS. Dies führt wiederum zur einer Phosphorylierungskaskade, beginnend mit der Aktivierung der Serin-/Threonin-Kinase RAF. RAF führt anschließend zur Aktivierung von MEK, worauf am Ende des Signalweges zur Stimulation von MAPK kommt, welches in den Zellkern wandert und Einfluss auf die Transkription von Genen nimmt (Abbildung 3).

Die Genexpression über STAT3 wird über die direkte Bindung von STAT3 an c-Met reguliert. Es kommt zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3 mit anschließender Translokation im Zellkern (Abbildung 3), was Auswirkung auf die Proliferation und Invasion von Zellen hat [Syed et al. BMC Cancer 2011].

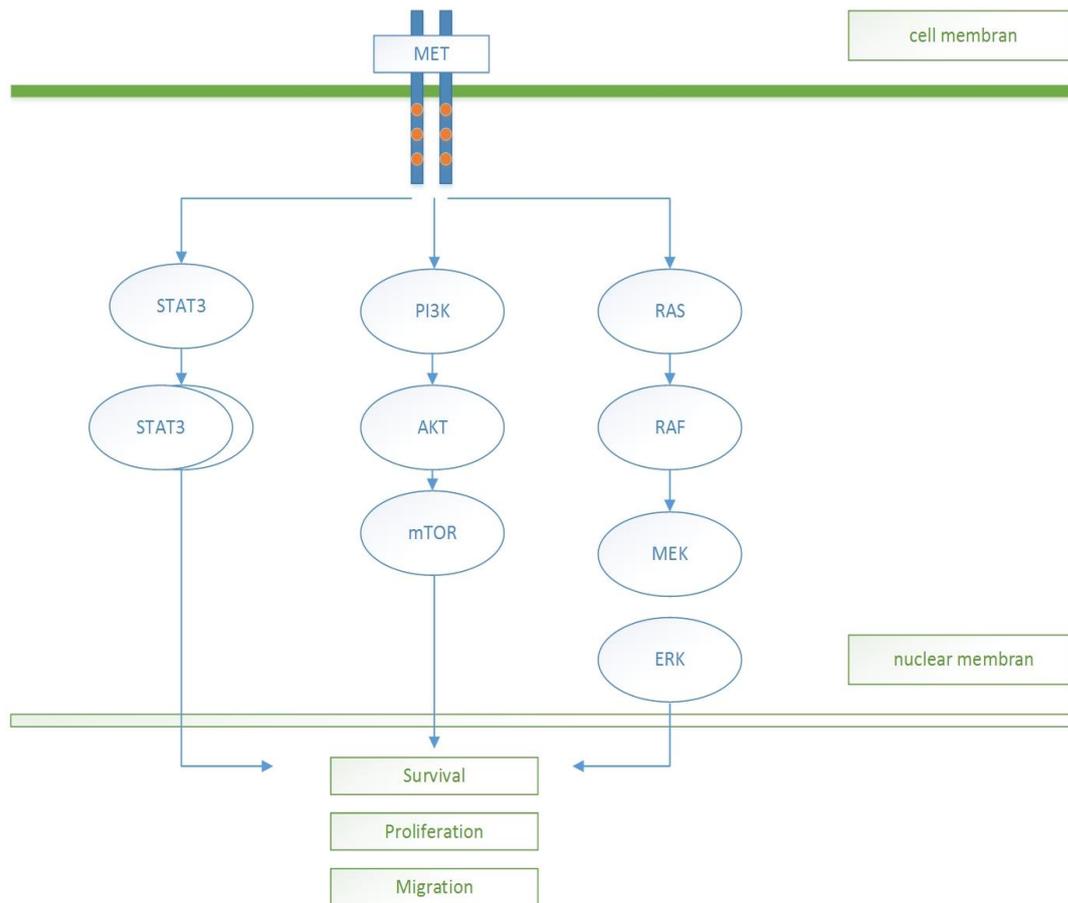


Abbildung 3 - Schematische Darstellung der c-Met-Tyrosinkinase Signalkaskade. Adaptiert aus folgenden Literaturstellen: Rene Meyer et al, *Front. Physiol*, 28 November 2012; Yilong Zhang et al, *Biomedicines* 2015; Neeta K. Venepalli and Laura Goff et al,

Daher scheint der HGF-c-Met-Signalweg ein optimaler Ansatzpunkt für antiproliferative Strategien zu sein [Blumenschein GR jr. Et al, J Clin Oncol. 2012]. Auf molekularer Ebene werden schon verschiedene zielgerichtete Strategien wie das Neutralisieren des natürlichen Liganden HGF durch Rilotumumab oder Inhibition der Bindung des Liganden an den Rezeptor mit monoklonalen Antikörpern, wie z.B. Onartuzumab, verfolgt. Auf der nächsten Ebene erfolgt die Blockade mit Hilfe von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren (Cabozantinib und Tivantinib) [Blumenschein GR jr. et al, J Clin Oncol. 2012]. Als letzte Möglichkeit, können sogenannte „Downstream-Pathway Inhibitors“ eingesetzt werden. Sie ermöglichen eine zielgerichtete Blockade intrazellulärer Signalweiterleitungen. Dies erfolgt unter anderem durch den Einsatz des mTOR-Inhibitors Everolimus [Fazio N. et al, *Cancer Treat Rev.* 2010].

Es wurden eine Reihe von sogenannten „ATP-competitive“ Met-Inhibitoren und „non-ATP-competitive“ Met-Inhibitoren entwickelt (Tabelle 4) und teilweise in klinischen Studien getestet [Blumenschein GR jr. et al, *J Clin Oncol.* 2012; Parikh RA. Et al, *Onco Targets Ther* 2014].

Für die Therapie des medullären Schilddrüsenkarzinoms wurde von der FDA und der EMEA der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Cabozantinib (XL-184) zugelassen [Elisei R. et al, *J Clin Oncol.* 2013]. Aktuell befindet er sich in mehreren Phase-3-Studien zur Behandlung des Leberzellkarzinoms (NCT01908426), Prostatakarzinoms (NCT01522443) und Nierenzellkarzinoms (NCT01865747). Außerdem befindet er sich zusätzlich in einer Phase-2-Studie bei NETs (NCT01466036).

Ein „non-ATP-competitive“ c-Met Kinaseinhibitor ist Tivantinib (ARQ-197) [Blumenschein GR jr. et al, *J Clin Oncol.* 2012]. Die antitumorale Eigenschaften von Tivantinib werden unabhängig von der c-Met Inhibition als „off-target“ Effekte beschrieben [Calles A. et al, *Mol Oncol* 2015; Zhou Y. et al, *Mol Cancer Ther.* 2014; Katayama R. et al, *Cancer Res.* 2013; Basilio C. et al, *Clin Cancer Res.* 2013]. Aktuell befindet sich Tivantinib in zwei Phase-3-Studien zur Behandlung von Leberzellkarzinomen (NCT02029157) und NSCLC

(NCT01377376). Desweiteren liegen positive Resultate von Phase-2-Studien vor [Santoro A. et al, Lancet Oncol 2013; Sequist LV. et al, J Clin Oncol 2011].

Verschiedene Phase-1- und Phase-2-Studien laufen aktuell zu INC280, einem *selektiven „ATP-competitive“- c-Met-Inhibitor*, in verschiedenen Tumorentitäten [Blumenschein GR jr. et al, J Clin Oncol. 2012].

Präklinisch wurden verschiedene Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren in pankreatischen neuroendokrinen Tumormodellen (Rip-Tag2 mouse model) intensiv untersucht. In diesem Mausmodell wurden unter anderem die beiden RTK-Inhibitoren Foretinib (XL880) und Cabozantinib (XL184) eingesetzt. *Es konnte eine überlegene Hemmung der Angiogenese sowie eine reduzierte Invasion und Metastasierung, aufgrund der gleichzeitigen Hemmung von VEGFR und c-Met im Gegensatz zur alleinigen Hemmung von VEGFR, gezeigt werden* [You WK. et al Cancer Res 2013]. Eine reine Inhibition des VEGF-Pathways mit Anti-VEGF Antikörpern oder durch Sunitinib im RIP-Tag2 Mausmodell führte zu einem reduzierten Tumorwachstum. Jedoch verursachte diese Blockade – am ehesten über einen „survival pathway“ - einen erheblichen Anstieg von Phospho-c-Met und einer Erhöhung der Lymphknotenmetastasierung. Im Gegensatz dazu wurde bei den eingesetzten c-Met-Inhibitoren PF-04217903, Crizotinib und Cabozantinib jeweils eine reduzierte Invasion und Metastaseneigung beschrieben [Sennino B. et al, Cancer Res 2013; Sennino B. et al, Cancer Discov 2012]. *Aufgrund dieser präklinischen Ergebnisse wurde in NET die RTK c-Met als vielversprechendes Target angesehen* [Sennino B. et al, Cancer Res 2013; Sennino B. et al, Cancer Discov 2012; You WK. et al, Cancer Res 2013].

Substanz	Zielstruktur	Firma
Cabozantinib (XL184) „ATP-competitive“	c-Met, VEGFR1-3, KIT, RET, FLT3, TIE2	Exelixis
Tivantinib (ARQ197) „non-ATP-competitive“	c-Met, Ron, ALK	Daiichi Sankyo
INC280 (INC28060, Capmatinib) „ATP-competitive“	c-Met	Novartis
Foretinib (GSK1363089, XL880) „ATP-competitive“	c-Met, RON, VEGFR1-3, PDGFR, KIT, FLT3, TIE2	Exelixis
PF-04217903 „ATP-competitive“	c-Met, ALK	Pfizer
Crizotinib (PF-02341066) „ATP-competitive“	c-Met, ALK	Pfizer
Sunitinib (SU11248) „ATP-competitive“	VEGFR, PDGFR, c-KIT, SCF, FLT, RET	Pfizer

Tabelle 4 - Tyrosinkinase-Inhibitoren und deren Zielstrukturen nach Blumenschein GR Jr. et al J Clin Oncol 2012.

Diese vielversprechenden präklinischen Daten, lassen jedoch keinen eindeutigen Rückschluss darauf ziehen, dass die c-Met Inhibition mit dem Multi-TK Inhibitor Cabozantinib einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Migration von neuroendokrinen Tumoren hat. Bei Tivantinib zeigte sich in anderen Tumorentitäten, dass der antitumorale Effekt nicht mit der reinen c-Met Inhibition zu erklären ist, sondern eher über sogenannte „off target“ Effekte beschrieben werden kann. [Calles A. et al, Mol Oncol 2015; Zhou Y. et al, Mol Cancer Ther. 2014; Katayama R. et al, Cancer Res.2013; Basilico C. et al, Clin Cancer Res. 2013].

Aufgrund dieser Ergebnisse, *wurde im ersten Teil der nun hier vorgelegten Arbeit, der hoch spezifische c-Met Inhibitor INC280 und die beiden Multi-Tyrosinkinase Inhibitoren Cabozantinib und Tivantinib, in äquimolaren Konzentrationen in verschiedenen humanen neuroendokrinen Tumorzellen verglichen.* Der Einfluss auf den c-MET Phosphorylierungsstatus, des Zellüberlebens, den Zellzyklus und die Migration wurde bei den drei verwendeten Substanzen verglichen. Zusätzlich wurden weitere Experimente durchgeführt, um die c-Met Expression mittels siRNA in NET spezifisch auszuschalten.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass c-Met nicht essentiell für das Zellwachstum und die Migration in den untersuchten neuroendokrinen Tumorzellen in vitro ist. Die beobachteten inhibierenden Effekte von Cabozantinib und Tivantinib auf die Proliferation und Migration der untersuchten humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien in vitro scheinen - neben dem Einfluss auf c-Met - durch „off-target“ Effekte vermittelt.

1.6.2 Wiederherstellung der wildtyp-p53 Funktion in GEP-NET-Zellen durch MDM2 -Inhibition

In vielen Tumorentitäten sind die „survival pathways“ konstitutiv aktiviert, dadurch sinkt die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber natürlichen pro-apoptotischen Signalen. Aufgrund dessen, beschäftigte sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der vielversprechenden *Strategie der Reaktivierung des natürlichen Tumorsuppressor p53 in NET-Zellen*, da dies eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und dem programmierten Zelltod, der sogenannten Apoptose, spielt.

Kommt es zu einer Schädigung in der DNA, akkumuliert p53 in den Zellen. Dadurch können DNA-Reparatur-Mechanismen und eventuell der Zellzyklus-Stopp ablaufen. p53 kann als Transkriptionsfaktor direkten Einfluss auf die Produktion von p21 nehmen (siehe Abbildung 4). Über das Protein p21 werden wiederum die CDK (Cycline Dependent Kinases) und ihre dazugehörigen Cycline D und E inhibiert. Diese Komplexe setzen einen weiteren Transkriptionsfaktor (E2F) frei, der unter physiologischen Bedingungen an das Protein pRB gebunden ist, um den Zellzyklus weiter zu führen. Durch diesen Mechanismus bekommt die Zelle durch p53 Zeit, sich selbst zu reparieren [Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Axel-Springer 2014, Auflage 9; Harris SL. et al, Oncogene 2005].

Ist es der Zelle nicht mehr möglich sich selbst zu reparieren, wird die Apoptose des Typs II (Intrinsischer Weg) induziert. So wird die Expression von pro-apoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-Familie (z.B. BAX) durch p53 stimuliert. Somit wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Anschließend bindet Cytochrom C an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und bewirkt so eine Konformationsänderung des Proteins (Abbildung 4). Durch die räumliche Änderung wird die Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) von Apaf-1 frei und kann Procaspase binden. Dies ist die Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspasen [Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Springer 2014, Auflage 9].

Aufgrund dieser Eigenschaften ist man in der Chemotherapie mit zytotoxischen Substanzen auf ein funktionsfähiges p53 angewiesen. Jedoch konnte *in vielen Tumoren ein funktionsloses p53* beobachtet werden. *Dies wurde entweder durch eine inaktivierende Mutation im TP53 Gen oder durch Reduzierung der Expression von Wildtyp-p53 Protein erreicht [Brown CJ. et al, Trends Pharmacol Sci 2011].* Die Reduzierung des Wildtyps p53 wird durch negative Regulatoren, wie die E3 Ubiquitin-Ligase murine double minute 2 (MDM2) oder MDM4 (MDMX) vermittelt. Bindet MDM2 an p53 wird es für die Ubiquitierung sichtbar gemacht, und wird als MDM2-p53-Proteinkomplex im Protosomen abgebaut [Micel LN. et al, J Clin Oncol 2013]. So verliert p53 seine natürliche Aktivität.

Die Überexpression von negativen p53 Regulatoren wie MDM2 oder MDM4 wurde in vielen Tumorarten gefunden [Brown CJ. et al, Trends Pharmacol Sci., 2011]. In neuroendokrinen Tumoren des Dünndarms und des Pankreas ist nur ein kleiner Prozentsatz (<5%) von somatisch mutierten TP53-Genen zu finden [Banck MS. et al, J Clin Invest 2013; Jiao J. et al, Science 2011]. Jedoch sind häufig negative p53-Regulatoren zu beobachten. So konnte Hu et al. zeigen, dass bei NET, mit Ursprung im Pankreas, ein copy number gain von MDM2, MDM4 und Wild-Typ p53-induzierte Phosphatase 1 (WIP1) in 22%, 30% und 51% zu finden war [HU W. et al, Genes Cancer 2010]. Hu et al, zeigte außerdem bei NET des Pankreas, dass häufig eine Expression der „down-regulatoren“ MDM2 in 61% (104/171), MDM4 in 57 % (98/171) und WIPI in 58% (99/171) auftrat [HU W. et al, Genes Cancer 2010]. Jedoch war keine positive Färbung von p53 (0/171) nachweisbar [HU W. et al, Genes Cancer 2010].

In immunhistochemischen Färbungen sind bei gut differenzierten NET positive p53 Expressionen kaum zu erwarten, wobei eine abnormale Erhöhung von p53 in Antikörperfärbungen, eher als Indikator für ein mutiertes TP53 Gen zu sehen ist [Hu W. et al, Genes Cancer 2010; Nenutil R. et al, J Pathol 2005; Bellini MF. et al, J Biomed Biotechnol 2012; Watanabe G. et al, Am J Surg Pathol 2015; Takizawa N. et al, Hum Pathol 2015]. So war ein unnormales Vorhandensein von p53 Levels in IHC-Färbungen bei gut differenzierten kolorektalen Carcinomen nur bei 0-17 % beschrieben, während im Gegensatz hierzu schlecht differenzierten Karzinomen – welche häufig TP53 Genmutationen aufweisen - eine positive Färbung für p53 in 88-100 % zeigen [Takizawa N. et al, Hum Pathol 2015; Kimilogu Sahan E. et al, Turk J Gastroenterol 2015; Klöppel G. et al, Visc Med 2017].

Die Überexpression von MDM2 in Tumorzellen, führt zu einem Verlust der Zellzyklusregulation, einer Inhibition der Apoptose, sowie einer Erhöhung der epithelialen-mesenchymalen Transition [LI Q & Lozano G. et al, Clin Cancer Res 2013].

Da die meistens NET das Wild-Typ TP53-Gen besitzen und TP53 Genmutationen bei NET (im Gegensatz zu NEC) selten vorkommen, [Klöppel G et al, Visc Med 2017] sollten die NET auf eine neuerliche Reaktivierung des Wild-Typ p53, durch eine Inhibition des MDM2-Proteins, sensitiv reagieren.

In der Arbeit von Saiki AY et al, konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition von MDM2 der p53 Spiegel in den Zellen deutlich ansteigt [Saiki AY. et al, Oncotarget 2015]. Durch diese MDM2 Inhibition wird verhindert, dass sich der MDM2-p53-Proteinkomplex bilden kann. Somit wird der p53 Abbau verhindert und die natürliche Funktion wiederhergestellt [LI Q. & Lozano G. et al, Clin Cancer Res 2013].

Obwohl aktuell nur vorläufige präklinische Daten zu den MDM2-Inhibitoren im Bereich der neuroendokrinen Tumore vorliegen [Briest & Grabowski 2015], gilt sie als eine vielversprechende neue zielgerichtete Strategie in der Tumortherapie [Brown CJ. et al, Trends Pharmacol Sci 2011; Li Q. & Lozano G. et al, Clin Cancer Res 2013; Zak et al. Expert Opin Ther Pat 2013].

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Effekte des MDM2-Inhibitors NVP-CGM097 (Novartis) an verschiedenen humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien untersucht. Es konnte zum ersten Mal ein antiproliferativer Effekt, durch die MDM2 Inhibition durch NVP-CGM097, auf p53^{wildtype}GOT1-Zellen (Material und Methoden) gezeigt werden. Ebenso wurden in diesem präklinischen Tumormodel additive Effekte mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001) beobachtet.

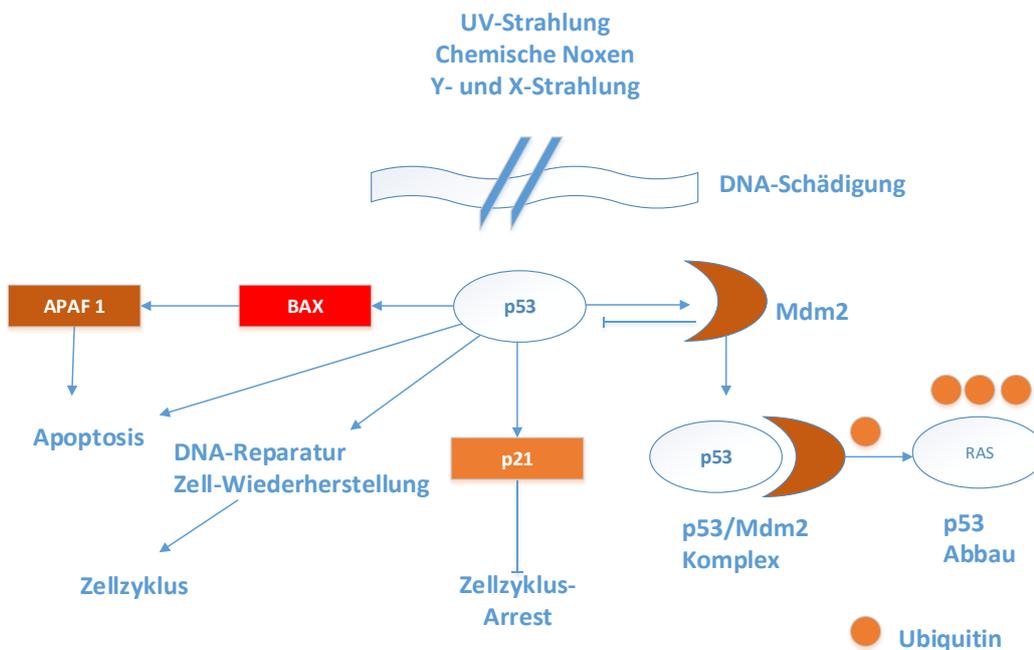


Abbildung 4 - Schematische Darstellung der p53 Aktivierung und dessen Auswirkungen. Zusätzlich ist der Abbau über E3-Ligase angezeigt. Adaptiert aus: Robini Keshava et al, Annals of Neurosciens 2008.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Borsäure	ICN Biomedicals, USA
Cell Titer 96 Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
1,4-Dithiothreit (DDT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DhamaFECT 2	Dharmacon/Perbio, Bonn, Deutschland
DhamaFECT 3	Dharmacon/Perbio, Bonn, Deutschland
DMEM/F12-Medium (1:1) [GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12]	GIBCO BRL/Life Technologies, MD, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNTP 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) [Titriplex III]	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70%	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
GeneRuler, 100bp, DNA-Ladder	Fermentas International Inc., Kanada
Gold Universal Agarose	Peglab Biotech GmbH, Erlangen, Deutschland
Hepes [2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) - ethansulfonsäure]	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
6x Loading dye solution	Fermentas International Inc., Kanada
Magnesiumsulfat	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Platium Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standard Dual Colors	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Q-Kit	Beckman-Coulter, Krefeld
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, IL, USA
RNase-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rotigel 30 (30% Acrylamid)	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese SDS-Page	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640-Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS (sodium dodecyl sulfate)	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sodium orthovanadate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Super Signal west Dura Luminol (Enhancer Solution)	Thermo Fischer Scientific, Ulm, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trizol Reagenz	GIBCO BRL/Life Technologies, MD, USA
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
QiAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Wizard® SV Genomic DNA Purification System	Promega, Madison, USA

Tabelle 5 - In den Versuchen eingesetzte Chemikalien

Geräte

Gerät	Hersteller
Agagel Mini Biometra	Biomed Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
BD Accuri C6	BD Biosciences (Becton-Dickinson), Heidelberg, Deutschland
Brutschrank CO ₂ -AutoZero	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Cellcounter (Countess™)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

CEQ™8000	Beckman-Coulter, Krefeld
ECL ChemoCam Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Elektronischer Peleusball	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrophoresekammer Proban II xi Cell	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
GeneAmp PCR-System 2400	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
Labornetzgerät TNG 30	Voltcraft, Deutschland
Medingen Wasserbad W-22	Funke Medingen, Deutschland
Mikroskop-CK2	Olympus, Japan
Mikroskop Axiovision	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
MultiDoc-it Geldokumentationsgerät	UVP inc., CA, USA
Netzgerät LKB-EPS 500/400	Pharmacia, Österreich
Oberflächen- und Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Orbital Shaker OS-20	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Photometer Sunrise	TECAN, Männerdorf, Schweiz
Power Pac 3000	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Semi-Dry-Western-Bloter	Peqlab Biotech GmbH, Erlangen, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Vortex	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wärmeblock	Grant Instruments, Cambridge, UK
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 6 - Für die Versuche benötigte Geräte

Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chromatography paper 1/3CHR	Whatman GmbH, Dassel Deutschland
Electric Koch- und Gefrierfolie	Petra, Deutschland
Einwegpipetten	Corning, New York, USA
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Glaspipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multiwell-96-Well	BD Biosciences (Becton-Dickinson), Heidelberg, Deutschland
Multiwell-12-Well	BD Biosciences (Becton-Dickinson), Heidelberg, Deutschland
Multiwell-6-Well	BD Biosciences (Becton-Dickinson), Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Petrischalen / 10 cm Platten	BD Biosciences (Becton-Dickinson), Heidelberg, Deutschland
PCR tubes	Biozym Biotech Trading GmbH, Österreich
Präzisionspipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transfermembran Immobilon P, PVDF hydrophob, Porengröße 0,45 µM	Millipore, MA, USA
Zellkulturflaschen 250/750 ml	BD Biosciences (Becton-Dickinson), Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen Nunclon Surface 250 ml	BD Biosciences (Becton-Dickinson), Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Sigma-Aldrich, MO, USA
Zentrifugenröhrchen	BD Biosciences (Becton-Dickinson), Heidelberg, Deutschland

Tabelle 7 - Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verwendete Puffer:

- SDS-Probenpuffer: 0,25M Tris HCL, 40% Glycerol, 2% Natriumdodezylsulfat, 1% Dithiothreitol, Bromophenolblau, pH 8,8
- LysisPuffer: M-PER® Mammalian Protein ExtraKation-Reagenz + HALT™ Protease & Phosphatase Inhibitorcocktail, Thermo Scientific, Rockford, USA
- Milchpulver-TBS-T-Puffer: 0,02M Tris HCL, 0,15M NaCL, 2% Blotting-Grade Blocker (Nonfat dry Milk), 0,01% Natriumacid
- Nicoletti-Puffer: 1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100 und 50µg/ml Propidiumjodid
- Waschpuffer: 0,02M Tris HCL, 0,15M NaCL

2.2 Methoden

Zellkulturmethoden

Allgemeines:

Es steht nur eine sehr limitierte Anzahl von humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien zur Verfügung [Hofving T. et al, Endocr Relat Cancer. 2018; Aristizabal Prada ET. & Auernhammer CJ. et al, Endocr Connect. 2018].

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden drei – in der Literatur gut charakterisierten - humanen Tumorzelllinien verwandt.

NET-Zelllinien:

Zelllinie	Primarius	Kulturmedium + Zusätze
BON1	<u>Pankreas</u> human pancreatic carcinoid tumor ([Evers BM et al. 1991, Babu V et al. 2013]), Mit freundlicher Überlassung von R. Göke (Marburg, Deutschland)	DMEM/F12(1:1) + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin + 0,4% AmphotericinB
NCI-H727	<u>Lunge</u> human typical carcinoid lung ([Schuller HM. et al, IARC Sci Publ. 1987; Cakir M. et al, Expert Opin Ther Targets. 2011]) Bezogen über (ATCC Manassas, VA, USA)	RPMI + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin + 0,4% AmphotericinB
GOT1	<u>Dünndarm</u> human midgut carcinoid tumor ([Kölby L. et al, American Journal of Pathology 2001]) Mit freundlicher Überlassung von O. Nilsson (Göteborg, Schweden)	RPMI + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin + 0,4% AmphotericinB + Insulin (0,135 IE/ml) + ApoTransferrin (5mg/ml)

Tabelle 8 - Verwendete NET-Zelllinien und dazugehörige Medien [Evers BM. et al, Gastroenterology 1991; Babu V. et al, Pancreas 2013; Kölby L. et al, Am J Patbol. 2001; Schuller HM. et al, IARC Sci Publ. 1987; Cakir M. et al, Expert Opin Ther Targets. 2011].

Die drei verwendeten Zelllinien waren frei von Mycoplasmen und wurden bei 37°C in 95 % wasserdampfgesättigter und 5 % CO₂ enthaltender Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten an den Zellkulturen und Versuchen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle 3 Zelllinien wurden in 75 cm² Falcon-Zellkulturflaschen kultiviert, um ein gleichmäßiges Wachstum zu gewährleisten.

Bestimmung der Zellzahl: Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines automatischen Cellcounter (Countess™, Invitrogen, Deutschland) bestimmt, wobei nicht mehr lebende Zellen durch die Markierung mit 0,4% Trypanblau (1/1 mit der Zellsuspension gemischt) von der Zählung ausgeschlossen wurden.

Zellviabilitäts-Assay

Für die Viabilitäts-Versuche wurden die Zelllinien auf 96-Well Platten ausgesät. Um für die Versuche auf allen Platten eine annähernde gleiche Zelldichte zu erreichen, wurden die verschiedenen Zelllinien abhängig von Ihrer Wachstumsgeschwindigkeit unterschiedlich ausgesät.

Erster Teilabschnitt der hier vorgelegten Arbeit (c-MET-Inhibitoren):

[BON1 – 3000 Zellen/ Well, NCI-H727 – 4000 Zellen/ -Well]. Die Zellen wurden für 24 h im Komplett-Medium (Serum/ Penicillin/ Streptomycin und AmphotericinB) herangezüchtet. Nach 24 Stunden wurde das Komplett-Medium durch ein Antibiotika freies Medium (10% FBS) ersetzt.

Die Zellen wurden im ersten Abschnitt der Arbeit mit unterschiedlichen Konzentrationen von INC 280 I Cabozantinib I Tivantinib (1-100-10000nM) für 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Die Zellproliferationsrate wurde anhand der metabolischen Aktivität mit Hilfe des Zell Titer 96 Aqueous One Solution Zell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) entsprechend der Gebrauchsanweisung bestimmt. Nach 3 Stunden Inkubation mit 20 µl Zell Titer, wurde die Extinktion bei 492 nm im Photometer Sunrise RC (Remote Control) gemessen.

Zweiter Teilabschnitt der hier vorgelegten Arbeit (MDM2 Inhibitor):

[BON1 – 1500 Zellen/-Well, NCI-H727 – 2000 Zellen/-Well, GOT1 – 50000 Zellen/ -Well]. Die Zellen wurden analog, wie im obig beschriebenen Vorgehen, herangezüchtet und nach 24 Stunden wurde das Medium ersetzt. Die Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von CGM-097 (0,1nM-2.500nM) inkubiert. Zusätzlich wurden noch Kombinationen von 5-Fluorouracil (1µM – 25µM), Temozolomid (50µM – 500µM) und Everolimus (10nM) mit jeweils 500nM CGM-097 durchgeführt.

Auch diese Versuche wurden nach 48, 96 und 144 Stunden mit dem Cell Titer 96 Aqueous One Solution inkubiert und die Proliferationsrate bei einer Extinktion von 492nm im Photometer gemessen.

siRNA-Transfektion

Um den Einfluss der c-MET-Tyrosinkinase auf die Proliferation zu untersuchen, wurden die NET-Zelllinien für die Transfektion sowohl auf 96-Well Platten als auch auf 6-Well-Platten ausgesät. Dazu wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien herangezogen, um eine nach 24 Stunden einheitliche Zelldichte zu erhalten. [96-Well: BON1 – 1500 Zellen/-Well, NCI-H727 – 2000 Zellen / 6-Well: BON1 0,4 Mio. Zellen/-Well, NCI-H727 0,5 Mio. Zellen/-Well]

In dieser Arbeit wurden die siRNA-Oligonucleotide (ON-TARGETplus SMARTpool, Human MET (4233), Cat.No. 003156-00-0005 und nontargeting siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting, Cat.No. D-001810-10-05) verwendet. Die Zellen wurden in einem Antibiotika/Antimykotika - und FBS-freiem Medium unter Zuhilfenahme von DharmaFECT 2 (BON1) und DharmaFECT 3 (NCI-H727) gemäß der Herstellerinstruktion transfiziert. Nach einer 24-stündigen Transfektion wurde das Medium durch FBS-reiches (10%) Medium ersetzt.

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des Cell Titer 96 Kit nach 72 stündiger Transfektion am Photometer bei 492nm bestimmt.

Die Auswertung auf Proteinebene wurde so durchgeführt, wie unter dem Abschnitt Proteinextraktion und Western-Blot-Analyse beschrieben.

FACS-Analyse

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Effekte auf den Zellzyklus analysiert. Dabei kam eine von Nicolletti I. et al. etablierte Versuchstechnik zum Einsatz [Nicolletti I. et al, J Immunol Methodes 1991]. Die Zellen wurden wie folgt ausgesät [BON1 0,4 Mio. Zellen/ Well, NCI-H727 0,5 Mio. Zellen/ Well]. Nach 24 Stunden wurde das Komplett-Medium durch frisches 10% FBS-Medium ersetzt. Die NET-Zelllinien wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit 10µM INC280, Cabozantinib und Tivantinib behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300µl Trypsin von den Platten gelöst. Dabei wurden die Platten für 4

Minuten in den Brutschrank, bei 37°C in 95 % Wasserdampf-gesättigter und 5 % CO₂ enthaltender Atmosphäre, gestellt. Das Medium mit den Zellen wurde gesammelt und bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach einem zweiten Waschgang mit PBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Die so entstandenen Pellets wurden in 300µl Propidiumjodid (Nicolletti-Puffer, hypoton) resuspendiert. Nach einer Aufbewahrungszeit von ca. 2 Stunden wurde die Analyse mit Hilfe des BD Accuri C6 (BD Biosciences) durchgeführt. Bei der Auswertung der Ergebnisse durch das BD Accuri C6 Analysis-Programm, wurden die Zellkerne der subG1-Phase außer Acht gelassen.

Zell Migration Assay

Um den Einfluss von INC280, Cabozantinib und Tivantinib auf das Migrationsverhalten der NET-Zelllinien zu überprüfen, wurden 120.000 BON1 und 140.000 NCI-H727 Zellen/ Kammer in spezielle Culture Inserts, mit definierter Spaltbreite von 500 µm, ausgesät. Um einen gleichmäßigen Zellteppich zu erreichen, wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank, bei 37°C in 95 % wasserdampf-gesättigter und 5 % CO₂ enthaltender Atmosphäre, stehen gelassen. Anschließend wurde das Insert mit einer Pinzette entnommen und das Medium durch ein serumreiches FBS-Medium, das die bekannten Konzentrationen von INC280, Cabozantinib und Tivantinib (100 und 10000nM) enthielt, ersetzt. Unter dem Mikroskop wurde alle 24 Stunden mit einer Kamera ein Bild von dem Spalt zwischen den beiden Schichten gemacht. Der Versuch endete nach 72 Stunden. Die so erhaltenen Bilder wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji (imageJ 1.48u, National Institutes of Health, USA) ausgewertet.

Proteinextraktion und Western-Blot-Analyse

Proteinextraktion: Auf Proteinebene wurden, mittels Western Blot-Analysen, die Effekte der Inhibitoren untersucht. Dazu wurden alle 3 Zelllinien, im Komplet-Medium, auf 6-Well Platten ausgesät [BON1 0,4 Mio. Zellen/ Well, NCI-H727 0,5 Mio. Zellen/ Well und GOT1 1,0 Mio. Zellen/ Well]. Das Komplet-Medium wurde nach 24 Stunden durch ein 10% FBS-Medium ohne Antibiotika und Antimykotika ersetzt. Dieses enthielt die bereits bekannten Konzentrationen von INC280 I Cabozantinib I Tivantinib und im zweiten Projekt die bekannten Konzentrationen von CGM097 I 5-Fluorouracil I Temozolomid I Everolimus. Die Proben wurden für 2, 24, 48 und 72 Stunden bzw. für 2, 6, 24 und 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf Eis zweimal mit PBS gewaschen und mit 200µl Lysispuffer bedeckt. Die Platten mit den Lysaten wurden über Nacht bei -40°C aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten aufgetaut, die Überstände in Eppendorfgefäße überführt und die Lysate bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Mit dem Proteinassay (Rotiquant Universal, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde der Proteingehalt der Lysate bestimmt. Der Konzentrationsausgleich (Proteingehalt 30 – 40 µg/50 µl) erfolgte mittels Lysispuffer.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot: Die aus der Proteinextraktion gewonnenen Proben wurden mit dem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Je 50 µl des Protein-Puffer-Gemisches wurden in die Taschen eines Gradienten-Polyacrylamid-Gels (T = 8 – 20%) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 mA/ 200 V; ca. 120 min. Die durch die SDS-Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im nächsten Schritt innerhalb von 60 Minuten vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran, unter Verwendung eines Semi-Dry-Blotters, elektrotransferiert und somit immobilisiert. Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen und für 30 Minuten in einem Milchpulver-TBS-T-Puffer geblockt. Bei Raumtemperatur und auf dem Wippschüttler, wurde anschließend die Membran über Nacht den jeweiligen Erstantikörpern ausgesetzt (Tabelle 9). Am nächsten Tag wurde die Membran, nach dem Waschen mit TBS-T, mit einem Zweitantikörper (Tabelle 10) für 2 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran erneut gewaschen und es erfolgte die Detektion der Peroxidase-Aktivität des Zweitantikörpers. Dazu wurde die PVDF-Membran 15 Minuten mit dem Super-Signal-West-Dura-Chemolumineszenz-Substrat getränkt. Die so entstandene Chemolumineszenz wurde mit Hilfe des ECL ChemoCam Imager (Intas) detektiert. Falls nötig, wurde die beschriebene Vorgehensweise mit weiteren Erstantikörpern wiederholt. Dazu wurde die Membran mit Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer „gestrippt“, wobei somit die Antikörper von der Membran abgelöst wurden.

Erstantikörper

Primärer Antikörper	Hersteller
Anti-pMet (Tyr 1234/5), #3077	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Met, #3127	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pAkt (Ser 473), #4060	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Akt, #2920	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pERK (Thr202/Tyr204) 1/2, #4370	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pp70S6K (Thr389), #9234	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-p70S6K, #9202	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-p70S6K, #2708	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-p4EBP1 (Ser65), #9451	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-4EBP1, #9644	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pS6 (Ser240/4), #5364	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-S6, #2317	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pGSK3 (Ser21/9), #9331	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-GSK3, #9315	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-GSK3, #5676	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-p27 Kip1, #3686	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-p57 Kip2, #2557	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Cyclin B1, #12231	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Cyclin D1, #2978	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Cyclin D3, #2936	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-CDK4, #2906	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-CDK4, #12790	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-CDK6, #3136	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-CDK6, #13331	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Caspase 3, #9662	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Bid, #2002	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Bcl-xL, #2762 2764	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-PARP, #9542	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Parp, #9532	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Anti-E-Cadherin, #3195	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-N-Cadherin, #4061	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-β-Catenin, #8480	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Src, #2109	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Vimentin, #5741	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-ZO-1, #8193	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pMDM2 Ser166, #3521	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-PCNA, #5624	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pRb (Ser780), #8180	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pAMPK Thr172, #2535	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-AMPK, #5831	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-AMT, #2873	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pCREB Ser133, #9198	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-CREB, #9197	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Daxx, #4533	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pEGFR Tyr1068, #3777	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-EGFR, #4267),	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-E2F-1, #3742	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-HAUSP, #4833	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-HSP90, #4877	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pIGF1R Tyr1135, #3918	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-IGF1R, #3021	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Mcl-1, #5453	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-pMTOR Ser2448, #2971	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-MTOR, #2972	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-p14 ARF, #2407	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-p38 Thr180/Tyr182, #9215	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-MDM2, NB 100-2331	Novus Biologicals, Littleton, USA
Anti-p21 Waf1/Cip1, #610233	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland
Anti-Bcl-2, #610539	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland
Anti-p53, sc-126	Santa Cruz, Dallas, USA

Anti-Twist, sc-15393	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-p-Cdk6 (Tyr24), sc-293097	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-p38, sc-535	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-Actin, A5441	Sigma, St. Louis, USA
Anti-Caspase 8, AF1650	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-Erk 1/2, # 06-182	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Anti-RABL6, LS-C290382	Bethyl Labs, Montgomery, USA

Tabelle 9 - Verwendete Erstantikörper

Zweitantikörper

Sekundär Antikörper	Hersteller
Meerrettich Peroxidase Konjugierter Zweitantikörper-Kaninchen, # 7074	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Meerrettich Peroxidase Konjugierter Zweitantikörper-Maus, # 7076	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Tabelle 10 - Verwendete Zweitantikörper

DNA-Isolation und TP53 Sequenzierung – PCR

Isolierung der DNA: Für die Desoxyribonukleinsäuregewinnung wurden die drei NET-Zelllinien auf 10 cm Platten ausgesät (Got1 1 Mio. Zellen, BON1 0,4 Mio. Zellen, NCI-H727 0,5 Mio. Zellen) um einen semi-konfluenten Zellrasen zu erreichen. Die DNA Extraktion geschah entsprechend der Herstellerinstruktion (Wizard® SV Genomic; Promega).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierung: Die PCR und Sequenzierung wurden von unseren Kooperationspartnern im Labor von Frau Prof. Dr. Stefanie Hahner / Frau Dr. rer. nat. Sabine Herterich, Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt.

Spezifische Genabschnitte der soeben gewonnenen DNA wurden mit Hilfe der PCR vervielfältigt. Dies geschah unter Zugabe der, für den zu vervielfältigenden Genabschnitt spezifischen „Strang - und Gegenstrang – Primer“ (siehe Tabelle 11). Außerdem wurde zu den spezifischen Primern das dNTPs in 10-fach PCR-Puffer (500mM KCl; 100mM Tris-HCL (pH=8,3); 0,25% Tween20, 15mM MgCl₂) hinzugefügt. Das PCR-Programm war wie folgt: 96°C 2 Minuten; 30 Zyklen: 96°C 30 Sekunden, 58°C 30 Sekunden, 72°C 1 Minute; finaler Schritt 72°C 5 min.

p53 Sequenzierung

GEN	Primer-Sequenz Strang	Primer-Sequenz Gegenstrang
TP53 (EX 5)	P53_5F TGTTCACTTGTGCCCTGACTT	P53_5R AACCAGCCCTGTCTCTCTC
TP53 (EX 6)	P53_6F GCCCTCTGATTCCTCACTGAT	P53_6R TGGAGGGCCACTGACAACCA
TP53 (EX 7)	P53_7F CCTCATCTTGGGCCTGTGTT	P53_7R AGTGTGCAGGGTGGCAAG
TP53 (EX 8)	P53_8F AGGACCTGATTTCTTACTGC	P53_8R TGCACCCTTGGTCTCCTCCAC
TP53 (EX 9)	P53_Ex8_9_Fw GCCTCTTGCTTCTCTT-TTCC	P53_Ex8_9_Rev AAAACGGCATTTTGAGTGTT
TP53 (EX 10)	P53_Ex10_Fw TCAAACAATTGTAACCTT-GAACCATC	P53_Ex10_Rev AAGGCAGGATGAGAATGGAA

Tabelle 11 - Verwendete Primer bei der p53 Sequenzierung.

Im Anschluss wurden die erhaltenen PCR-Produkte durch EXO/SAP Verdau gereinigt und die Sequenzierung mit dem Q-Kit (Beckman-Coulter, Krefeld) durchgeführt. Die Trennung der Sequenzierungsprodukte wurde auf dem CEQ8000 durchgeführt.

Statistik

Es wurde für die statistische Analyse der Zellproliferationsassays in dieser Arbeit jeweils ein zweiseitiger t-Test angewandt.

Es werden jeweils die Durchschnittswerte und Standardabweichungen (SD) von mindestens drei, unabhängig voneinander durchgeführten, Versuchen gezeigt.

Dabei wurden alle Ergebnisse ab $p < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Teil I

Der Hepatocyte Growth Factor - (HGF) c-Met-Signalweg als „target“ in humanen neuroendokrinen Tumorzellen in vitro

3.1.1 Humane neuroendokrine Tumorzelllinien exprimieren c-Met und seinen Liganden HGF

In Western Blot Analysen konnte in den human pankreatischen Bon1-, broncho-pulmonalen NCI-H727- und Dünndarm GOT1-Zellen, die Rezeptortyrosinkinase c-Met nachgewiesen werden (Abbildung 5A). Die Expression des natürlichen, endogenen Liganden HGF wurde in den Bon1 und NCI-H727, jedoch nicht in den GOT1 Zellen nachgewiesen (Abbildung 5B). Die drei Zelllinien wurden für 10 Minuten mit rekombinanten humanen hepatocyte growth factor (rhHGF) stimuliert (Konzentration 1,25nM). Dies verursachte eine signifikante Phosphorylierung von c-Met an Y1234/5. Eine Vorstimulation mit dem c-Met Inhibitor INC280 (Novartis) in einer Konzentration von 100nM für 2 Stunden konnte die basale als auch die mit rhHGF stimulierte Expression von Phospho-c-Met Y1234/5 komplett aufheben (Abbildung 5A). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die rhHGF Stimulation auf Akt und ERK1/2, durch die Vorinkubation mit INC280 aufgehoben wird (Abbildung 5A).

Diese Daten demonstrieren, in allen drei untersuchten Zelllinien, ein Vorhandensein eines funktionellen c-Met Rezeptors. Jedoch konnte nur eine Expression von endogenem HGF und aktivierter c-Met (phospho-c-Met Y1234/5) in unbehandelten Bon1 und NCI-H727 nachgewiesen werden. In den Got1 Zellen konnte dies nicht nachgewiesen werden.

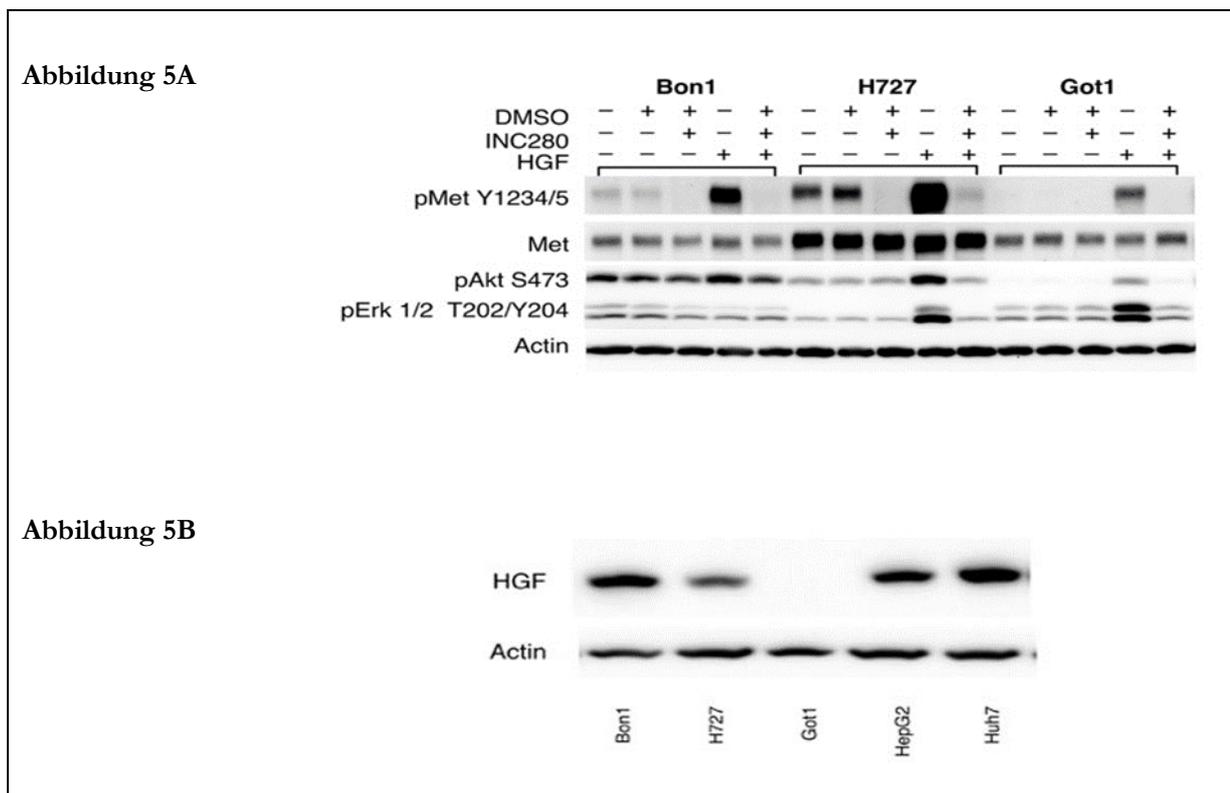


Abbildung 5 – A und B:

5A: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1-, Bronchopulmonale NCI-H727- und Dünndarm GOT1-Zellen wurden mit HGF (1.25 nM) für 10 Minuten inkubiert. Die Vorstimulation mit INC280 (100 nM) für 2 Stunden, wurde in der Kontrollgruppe und in der HGF behandelten Gruppe durchgeführt. Anschließend wurden die Expressionsmuster von p-c-Met Y1234/5, c-Met, pAkt S473, pERK1/2 T202/Y204 und β -Actin als „Loading control“ mittels Western Blot ermittelt.

5B: Unbehandelte Zelllysate der Bon1, NCI-H727 und GOT1 Tumorzellen. Die Expression von HGF und das Protein β -Actin, zur Kontrolle der Beladung, werden gezeigt.

Es wurde jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

3.1.2 Die Multi-TKIs Cabozantinib und Tivantinib inhibieren die Viabilität von NETs, während der spezifische c-Met Inhibitor INC280 keinen Effekt hat

Die humanen NET Ziellinien Bon1, NCI-H727 und GOT1 wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (1nM-10 000nM) für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. In den niedrigen Konzentrationen von 1 nM und 100 nM konnten Cabozantinib und Tivantinib keine signifikante Inhibition der Zellviabilität auf die drei Zelllinien zeigen (Abbildung 6A-6C). Im Untersuchungszeitraum von 24-72 Stunden, konnte Cabozantinib, in der Konzentration von 10000 nM, eine signifikante Reduzierung der Proliferation der drei Zelllinien aufweisen (Abbildung 6A-6C). Der Einfluss von Tivantinib auf die Proliferation der Bon1 und NCI-H727 wurde in gleicher Weise beobachtet (Abbildung 6A-6C). Jedoch wurde bei gleicher Konzentration und Inkubationsdauer wie bei Cabozantinib, kein Einfluss von Tivantinib auf die GOT1-Tumorzellen beobachtet (Abbildung 6A-6C).

Im Gegensatz dazu konnte INC280, bei keinem untersuchten Zeitpunkt und keiner verwendeten Konzentration (1 nM-10000 nM) einen konstanten signifikanten Effekt auf die Zellviabilität der drei Zelllinien zeigen (Abbildung 6A-6C).

Somit zeigen unsere Daten, dass Cabozantinib und Tivantinib einen erheblichen Einfluss auf die Zellentwicklung der NET, im Gegensatz zu INC280, haben. Der antiproliferative Effekt von Cabozantinib und Tivantinib ist nicht in Korrelation mit ihrer Wirksamkeit als c-Met Inhibitoren in Verbindung zu setzen (Abbildung 8). Auch kann dieser Einfluss auf die Bon1, NCI-H727 und GOT1 nicht mit der natürlichen Expression der aktivierten c-Met (phospho-c-Met Y1234/5) beschrieben werden (Abbildung 5A).

Abbildung 6A

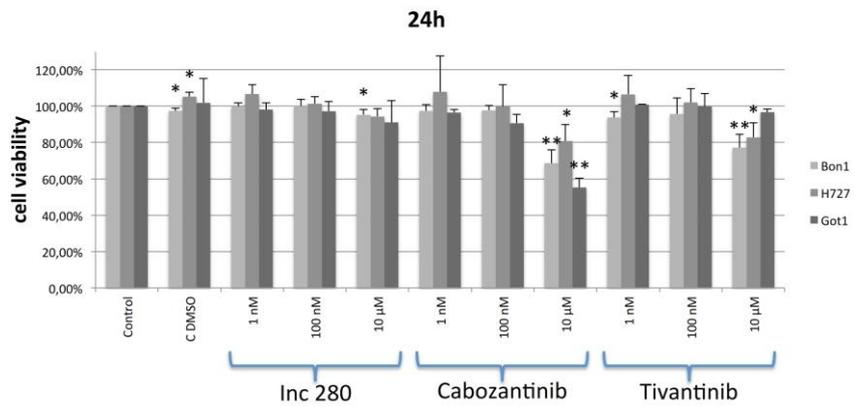


Abbildung 6B

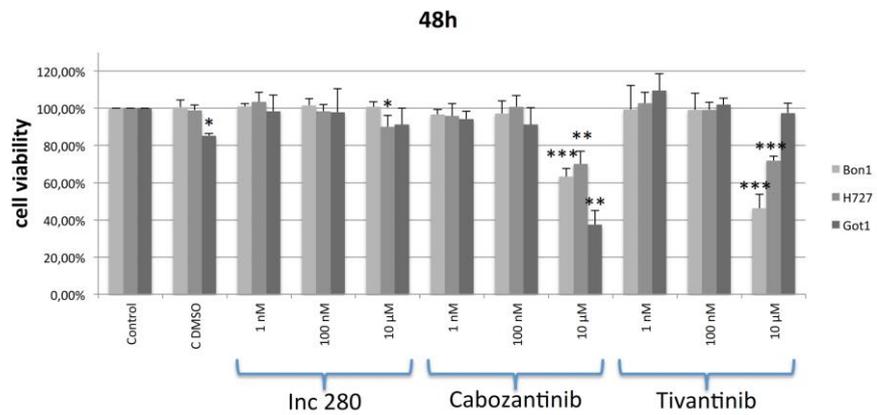


Abbildung 6C

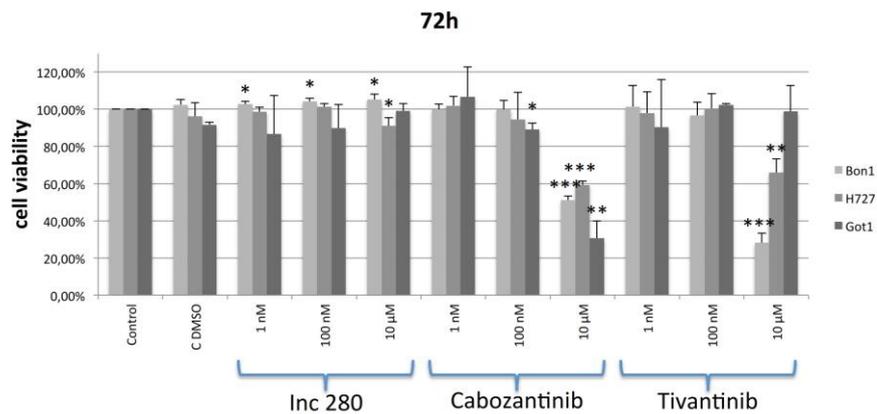


Abbildung 6 - A-C: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1-, Bronchopulmonale NCI-H727- und Dünndarm GOT1-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib in zunehmender Konzentration von 1 nM bis 10000 nM für 24h, 48h und 72h inkubiert. Die Zellviabilität wurde mit dem Cell Titer 96 Kit (Promega) bestimmt.

Mittelwerte und Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen werden gezeigt. Eine statistische Analyse durch den T-Test zeigte signifikante Ergebnisse. Dargestellt durch: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.3 Die Inhibition der c-Met Expression durch siRNA hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität

Die beiden Zelllinien Bon1 und NCI-H727 wurden entweder mit einer non-targeting siRNA (50nM) oder einer siRNA gegen c-Met (50nM) transfiziert. Die Effektivität der Transfektion wurde, mittels Western Blot Analyse, nach 72 Stunden kontrolliert und es konnte ein signifikanter Rückgang der c-Met Expression beobachtet werden (Abbildung 7A). Für die Untersuchung der Zellviabilität wurde die gleiche Versuchsanordnung angewandt. Es konnte kein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität der Bon1 sowie der NCI-H727 nachgewiesen werden (Abbildung 7B).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Inhibition der c-Met Expression keinen Einfluss auf das Überleben der neuroendokrinen Zelllinien in dem hier angewandten in vitro System hat.

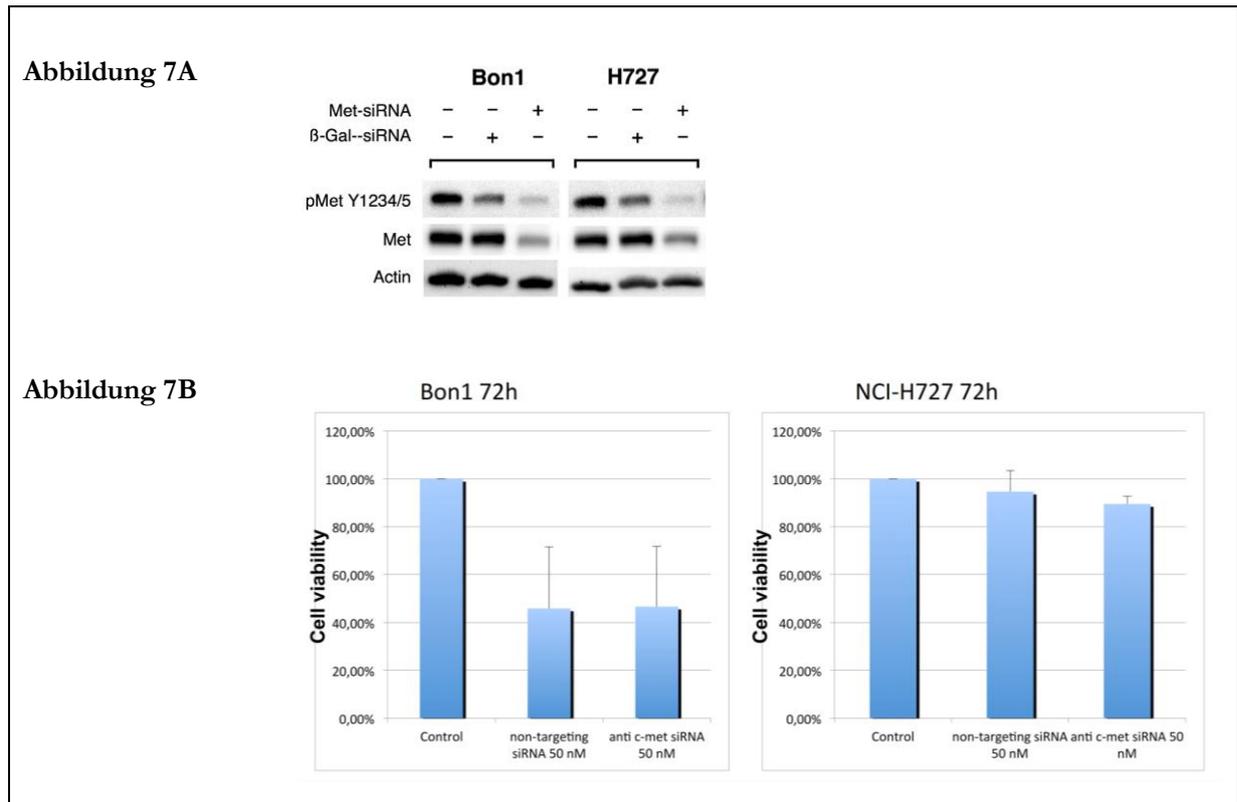


Abbildung 7 – A - B:

7A: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1-, Bronchopulmonale NCI-H727- und Dünndarm GOT1-Zellen wurden entweder mit einer non-targeted siRNA (50 nM) oder einer spezifischen siRNA gegen c-Met transfiziert. Die Effektivität der siRNA wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft. Betrachtet wurde die c-Met Expression nach 72 stündiger Transfektion.

7B: Die Zellviabilität der mit siRNA transfizierten Bon1- und NCI-H727-Zellen wurde mittels Cell Titer 96 Kit (Promega) nach 72 Stunden ermittelt.

Ein repräsentativer Blot mit dazugehörigen Mittelwerten und Standardabweichungen, von drei unabhängigen ermittelten Experimenten, werden gezeigt.

3.1.4 Unterschiedliche Effekte von INC280, Cabozantinib und Tivantinib auf die c-Met Aktivität

Die Zelllinien Bon1 und NCI-H727 wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib in den Konzentrationen von 1 nM, 100 nM und 10 µM für bis zu 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine Proteinextraktion mit nachfolgendem Western Blot durchgeführt. Die aktivierte phospho-c-Met Y1234/5 wurde sowohl bei INC280 als auch bei Cabozantinib bereits in der niedrigsten untersuchten Dosis teilweise inhibiert und eine vollständige Inhibition lag jeweils bei 100nM und 10µM vor (Abbildung 8). Tivantinib dagegen

fürhte nur in der höchsten Konzentration (10µM) zu einer nur partiellen Inhibition der phospho-c-Met Y1234/5 Expression (Abbildung 8).

Somit wird die c-Met Aktivität in den NET-Ziellinien durch INC280 und Cabozantinib bereits im nM-Bereich inhibiert, während Tivantinib auch im zweistelligen µM-Bereich, keine vollständige Inhibition der aktivierten phospho-c-Met Y1234/5 erreicht. Die Effektivität der c-Met Inhibition der einzelnen Substanzen, stehen in keinem Zusammenhang mit den gezeigten antiproliferativen Effekten auf die Bon1 und NCI-H727 Tumorzellen (Abbildung 6A-6C).

Zusätzlich wurden einige wichtige Marker des Akt/mTOR- und MAPK-Signalweges untersucht, da diese Signalwege essentiellen Einfluss auf die Zellproliferation der neuroendokrinen Tumoren haben [Zitzmann K. et al Endocr Relat Cancer 2012]. Die beiden Zelllinien Bon1 und NCI-H727 wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (alle 10µM) für 2, 24, 48 und 72 Stunden inkubiert (Abbildung 9A und 9B). Cabozantinib und Tivantinib verursachten nach langer Inkubation (48 und 72 Stunden) eine Reduzierung von p-EGFR in Bon1 und NCI-H727 (Abbildung 9A und 9B). Zusätzlich zeigte Cabozantinib nach 2 Stunden einen negativen Effekt auf pIGF-1R bei den Bon1 und NCI-H727 Zellen (Abbildung 9). Cabozantinib und Tivantinib bewirkten eine Inhibition von pAkt und p4EBP1S65 in den Bon1-Zellen nach 72 Stunden, jedoch nicht bei den NCI-H727-Zellen (Abbildung 9A und 9B). Nach 72 Stunden konnte ein Anstieg der Phosphorylierung von GSK3 an der Stelle S21/9 bei den Bon1 und den NCI-H727 durch Cabozantinib oder Tivantinib beobachtet werden (Abbildung 9A und 9B). Eine eher moderate Aktivität auf p-Erk1/2 T202/Y204 konnte nach 2 Stunden bei den Bon1 (Abbildung 9A und 9B) und nach 24 Stunden bei den NCI-H727 (Abbildung 9A und 9B) durch Cabozantinib und Tivantinib beobachtet werden. Keiner dieser gezeigten Effekte konnte in ähnlicher Weise bei INC280 beobachtet werden (Abbildung 9A und 9B).

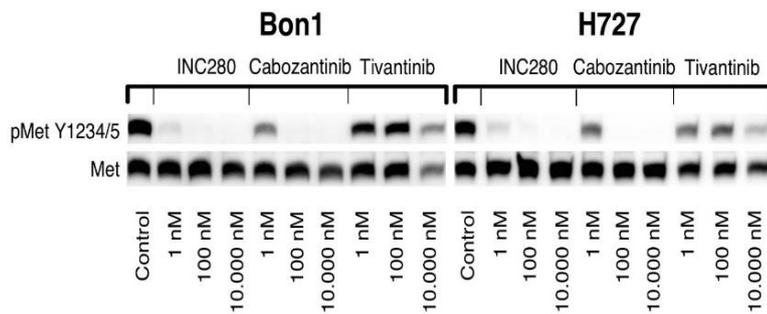


Abbildung 8 Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib in zunehmender Konzentration von 1 nM bis 10000 nM für 24h inkubiert. Die unter der Inhibition entstanden Expressionsmuster von phospho-c-Met Y1234/5 und C-Met werden gezeigt.

Ein Blot von drei unabhängigen Experimenten wird gezeigt.

Abbildung 9A

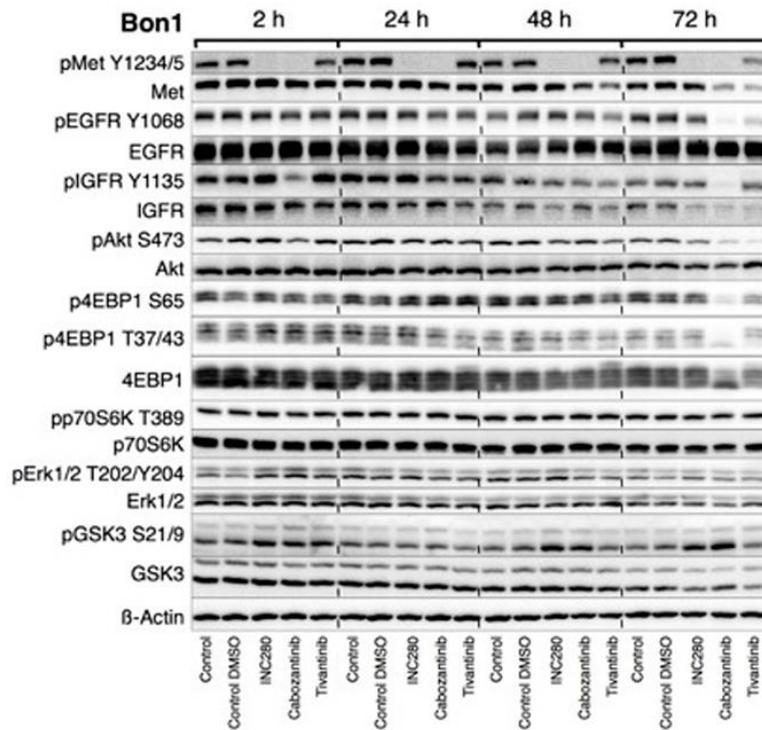


Abbildung 9B

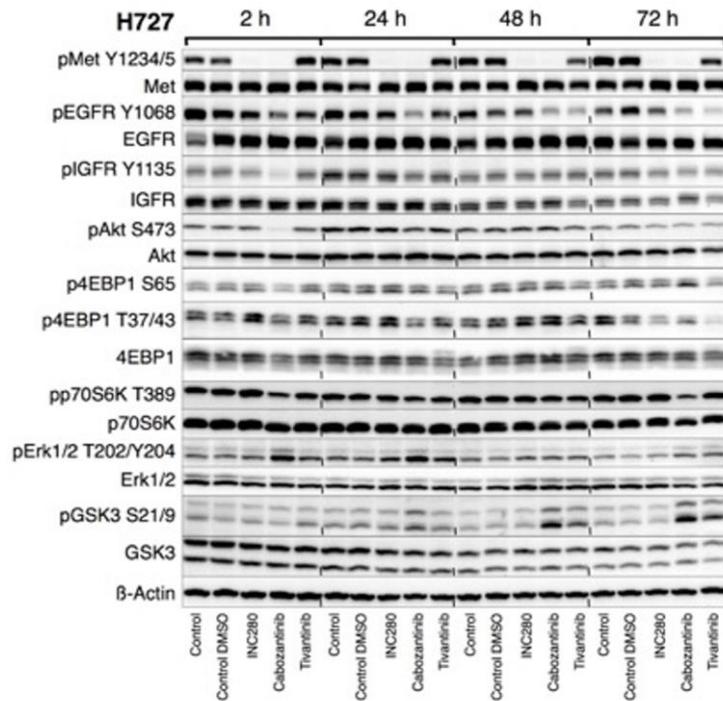


Abbildung 9 – A - B Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (10000 nM) für 2h, 24h, 48h und 72h inkubiert. Im Western Blot wird die Expression der Proteine von phospho-c-Met Y1234/5, c-Met, pEGFR Y1068, EGFR, pIGFR Y1135, IGFR, pAkt S473, Akt, p4EBP1 S65, p4EBP1 T37/47, 4EBP1, pp70S6K T389, pERK1/2 T202/Y204, ERK1/2, pGSK3 S21/9, GSK3 und β-Actin als "loading control" gezeigt.

Ein Blot von drei unabhängigen Experimenten wird dargestellt.

3.1.5 Cabozantinib und Tivantinib bewirken einen G2-Arrest bei NET, im Gegensatz zu INC280.

Die pankreatischen Bon1 Zellen und die bronchopulmonalen NCI-H727 Zellen wurden mit der gleichen Konzentration (10 μ M) von INC280, Cabozantinib und Tivantinib für 24 Stunden inkubiert und anschließend wurde mit den Zellen eine FACS-Analyse durchgeführt. So zeigte sich bei beiden Zelllinien unter Cabozantinib und Tivantinib eine signifikante Akkumulation der Zellen in der G2-Phase, im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Abbildungen 10A, 10B und 10C, 10D).

INC280 zeigte jedoch keine signifikanten Effekte auf den Zellzyklus der Bon1 und NCI-H727 in Bezug auf die Kontrollgruppe (Abbildung 10B und D).

Abbildung 10A

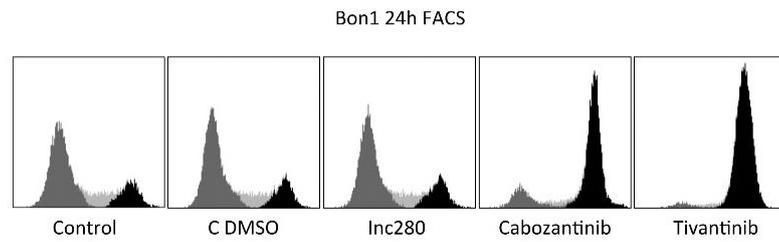


Abbildung 10B

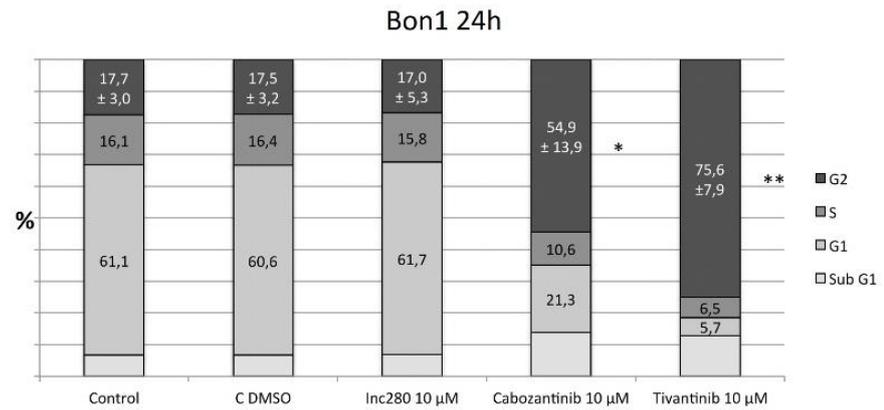


Abbildung 10C

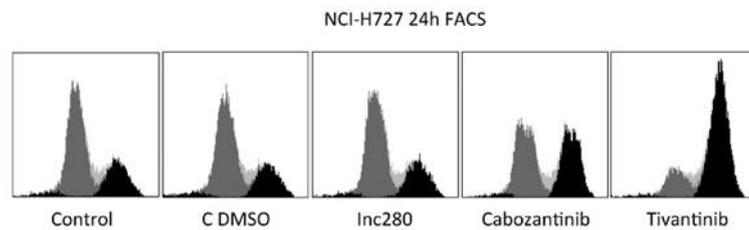


Abbildung 10D

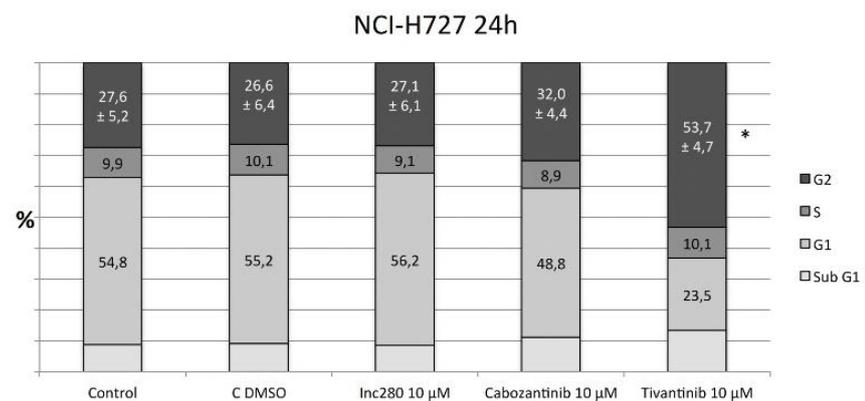


Abbildung 10 - A-D: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib mit einer Konzentration 10000 nM für 24 Stunden inkubiert. Da gestellt sind die G2, S, G1 und sub G1 Events der FACS-Analyse.

Eine von drei unabhängigen FACS-Analysen wird gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen der drei unabhängigen Versuche werden durch Abb. 10 B und 10 D gezeigt. Eine statistische Auswertung mittels T-Test ergab signifikante Ergebnisse, diese wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.6 Unterschiedliche Effekte von INC280, Cabozantinib und Tivantinib auf die c-Met Aktivität und verschiedene Proteinmarker des Zellzyklus und der Apoptose.

Die Zellen wurden wieder wie obig beschrieben inkubiert und anschließend einem Western Blot unterzogen.

Cabozantinib und Tivantinib konnten nach 72 Stunden eine Inhibition der Expression von Cyclin D1 und dem Proliferationsmarker PCNA in den Bon1 und den NCI-H727 vorweisen (Abbildung 11A und 11B). Cyclin B1 wurde von beiden Substanzen in beiden Zelllinien zusätzlich hochreguliert. So sind die gefundenen Resultate mit dem beobachteten Zellzyklusarrest übereinstimmend (Abbildung 11A und 11B).

Aufgrund der Ergebnisse der FACS-Analyse und dem Western Blot, wurde das Expressionsmuster vom „G2 checkpoint-regulator“ Chk1 untersucht. Die unterschiedlichen Einflüsse von Cabozantinib und Tivantinib auf die Expression von pChk1S345/Chk1 in den Bon1 und NCI-H727, beziehen sich auf spezifische, zelltypische Regulation der einzelnen Zelllinien (Abbildung 11A und 11B).

Jedoch konnte kein Effekt auf den Proteinmarker „cleaved PARP“ durch Cabozantinib und Tivantinib in den untersuchten Tumorzellen nachgewiesen werden (Abbildung 11A und 11B).

3.1.7 Die Zellmigration der NET wird durch Cabozantinib und Tivantinib blockiert, jedoch nicht durch den spezifischen c-Met Inhibitor INC280

Bei diesem Versuch wurde im Migrationsassay die Spaltbreite betrachtet, die nach 72 Stunden noch zu sehen war. Hierzu wurden die Zellen (Bon1 und NCI-H727) mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib in den Konzentrationen 100nM und 10µM inkubiert (Abbildung 12A – 12D). So zeigte sich sowohl bei den Bon1 als auch bei den NCI-H727 ein deutlicher Rückgang des Zellwachstums nach 72 Stunden unter Cabozantinib und Tivantinib in der Hochdosis von 10µM, (Abbildung 12a - 12d). Jedoch konnte INC280, im Gegensatz zur Kontrolle, weder bei Bon1 noch bei NCI-H727 einen inhibitorischen Effekt aufweisen (Abbildung 12A – 12D).

Somit steht auch der migrationshemmende Effekt der eingesetzten Substanzen in keinsten Weise in Korrelation mit ihren jeweiligen Effekten auf die c-Met Inhibition (Abbildung 12A – 12D).

Anschließend wurde untersucht, ob der oben beschriebene Effekt durch die „epithelial mesenchymal transition“ (EMT) Marker vermittelt wurde.

Im Gegensatz zu den gezeigten Effekten im Migrationsassay, konnte bei allen drei untersuchten Substanzen, im Western Blot kein Effekt auf verschiedene EMT-Marker beobachtet werden (Abbildung 13).

Abbildung 12A

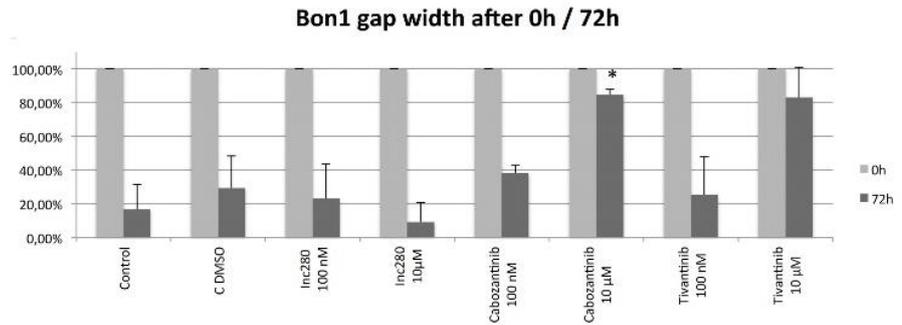


Abbildung 12B

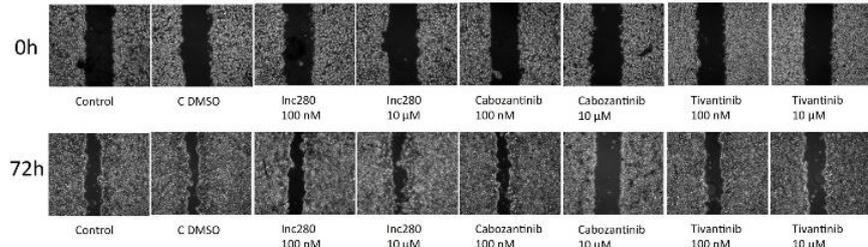


Abbildung 12C

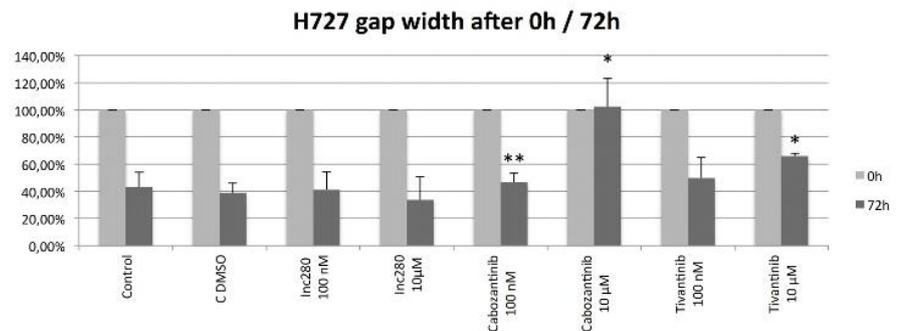


Abbildung 12D

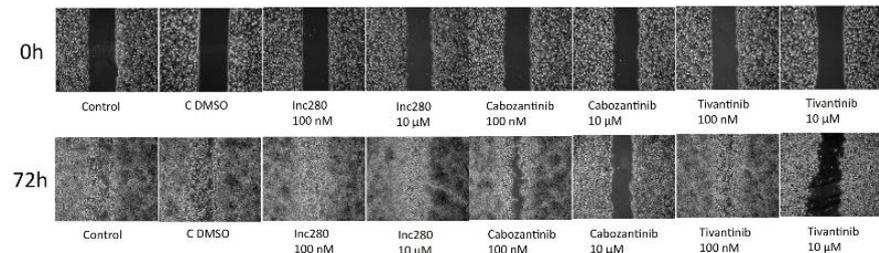


Abbildung 12 – A-D: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1 (12A und B) - und Bronchopulmonale NCI-H727 (12C und D) -Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (100nM und 10000nM) für 72 Stunden behandelt. Analysiert wurde die Spaltbreite nach 0 Stunden und 72 Stunden. Ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten wird durch Abb. 12B und 12 D gezeigt.

Eine von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen der drei unabhängigen Versuche werden durch Abb. 12 A und 12 C gezeigt. Eine statistische Auswertung mittels T-Test ergab signifikante Ergebnisse, diese wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

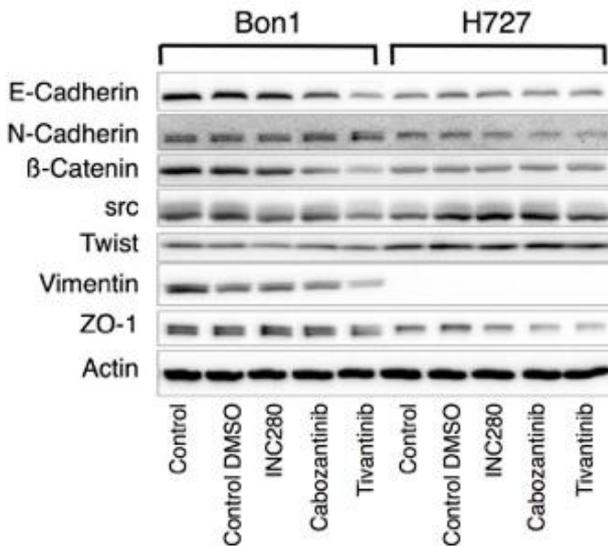


Abbildung 13 - Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (10000nM) für 24 Stunden behandelt. Die Expressionsmuster der EMT-Marker E-Cadherin, N-Cadherin, β -Cadherin, src, Twist, Vimentin, ZO-1 und β -Actin als "loading control" wurden im Western Blot ermittelt und gezeigt.

Hierbei handelt es sich um einen repräsentativen Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2 Teil II

Wiederherstellung der wildtyp- p53 Funktion in GEP-NET-Zellen durch MDM2 Inhibition

3.2.1 Unterschiedliche Expressionsmuster des Tumorsuppressor p53 in humanen Neuroendokrinen Tumorzelllinien.

In Western-Blot Analysen konnte eine unterschiedliche p53 Expression in den untersuchten NET Bon1, NCI-H727 und GOT1 gezeigt werden (Abbildung 14). So zeigten die NCI-H727 Zellen ein hohes Expressionslevel, während die GOT1 Zellen ein niedriges Level zeigten. Beide Zelllinien besitzen ihre Proteinbande bei den erwarteten 54 kDa. Bei den Bon1 zeigte sich die Proteinbande dagegen bei 50kDa, am ehesten entsprechend einer veränderten/ verkürzten Proteinversion. Des Weiteren sind unterschiedliche Expressionslevel der Proteine MDM2, p21, Rb und E2F1, unter normalen Bedingung in Kompletmedium, in den Zelllinien zu finden (Abbildung 14).

Die o6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) konnte nur in den Kontrollzellen HepG2 und HuH7 nachgewiesen werden (Abbildung 14).

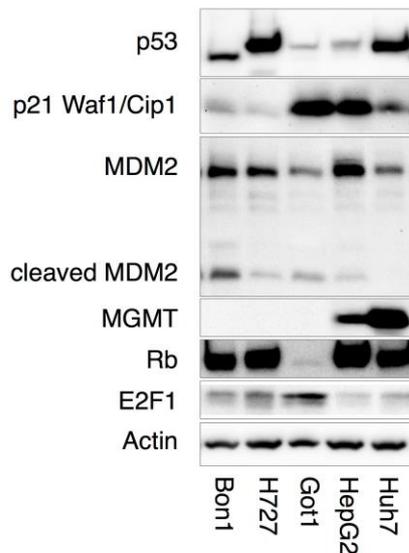


Abbildung 14 - Western Blot Analyse der Basisproteine in Humanen Pankreatischen Bon1, Bronchopulmonalen NCI-H727 und Dünndarm GOT1 NET. Leberkarzinomzellen HepG2 und Huh7 wurden als Kontrolle verwendet. Die Expressionmuster von p53, MDM2, p21, Rb, E2F1, MGMT und β -Actin als „loading control“ werden in allen drei Tumorzelllinien dargestellt.

Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Effekte des MDM2 Inhibitors NVP-CGM097 auf die MDM2-p53-p21-Rb-E2F1 Kaskade. Der MDM2 Inhibitor NVP-CGM097 führt zu einer Erhöhung von MDM2, pMDM2, p53 und seinen bekannten „downstream-targets“ p21 und PUMA bei gleichzeitiger Erniedrigung von phosphoRb und E2F1 in GOT1 Tumorzellen.

Die drei untersuchten neuroendokrinen Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von NVP-CGM097 (100, 500 und 2500 nM) für 24 h inkubiert. Es zeigte sich eine dosisabhängige Verstärkung der Proteinexpression von MDM2, pMDM2 und p53 durch NVP-CGM097 in p53^{wildtype} GOT1 Zellen und auch eine Hochregulation der bekannten „p53 downstream-targets“ p21 und dem „modulator of apoptosis“ (PUMA) (Abbildung 15). Desweiteren kam es zu einer Senkung der Proteinlevel von pRb und E2F1 (Abbildung 15). Gleichzeitig wurde die Expression von Cyclin B1 gesenkt und von Cyclin D3 gesteigert (Abbildung 15). Diese Resultate sind, mit den schon bekannten Effekten von anderen MDM2 Inhibitoren, die Einfluss auf die MDM2-p53-p21-Rb-E2F1 Kaskade nehmen, vergleichbar [Du W. et al, J Bio Chem 2009; Laine A & Westermarck J. et al, Clin Cancer Res 2014; Li Q. & Lozano G. et al, Clin Cancer Res 2013]. Durch die MDM2 Inhibitoren wird die Proteininteraktion zwischen der E3 Ubiquitin-Ligase MDM2 und p53 verhindert und somit auch die Degradation von p53 im protosomalen Ubiquitin-Weg. Dies führt zu einem Anstieg des p53^{wildtype} in den Krebszellen. Aufgrund des Anstiegs des Proteingehalts an p53^{wildtype} kommt es zu Veränderungen im Ablauf der MDM2-p53-p21-Rb-E2F1 Kaskade, was den antitumoralen Effekt der MDM2 Inhibitoren vermittelt [Du W. et al, J Bio Chem 2009; Laine A & Westermarck J. et al, Clin Cancer Res 2014; Li Q & Lozano G. et al, Clin Cancer Res 2013]. In p53^{wildtype} Tumorzellen scheint die Therapie mit einem MDM2 Inhibitor vielversprechend zu sein [Saiki AY. et al, Oncotarget 2015; Briest F. et al; Neuroendocrinology 2017].

In Gegensatz dazu zeigten sich Tumorzellen mit einem mutierten p53 unempfindlich gegen einen MDM2 Inhibition [Saiki AY et al, Oncotarget 2015]. Dementsprechend, konnten bei den untersuchten p53^{mutation} Bon1 und p53^{mutation} NCI-H727 keine signifikanten Effekte auf die nachgeschalteten Proteine p53, p21, pRb, E2F1, Cyclin B1 Cyclin D3 und PCNA beobachtet werden, obwohl es zu einer Erhöhung der Proteinlevel der pMDM2 und MDM2 kam (Abbildung 15). Aufgrund der in dieser Arbeit nun vorgelegten Ergebnisse, sind die beiden Zelllinien Bon1 und NCI-H727 mit p53^{mutation}, im Gegensatz zu den GOT1 p53^{wildtype} Zellen, unempfindlich gegenüber der Behandlung mit NVP-CGM097.

Zusätzlich wurde noch die Expression der „herpes virus associated ubiquitin specific protease“ (HAUSP) und von „death domain-associated Protein 6 (DAXX) untersucht.

Bei der Herpes Virus assoziierten Ubiquitin spezifischen Protease (HAUSP) handelt es sich um eine Deubiquitinase, welche einen stabilisierenden Einfluss auf den p53 Level in der Zelle, vor allem in Gegenwart von MDM2, hat [Brooks CL et al, Oncogene 2007, Kon N et al, Oncogene 2010]. Gleichzeitig wird durch HAUSP das „death domain-associated protein 6“ (DAXX) kontrolliert, welches p53 unterdrücken würde [Tang J et al, Biochem Biophys Res Commun 2010]. In allen drei untersuchten Zelllinien hatte NVP-CGM097 keinen Effekt auf die Proteine HAUSP und DAXX (Abbildung 15). Somit hat die MDM2 Inhibition durch NVP-CGM097 keinen direkten bzw. indirekten Einfluss auf die Expression von HAUSP und DAXX.

Abbildung 15

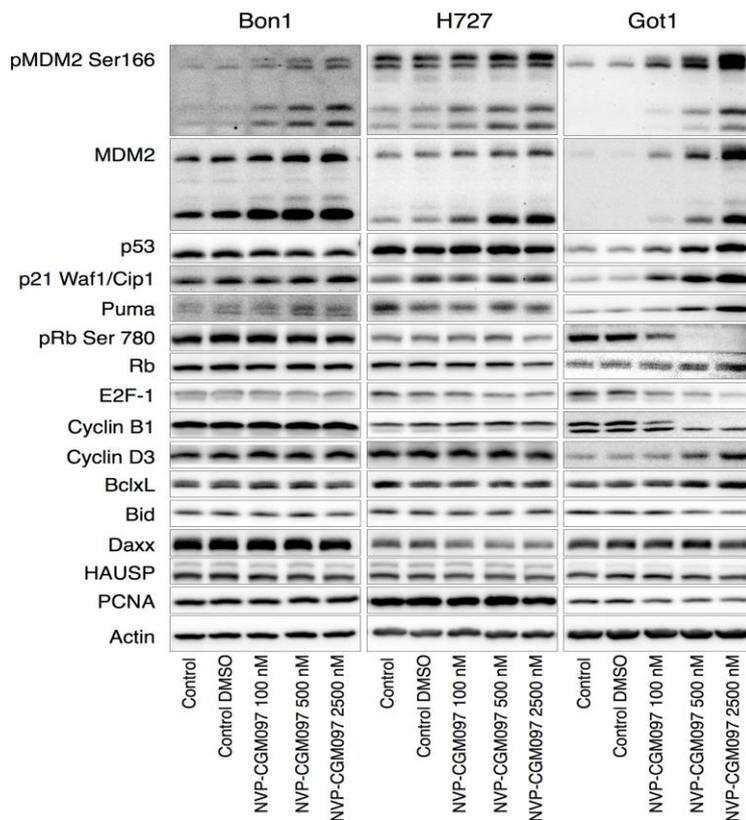


Abbildung 15 –: Western Blot Analyse der Expressionsmuster von pMDM2, MDM2, p53, p21, PUMA, E2F1, pRB, Rb, Cyclin B1, Cyclin D3, BclxL, Bid, DAXX, HAUSP, PCNA und β -Actin als „loading control“, in p53^{wildtype} GÖT1 Zellen, p53^{mutation} Bon1 und p53^{mutation} NCI-H727 Zellen während der Inkubation mit NVP-CGM097.

Hierbei handelt es sich um einen repräsentativen Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.3 Bon1 und NCI-H727 Tumorzellen weisen jeweils eine TP53 Genmutation auf.

Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der untersuchten Proteine stellte sich die Frage, ob eine Mutation im TP53 Gen der verwendeten NET Zelllinien vorliegt.

Laut IRAC TP53 Database sind 90 % aller somatischen TP53 Mutationen auf den Exons 5 – 8 zu finden, während nur ca. 5 % der somatischen Mutationen auf den Exons 2 und 4, den Introns oder der Promoter Region lokalisiert sind [International Agency for Research on Cancer (IRAC), IRAC TP53 Database, Version R17, November 2013, <http://p53.iarc.fr>; Petitjean A. et al, Hum Mutat 2007]. Vor diesem Hintergrund wurde von der DNA der Humanen Neuroendokrinen Pankreas Bon1, bronchopulmonalen NCI-H727 und der Dünndarm GOT1 Tumorzellen, eine Sequenzierung der Exone 5 bis 10 durchgeführt.

Ein funktionierendes p53^{wildtype} lag in den GOT1 Zellen vor, da keine Mutation des TP53 Gen gefunden wurde. Im Gegensatz dazu, wurde eine TP53 Mutation mit vermutlicher „loss of function“ von p53 jeweils in den Bon1 und NCI-H727 festgestellt. Ein p.R342Stop; c.1024 C>T im Exon 10 vom TP53 Gen, konnte in den Bon1 Zellen gezeigt werden (Abbildung 16A). Dieses vorläufige Stopcodon im TP53- Gen führt zu der veränderten Proteinbande in der Abbildung 14. Die NCI-H727 zeigen einen heterozygoten Basenpaar Einschub (c.492_493ins9) im Exon 5 (Abbildung 16B). Dies verursacht eine Tandem-Duplizierung der Aminosäuren 163-164-165 (Abbildung 16C) in den Tumorzellen.

Abbildung 16A

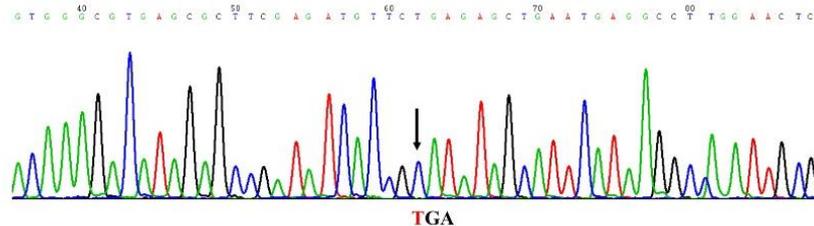


Abbildung 16B

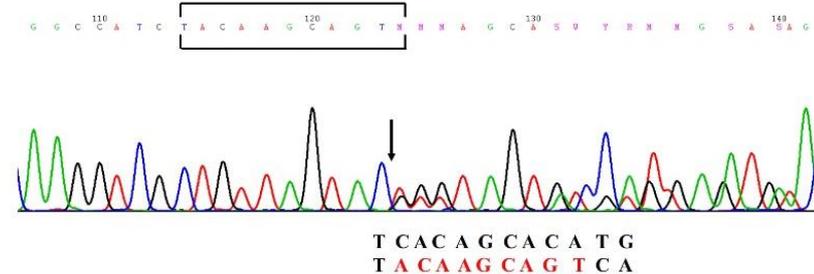


Abbildung 16C

p53	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLENVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP
p53ins9	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLENVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP *****
p53	DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRGLFHSGTAK
p53ins9	DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRGLFHSGTAK *****
p53	SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGRVTRAMAIYKQ---SQHMTEVVRRC
p53ins9	SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGRVTRAMAIYKQYKQSQHMTEVVRRC *****
p53	HHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRYEYLLDRNTFRHSVVVYPPEVGSDCCTTHYNYM
p53ins9	HHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRYEYLLDRNTFRHSVVVYPPEVGSDCCTTHYNYM *****
p53	CNSSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHH
p53ins9	CNSSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHH *****
p53	ELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGK
p53ins9	ELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGK *****
p53	EPGGSRAHSSHLSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD
p53ins9	EPGGSRAHSSHLSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD

Abbildung 16 - A - C:

A: Sequenzierungsanalyse der Mutationen des TP53 Gens. Bon1 beherbergen ein. p R342Stop; c.1024 C>T in Exon 10.

B: NCI-H727 weisen eine heterozygote Insertion ins p. 162 Tyr-Lys-Gln (TAC AAG CAG) im Exon 5 auf.

C: Dies führt zu einem Einschub von 3 Aminosäuren im Leseraster des Tp53 Gen.

3.2.4 Effekte des Inhibitors NVP-CGM097 auf die Viabilität der neuroendokrinen GOT1 Tumorzellen.

Alle drei untersuchten Zelllinien (Bon1, NCI-H727 und GOT1) wurden in einem Konzentrationsbereich von 4nM bis 2500nM mit NVP-CGM097 für 48h, 96h und 144h inkubiert. Dabei zeigte sich ein zeit- und dosisabhängiger Einfluss von NVP-CGM097 bei den p53^{wildtyp} GOT1 Zellen auf die Zellviabilität (Abbildung 17A-C). Die kalkulierte IC50 von NVP-CGM097 lag, während der Inkubation für 144h, bei 1,84 µM.

Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Effekt bei der Behandlung der p53^{mutation} Bon1- und der p53^{mutation} NCI-H727-Tumorzellen auf die Viabilität festgestellt werden. Somit sind beide Zelllinien unempfindlich gegenüber einer Behandlung, die auf der Inhibition von MDM2 beruht.

Eine ähnliche Beobachtung machte Villalonga-Planells R. et al. bei Behandlung von humanen Glioblastoma Zellen mit dem MDM2 Inhibitor Nutlin-3a. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Zellen mit einem normalen TP53 Status auf die Inhibition reagierten [Villalonga-Planells R. et al, PloS ONE 2011]. Auch Briest et al demonstrierten in NET Ziellinien nur Effekte von Nutlin auf p53^{wildtyp} KRJ-I Zellen [Briest F. et al; Neuroendocrinology. 2017].

Abbildung 17A

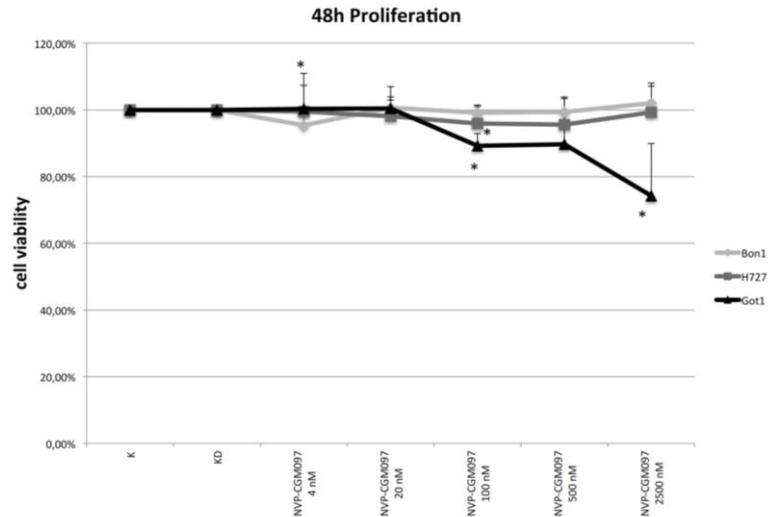


Abbildung 17B

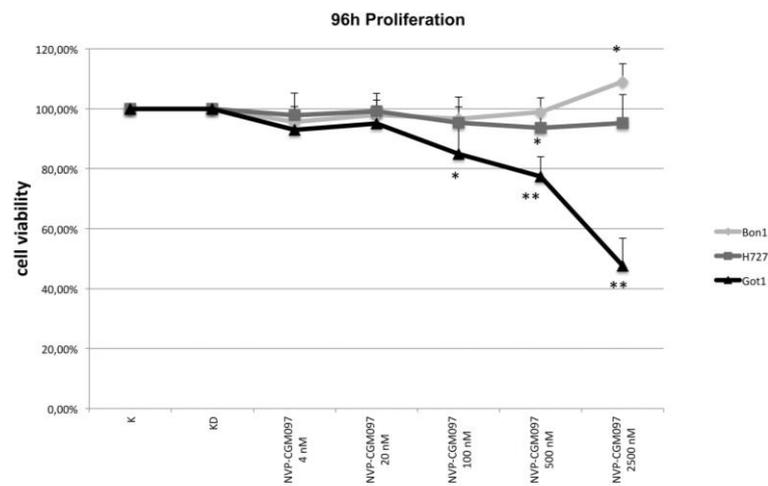


Abbildung 17C

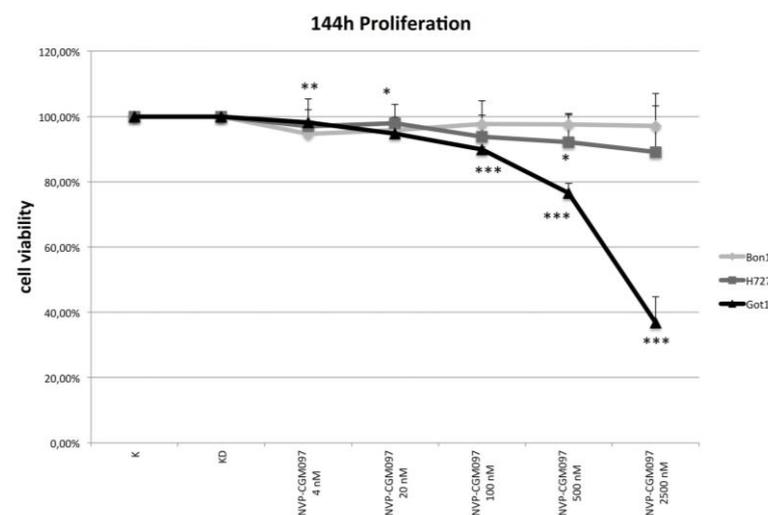


Abbildung 17 - A - C: Zellviabilität-Assay der $p53^{wildtype}$ GOT1-, $p53^{mutation}$ Bon1- und $p53^{mutation}$ NCI-H727 Zellen während der Inkubation mit CGM097 (4 nM bis 2500 nM) für 48, 96 und 144 Stunden.

Gezeigt werden die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier unabhängigen ermittelten Versuchen. Signifikante Ergebnisse wurden durch die Anwendung eines T-Test ermittelt und wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.4.1. Additive Effekte auf die Zellviabilität bei Kombination der MDM2 Inhibition mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001)

Die neuroendokrinen Dünndarmzellen GOT1 wurden für 96 h entweder mit NVP-CGM097 (500nM) alleine oder in Kombination mit 5-Fluorouracil (5 μ M oder 25 μ M), Temozolomid (50 μ M) oder Everolimus (10nM) inkubiert. Die Behandlung der GOT1-Zellen mit den Einzelsubstanzen führte zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation im Gegensatz zur Kontrolle (Abbildung 18 A). In Kombination von NVP-CGM097 mit 5-Fluorouracil (5 μ M oder 25 μ M), Temozolomid (50 μ M) und Everolimus (10nM) zeigte sich ein zusätzlicher additiver Effekt auf die Viabilität, mit einer Signifikanz von mindestens $p < 0,05$, als unter der alleinigen NVP-CGM097 Therapie (Abbildung 18 A).

Analog wurden humane bronchialen NCI-H727 und pankreatischen Bon1 Tumorzellen, mit NVP-CGM097 (500nM) alleine oder in Kombination mit 5-Fluorouracil (1 μ M oder 5 μ M), Temozolomid (Bon1: 50 μ M; H727: 500 μ M) und Everolimus (10nM) inkubiert (Abbildung 18 B-C). Der antiproliferative Effekt, auf die Bon1 und NCI-H727, war bei 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus jeweils signifikant, jedoch konnte kein Effekt mit NVP-CGM097 gezeigt werden (Abbildung 18 B-C). Trotz des fehlenden Effekts auf die Zellproliferation von NVP-CGM097 auf Bon1- und NCI-H727 Zellen wurden Kombination untersucht, um herauszufinden, ob NVP-CGM097 ein möglicher Wirkverstärker für 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus sein kann. Jedoch zeigte sich auch in der Anwendung einer Kombination kein zusätzlicher signifikanter Effekt auf die Viabilität der Bon1 und NCI-H727 Zellen (Abbildung 18 B-C).

Abbildung 18A

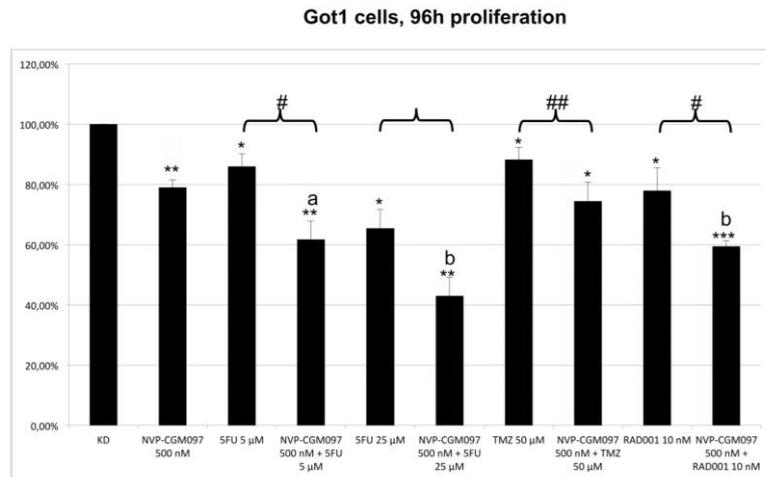


Abbildung 18B

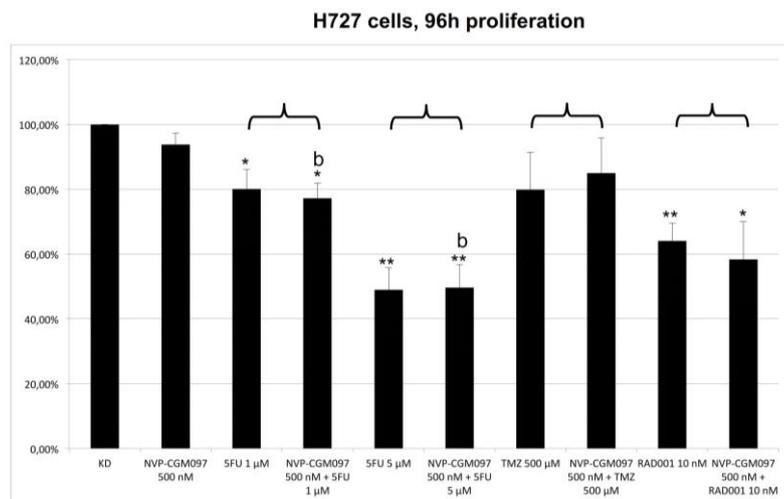


Abbildung 18C

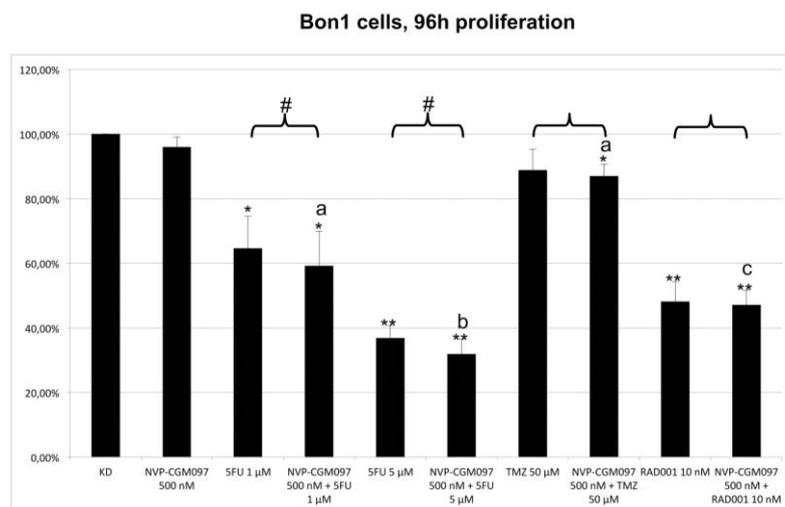


Abbildung 18 - 18A-C: Zellviabilität-Assay der $p53^{wildtype}$ GOT1-, $p53^{mutation}$ Bon1- und $p53^{mutation}$ NCI-H727 Zellen während der Inkubation für 96 Stunden mit CGM097 alleine und in Kombination mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001).

Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Signifikante Ereignisse gegen die unbehandelte Kontrolle wurden durch statistische Analyse mit Hilfe des T-Test ermittelt und wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Statistische Analysen mit dem T-Test zeigten signifikante Ergebnisse im Vergleich Kontrolle zu CGM097. Dargestellt mit a $< 0,05$ und b $< 0,01$. Statistische Analysen mit dem T-Test zeigten signifikante Ergebnisse von 5-Fluorouracil, Temozolomid und RAD001 alleine, verglichen mit CGM097 + 5-Fluorouracil, Temozolomid und RAD001. Dargestellt mit # $< 0,05$ und ## $< 0,01$.

3.2.5 Additive Effekte der Kombination aus NVP-CGM097 mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001) auf Proteinebene.

3.2.5.1 Additive Effekte der Kombination von NVP-CGM097 mit 5-Fluoruracil in p53^{wildtype} von GOT1-Tumorzellen.

Das Zytostatikum 5-Fluoruracil inhibiert MDM2 durch die Freisetzung von ribosomalen Proteinen, somit wird p53 in der Tumorzelle stabilisiert und aktiviert [Sun XX et al, J Biol Chem 2007]. Durch die erhaltenen Ergebnisse aus den Proliferations-Analysen wurde untersucht ob additive Effekte in der Kombination mit 5-Fluoruracil auf die Proteine p53, p21, PUMA, phosphoRb und E2F1 vorhanden sind. Durch die alleinige Behandlung der GOT1 Zellen (p53^{wildtype}) mit 5-Fluoruracil, konnte ein Anstieg der Proteinlevels von p53, p21 und PUMA gezeigt werden (Abbildung 19A). Unter der Kombination aus NVP-CGM097 (500nM) und 5-Fluoruracil (50µM) konnte ein synergistischer Effekt gezeigt werden. Die Proteinexpression von MDM2, pMDM2, p53, p21 und PUMA stieg deutlich an während es zeitgleich zu einem deutlichen Abfall der Proteinexpression von pRb und E2F1 kam (Abbildung 19A). Folglich sind die gesehenen additiven Effekte der Kombination auf die Zell-Proliferation der GOT1 (Abbildung 18 A), durch den Einfluss auf die MDM2-p53-PUMA-p21-Rb-E2F-1-Achse vermittelt.

3.2.5.2 Additive Effekte der Kombination von NVP-CGM097 mit Everolimus in p53^{wildtype} von GOT1-Tumorzellen.

In verschiedenen Tumorzelllinien wurde berichtet, dass der mTOR Inhibitor Rapamycin die MDM2 Expression inhibiert und so die p53 abhängige Apoptose einleitet [Du W et al, PLoS ONE 2013; Kao et al, Cancer Lett 2009]. In der Arbeit von Chatterjee A. et al, konnte der inhibierende Einfluss von Rapamycin auf den Rb-pathway gezeigt werden [Chatterjee A. et al, Cancer Lett 2015]. Jedoch gibt es auch kontroverse Berichte über eine abgeschwächte Antwort von p53 auf nuklearen Stress durch die mTOR Inhibition [Goudarzi KM. et al, Cancer Biol Ther 2014; Selvarajah J. et al, Cell Death Dis 2013].

Aufgrund dieser Datenlage wurde untersucht, ob additive Effekte in der Kombination von NVP-CGM097 mit Everolimus auftraten. Dabei wurden die Proteine p53, p21, PUMA, pRb und E2F1 als Referenz herangezogen. Die Co-Inkubation von NVP-CGM097 und Everolimus (RAD001) führte bei den verwendeten GOT1-Zellen zu einem Rückgang der Expression von phosphoRb (Abbildung 19A). Aufgrund dieses Ergebnisses könnte der additive Effekt von NVP-CGM097 und Everolimus (RAD001) in der Zellproliferation, mit der Reduzierung von phosphoRb auf Proteinebene zurückzuführen sein, da somit der Rb-Signalweg unterdrückt wird. Des Weiteren konnten keine zusätzlichen Einflüsse auf die untersuchten Signale der MDM2-p53-PUMA-p21-Rb-E2F-1-Achse festgestellt werden.

3.2.5.3 Additive Effekte der Kombination von NVP-CGM097 mit Temozolomid in p53^{wildtype} von GOT1-Tumorzellen.

In den GOT1 Zellen zeigten CGM097 und Temozolomid additive Effekte auf die Zellviabilität (Abbildung 18 A). Deshalb wurde versucht, auf Proteinebene die zugrundeliegenden Mechanismen zu klären. Wir konnten zeigen, dass eine Kombination aus NVP-CGM097 und Temozolomid einen zusätzlichen Einfluss auf den Anstieg der p53 Expression in den GOT1-Zellen hat (Abbildung 19A). Somit kann die antiproliferierende Wirkung, der eingesetzten Kombination, durch die Erhöhung der p53 Expression erklärt werden. Weiterhin konnten wir keine zusätzlichen Einflüsse auf die untersuchten Signale der MDM2-p53-PUMA-p21-Rb-E2F-1-Achse, durch die verwendete Kombination, feststellen (Abbildung 19A).

Niedrige Expressionsmuster der MGMT in neuroendokrinen Tumoren korrelieren mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Temozolomid [Kulke MH. et al, Clin Cancer Res 2009; Walter T. et al, Br J Cancer 2015]. Costa B. et al konnte in seiner Arbeit an humanen Glioblastoma Zellen zeigen, dass ein synergistischer Effekt auf die Proliferation unter der Inkubation mit dem MDM2 Inhibitor ISA27 und Temozolomid auftrat [Costa B. et al, PLoS ONE 2013]. Obwohl die erhöhte Expression von p53^{wildtype} zur Downregulation von O6-methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT), in Glioblastoma Zellen führt [Bocangel D et al, Anticancer Res 2009; Hermisson M. et al, J Neurochem 2006; Natsume A. et al, Cancer Res 2005 und Chemother Pharmacol 2008], kommt es zu einem verbesserten Ansprechen der Zellen auf Temozolomid [Kim SS. et al, ACS Nano 2014; Miao W. et al, Mol Med Rep 2015]. Deshalb wurde untersucht, ob es zusätzliche Effekte in der Kombination von NVP-CGM097 und Temozolomid auf diese Zellen gibt, jedoch konnte bei allen drei untersuchten Zelllinien keine MGMT Expression unter Normalbedingungen detektiert werden (Abbildung 14).

Abbildung 19A

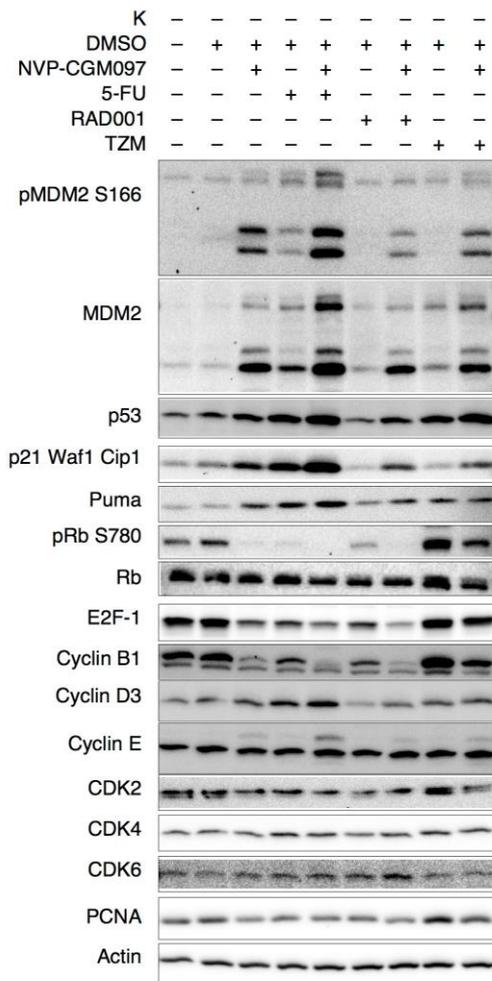


Abbildung 19B

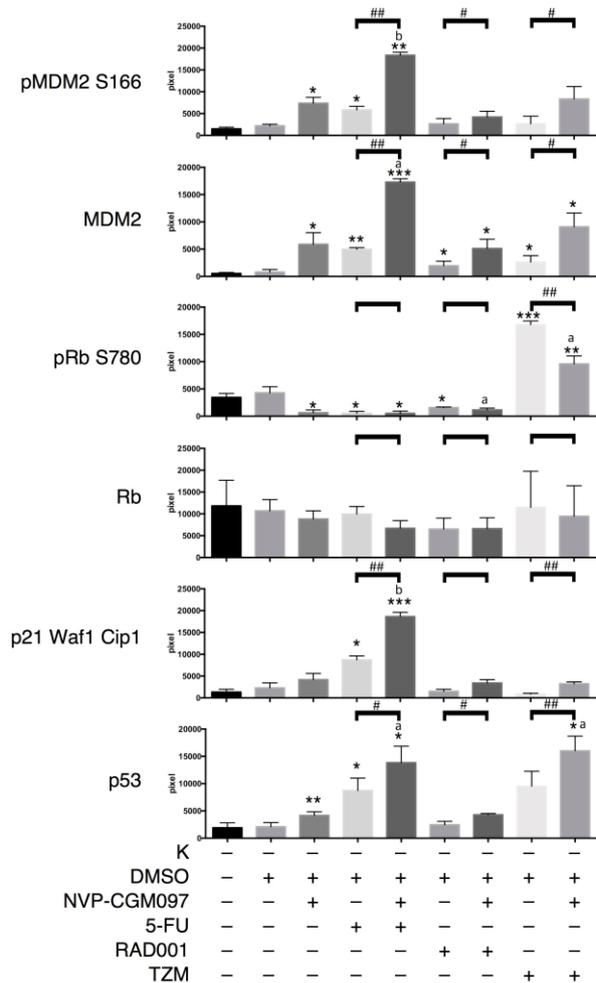


Abbildung 19 - A - B:

A: Western Blot Analyse der Proteine pMDM2, MDM2, p53, p21, PUMA, E2F1, pRb, Rb, Cyclin B1, Cyclin D3, Cyclin E, CDK2, CDK4, CDK6, PCNA und β -Actin als „loading control“ in p53^{wildtype} GOT1 Zellen. Sowohl durch den MDM2 Inhibitor alleine, als auch in Kombination mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001). Hierbei handelt es sich um einen von drei repräsentativen Western Blots.

B: Zeigt das arithmetische Mittel und die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Ereignisse gegen die unbehandelte Kontrolle wurden durch statistische Analyse mit Hilfe des T-Test ermittelt und wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Statistische Analysen mit dem T-Test zeigten signifikante Ergebnisse im Vergleich Kontrolle zu NVP-CGM097. Dargestellt mit a $< 0,05$ und b $< 0,01$. Statistische Analysen mit dem T-Test zeigten signifikante Ergebnisse von 5-Fluorouracil, Temozolomid und RAD001 alleine, verglichen mit NVP-CGM097 + 5-Fluorouracil, Temozolomid und RAD001. Dargestellt mit # $< 0,05$ und ## $< 0,01$.

3.2.6 NVP-CGM097 zeigt einen Einfluss auf die Caspase-Aktivität und greift in den Zellzyklus der p53wildtype GOT1-Tumorzellen ein.

Eine dosisabhängige Caspase 3/7 Aktivität im Caspase-Assay (Abbildung 20A) und eine Zunahme der sub-G1 Phase in der FACS-Analyse (Abbildung 20B) konnte bei der Behandlung der GOT1-Zellen mit NVP-CGM097 für 72h beobachtet werden, obwohl keine Parp-Spaltung zu sehen war (Abbildung 20C).

Gleichzeitig konnte der Einfluss von NVP-CGM097 auf den Zellzyklus gezeigt werden, da es unter der Behandlung zu einer Erniedrigung des Checkpoint Regulator Chk1, des Zellzyklusproteins CDK1 (cdc2) und dessen dazugehörigen Cyclin B1, bei gleichzeitig Anstieg des Cyclin D3, kommt (Abbildung 21). Einen additiven Einfluss des Somatostatin-Analoga Octreotid auf den Zellzyklus der GOT1-Zellen, konnte in unserem Versuchsaufbau nicht gezeigt werden (Abbildung 21).

Desweiteren zeigte CGM097 keinerlei Auswirkungen auf die weiter untersuchten Proteine pAkt / Akt, pmTOR / mTOR, p4EBP1 / 4EBP1, pErk1/2 / ERK1/2, pAMPK / AMPK, pCREB / CREB (Abbildung 22A und B).

Die beiden Effekte der Apoptoseinduktion und der Veränderung in der Zellzykluskontrolle, tragen jeweils zum antiproliferativen Effekt von NVP-CGM097 bei.

Abbildung 20A

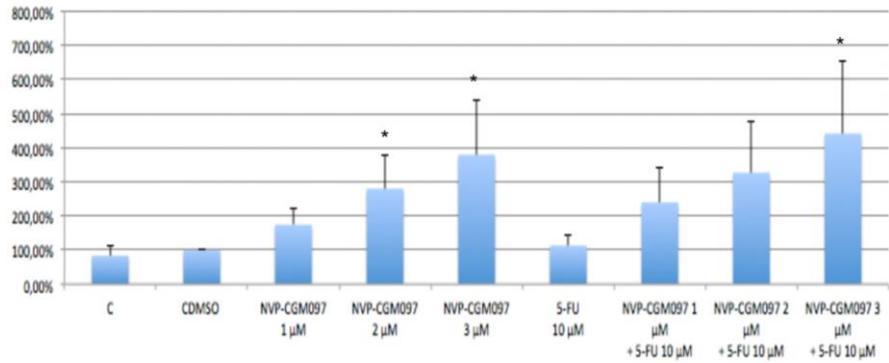
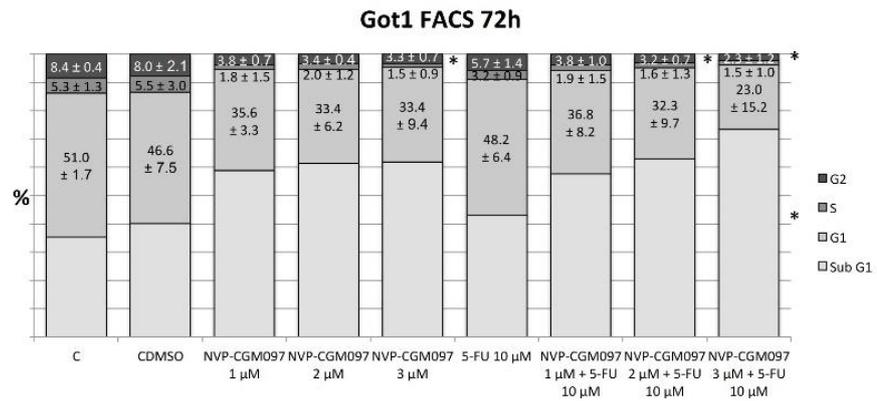


Abbildung 20B



Got1 SubG1 72h

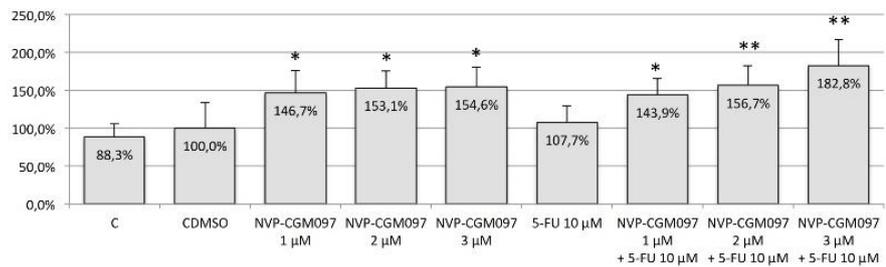


Abbildung 20C

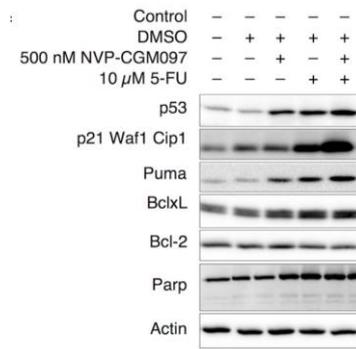


Abbildung 20 - A-C: Caspase 3/7-Assay (A) und Zellzyklus Analyse durch FACS (B) in $p53^{wildtype}$ GOT1-Zellen während der Inkubation mit NVP-CGM097 für 72 h alleine und in Kombination mit 5-Fluorouracil. Das arithmetische Mittel und die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen wurden bestimmt. Signifikante Ereignisse gegen die unbehandelte Kontrolle wurden durch statistische Analyse mit Hilfe des T-Test ermittelt und wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Mittels Western-Blot wurden die Apoptosis abhängigen Proteine bestimmt (C). $p53^{wildtype}$ GOT1-Zellen wurden für 48 h mit NVP-CGM097 alleine und in Kombination mit 5-Fluorouracil behandelt.

Einer von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt.

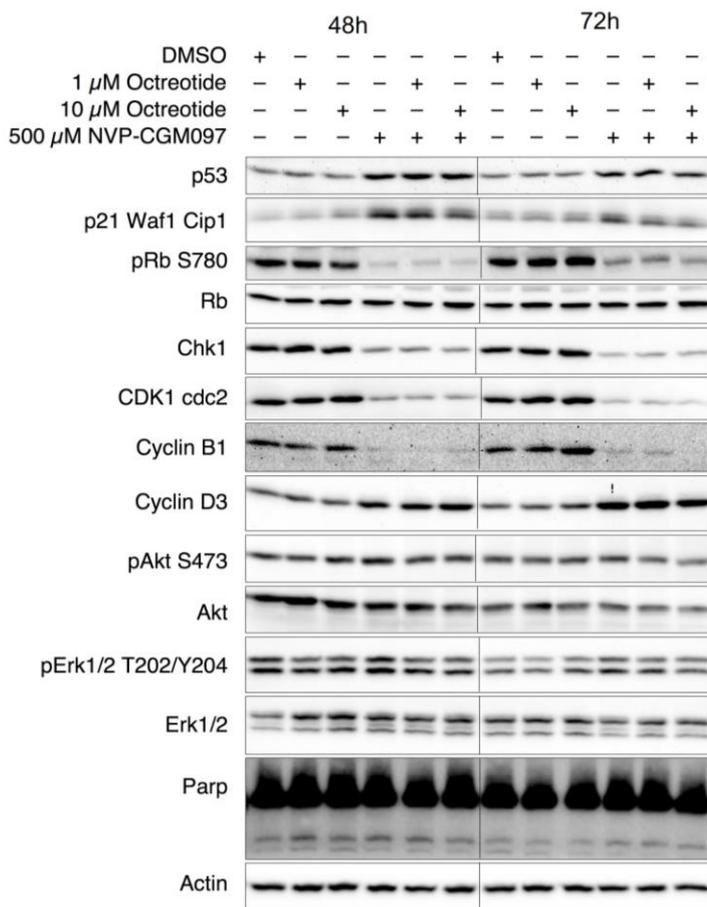


Abbildung 21 -: Western Blot Analyse der Proteine p53, p21, pRb, Rb, CDK1, Cyclin B1, Cyclin D3, pAkt, Akt, pErk1/2, Erk1/2, Parp und β -Actin als „loading control“ in p53wildtype GOT1 Zellen. Behandelt wurden die Zellen mit NVP-CGM097 (500nM) alleine sowie mit Octreotid (1 μ m; 10 μ m) für 48h und 72h.

Hierbei handelt es sich um einen von drei repräsentativen Western Blots.

Abbildung 22A

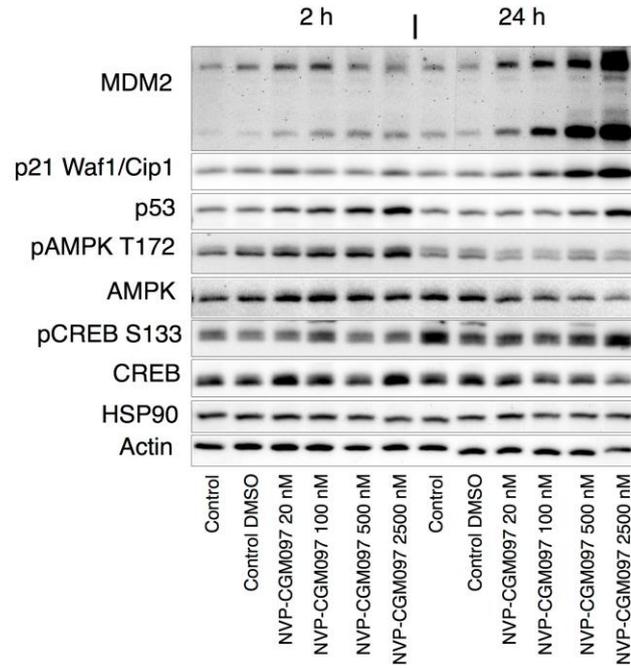


Abbildung 22B

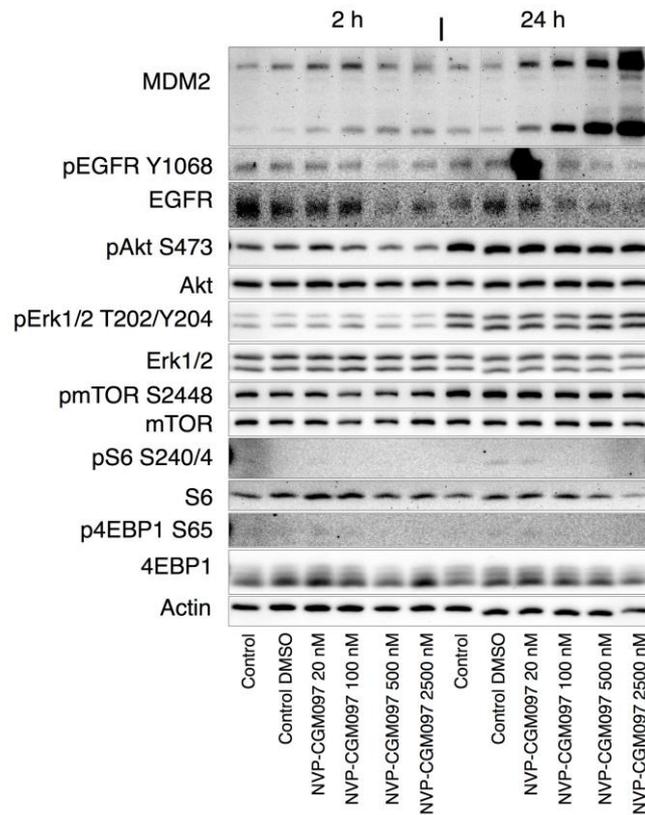


Abbildung 22 - A - B: Western Blot Analyse der Proteine p53, p21, pMDM2, MDM2, pAMPK, AMPK, pCREB, CREB, HSP90, pEGFR, EGFR, pAkt, Akt, pErk1/2, Erk1/2, pmTor, mTor, pS6, S6, p4EBP1, 4EBP1 und β -Actin als "loading control" während der Inkubation mit CGM097 für 2 und 24 Stunden.

Jeweils einer von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt.

4 Diskussion

4.1 Teil I

Der Hepatocyte Growth Factor - (HGF) c-Met-Signalweg als „target“ in humanen neuroendokrinen Tumorzellen in vitro

Für fortgeschrittene neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems und der Lunge sind verschiedene systemische Therapieansätze zur Symptom- und Tumorkontrolle in der palliativen Situation etabliert. Aufgrund des zunehmenden Verständnisses der molekularen Mechanismen der Tumorbilogie [Scarpa A. et al, Erratum in: Nature. 2017; Aristizabal Prada ET. & Auernhammer CJ]. et al, Endocr Connect. 2018; Auernhammer CJ]. et al; Lancet Diabetes Endocrinol. 2017] ist man heutzutage bemüht, neue molekular zielgerichtete Therapieoptionen zu entwickeln.

Begründet durch Weinstein IB, beinhaltet die „onkogene Addiktionstheorie“, dass Tumorzellen zum Überleben auf onkogene Signalwege angewiesen sind. Häufig reagieren sie auf die Inhibierung von Schlüsselpositionen dieser Signalwege sehr empfindlich [Weinstein IB. et al, Cancer Res 2008]. Aufgrund dieser Theorie, ist die derartige, selektive Blockade onkogener Signalwege sinnvoll. Die HGF-c-Met-Signal-Achse ist ein typisches Beispiel für einen Überlebenssignalweg, der mit der Tumorbilogie vieler Neoplasien in Verbindung gebracht wird. So wurden sogenannte „small-molecule“-Inhibitoren entwickelt, um die konstitutiv aktivierten Signalwege, molekular zielgerichtet zu blockieren.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden ob die alleinige c-Met Inhibition, einen ausreichenden Effekt auf das Zellwachstum und die Migration von neuroendokrinen Tumoren in vitro hat, sowie herauszufinden welche Rolle die HGF/c-Met Achse in NET spielt. Deshalb wurden die Effekte der Multityrosinkinase Inhibitoren Cabozantinib und Tivantinib, im Vergleich zu dem hoch spezifischen c-Met Inhibitor INC280, an humanen neuroendokrinen Tumorzellen in vitro untersucht.

Die untersuchten Zelllinien Bon1, NCI-H727 und GOT1 wiesen unter neutralen Bedingungen eine c-Met Expression auf (Abbildung 5A). Aufgrund der Verwendung von rhHGF, konnte eine Stimulation von phospho-c-Met gezeigt werden und somit die Funktionalität des c-Met in den Zellen bewiesen werden (Abbildung 5A). Die Phosphorylierung von c-Met sowie die Stimulation der Signalwege von Akt und ERK durch rhHGF, konnte durch den Einsatz von INC280 aufgehoben werden (Abbildung 5A).

Die Expression von c-Met in neuroendokrinen Tumoren könnte sich als geeignetes Ziel für die Therapie herausstellen [De Dosso S. et al, Cancer Metastasis Rev. 2013; Modali SD. et al, Mol Endocrinol 2015]. In der Arbeit von Hansel DE. et al, wurden bei 39 pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien eine Proteinexpressionsanalyse durchgeführt [Hansel DE. et al, Clin Cancer Res 2004]. So konnte in 17 % der lokalisierten und in 33 – 56 % der metastasierten NET eine Überexpression von c-Met gezeigt werden [Hansel DE. et al, Clin Cancer Res 2004]. In den Microarray-Analysen von Bon1 Zellen wurden 2503 Gene untersucht unter denen 101 HGF empfindliche Gene festgestellt wurden, die mutmaßliche onkologische Funktionen wie Zellproliferation, Apoptosis oder Zelladhäsion fördern [Hofslie E. et al, Br J Cancer 2005]. In einer weiteren Arbeit wurde bei 10 untersuchten Gastrinomen, die Expression des c-Met-Rezeptors in 90 % der Fälle festgestellt. Eine gleichzeitig durchgeführte PCR an 38 Gastrinomen konnte bei 14 % eine Überexprimierung der c-Met, im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe, festgestellt werden. Die Überexprimierung der c-Met steht in Korrelation mit einer schlechten Prognose bei Gastrinomen [Peghini PL. et al, Clin Cancer Res 2002]. Eine ausgeprägte Immunfärbung auf c-Met wurde zu 100 % bei 17 NET des Ileums und zu 32 % bei nicht aus dem Ileum stammenden Tumoren gesehen [Azzoni C. et al, Virchows Arch 2011]. Eine hohe c-Met Expression wurde in bronchopulmonalen Neuroendokrinen Neoplasien des typischen Karzinoid-Typs zu 66 % gefunden. Beim atypischen Karzinoid-Typ waren es 67 %, beim SCLC 50 % und beim LCNEC 55 %. Ein erhöhter Level an phospho-c-Met wurde bei den typischen Karzinoiden (50 %), atypischen Karzinoiden (67 %), SCLC (68 %) und LCNEC (36 %) beobachtet [Song J. et al, Arch Pathol Lab Med. 2010]. Mutationen von c-Met sind bei den bronchopulmonalen Neoplasien eher selten und mit 6,5 % bei SCLC und 8,3 % bei den NET beschrieben. Diese Mutationen sind für den vorhandenen Phosphorylationsstatus von c-Met nicht relevant [Voortman J. et al, Curr Pharm Des 2013]. Die HGF Serumspiegel von Patienten mit Bronchopulmonalen Tumoren waren signifikant höher als unter natürlichen Bedingungen [Telega A. et al, Endokrynol Pol 2012].

Unsere Daten konnten zeigen, dass INC280, Cabozantinib und Tivantinib die Phosphorylierung von c-Met unterdrücken können. Bei äquimolaren Konzentrationen, ist INC280 der potenteste c-Met Inhibitor, verglichen mit den beiden anderen multi-TKIs (Abbildung 8). Ähnlich zu unseren Daten, wurde auch in der epithelialen Sacroma Zelllinie eine Inhibition der Phosphorylierung von c-Met mit 1 nmol/L für INC280 beschrieben [Imura Y. et al, Mol Cancer 2014].

Diese Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Effektivität der untersuchten Substanzen spiegeln sich auch in der Literatur wieder. In der Literatur, zeigt INC280 eine 10-fach höhere Effektivität, verglichen mit Cabozantinib, und eine 100 bis 1000-fache höhere Effektivität, verglichen mit Tivantinib, bei der Inhibition der c-Met Phosphorylierung *in vitro*. So ist für INC280 in einem Kinase-Assay eine IC₅₀ von 0.13 nmol/L gegenüber c-Met beschrieben worden und für die Phosphorylierung der c-Met in den Zellen eine IC₅₀ von 0.3-1.1 nmol/L (*in vitro*) beschrieben worden [Liu X. et al, Clin Cancer Ther. 2011]. Cabozantinib wurde mit einer IC₅₀ von 1.3 nmol/L, in einem Kinase-Assay beschrieben [Yakes FM. et al, Mol Cancer Ther 2011]. Im Kinase-Assay von Tivantinib konnte die K_i (kalkulatorische inhibitorische Konstante) von 355 nmol/L beschrieben und eine IC₅₀ der c-Met Phosphorylierung in den Zellen (*in vitro*) von 100 bis 300 nmol/L gezeigt werden [Munshi N. et al, Mol Cancer Ther 2010].

Ein Einfluss auf die untersuchten Parameter Zellviabilität, -proliferation und Zellmigration / Zellzyklus konnte jeweils nur unter der Inkubation mit Cabozantinib und Tivantinib gezeigt werden (Abbildungen 6A-C, 10 A-D und 12A-D), jedoch nicht unter dem hoch spezifischen c-Met Inhibitor INC280. Somit legen unsere *in vitro* Daten nahe, dass die alleinige c-Met Inhibition keinen ausreichenden antitumoralen oder migrationshemmenden Effekt in NET ausübt. Im Gegensatz dazu zeigten die verwendeten Multityrosinkinase-Inhibitoren Cabozantinib und Tivantinib vielversprechende Effekte auf die Proliferation und Migration in den Tumorzellen. Höchstwahrscheinlich werden jedoch diese Effekte über „off-target“ Effekte vermittelt und nicht über die c-Met Inhibition.

Im neuroendokrinen, pankreatischen Rip-Tag2 Maus Model konnte Cabozantinib, im Vergleich zu Substanzen die alleine gegen VEGF gerichtet sind, einen überlegenen Effekt auf die Angiogenese, Invasivität und Metastasenhemmung in den Tumorzellen zeigen [You WK. Et al, Cancer Res 2011; Sennino B et al, Cancer Discov 2012]. Weitere Untersuchungen im Rip-Tag2 Mausmodell zeigten zusätzliche antitumorale Effekte, die auf die Kombination von Anti-VEGF Antikörpern oder Sunitinib mit dem c-Met Inhibitor PF-04217903 zurückzuführen sind. Der antitumorale Einfluss von Cabozantinib in diesem Mausmodell wird Aufgrund der simultanen Inhibition von VEGF und c-Met beschrieben [You WK. Et al, Cancer Res 2011; Sennino B et al, Cancer Discov 2012]. Diese Studien konnten jedoch nicht die Effektivität der c-Met Inhibition der Multityrosinkinase Cabozantinib als antitumoralen Effekt beweisen. Unsere Daten legen nahe, dass die alleinige c-Met Inhibition nicht ausreicht um einen antitumoralen oder migrationshemmenden Effekt in unstimulierten neuroendokrinen Tumorzellen zu erreichen.

Dennoch ist eine c-Met Inhibition in NET mit kompensatorischer Hochregulation der phospho-c-Met ein spezifisches Target für eine antitumorale Therapie [Sennino B et al, Cancer Discov 2012]. INC280 konnte in pankreatischen Krebszellen das durch HGF induzierte Zellwachstum und die Migration inhibieren, während es keinen Einfluss auf diese Parameter hatte, wenn die Zellen nicht durch HGF stimuliert waren [Brandes F. et al, BMC Cancer 2015]. Einen G1-Arrest konnte Cabozantinib in den phospho-c-Met überexprimierenden MHCC97L und MHCC97H Zellen induzieren (IC₅₀ Level für die Inhibition des Zellwachstums 9-13nmol/L), während ein G2-Arrest (IC₅₀ Level für die Inhibition des Zellwachstums 4300-5000 nmol/L) in den Zelllinien ohne phospho-c-Met Überexpression (HepG2 und SK-HEP1) beobachtet wurde [Xiang Q. et al, BMC Cancer 2015]. Somit zeigen diese Ergebnisse, unterschiedliche c-Met abhängige, als auch c-Met unabhängige Einflüsse von Cabozantinib auf den Zellzyklus von Tumorzellen.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen in neuroendokrinen Zelllinien, wurde Tivantinib in der Literatur, ein antitumoraler Effekt zugeschrieben, der jedoch nicht auf die c-Met Inhibition zurückzuführen ist, sondern als „off target“ beschrieben wird [Calles A. et al, Mol Oncol. 2013; Zhou Y et al, Mol Cancer Ther. 2014; Katayama R. et al, Cancer Res 2013, Basilico C. et al, Clin Cancer Res 2013]. Die in Schilddrüsenkarzinomzellen, durch den Einsatz von spezifischer siRNA erreichte Suppression der c-Met Expression hatte keinen Einfluss auf den Zellzyklus oder die Apoptose der Zellen. Auch zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der c-Met Inhibition von Crizotinib und Tivantinib und der antitumoralen Wirksamkeit in den untersuchten Schilddrüsenkarzinomzellen [Zhou Y et al, Mol Cancer Ther. 2014]. Für Tivantinib konnte in verschiedenen Tumorarten gezeigt werden, dass es in ähnlicher Weise sowohl c-Met abhängig als auch c-

Met unabhängige Zellen inhibieren kann [Katayama R. et al, Cancer Res 2013, Basilico c. et al, Clin Cancer Res 2013]. Bei Tivantinib deuten eher alternative Mechanismen, wie die Hemmung von GSK3 α und GSK3 β oder Inhibition der Ausbildung von Mikrotubuli, auf den antitumoralen Effekt hin [Katayama R. et al, Cancer Res 2013, Basilico c. et al, Clin Cancer Res 2013; Munshi N. et al, Mol Cancer Ther 2010; Imura Y. et al, Mol Cancer 2014]. Im Gegensatz zu anderen c-Met Inhibitoren wie Crizotinib und PHA-665752 die einen G1-Arrest vermitteln [Katayama R. et al, Cancer Res 2013], verursacht Tivantinib einen G2-Arrest in den Zellen [Calles A. et al, Mol Oncol. 2013; Zhou Y et al, Mol Cancer Ther. 2014; Basilico c. et al, Clin Cancer Res 2013].

In der hier vorgelegten Arbeit konnten späte Effekte in den neuroendokrinen Tumorzelllinien für die Inhibition der Expression der Proteine pEGFR, pAktS473, p4EBP1S65 und Cyclin D1 (Abbildung 9A-B und 11A-B) beobachtet werden. Zudem führte die Behandlung der beiden Zelllinien mit Cabozantinib zu einer Phosphorylierung von pGSK3 S21/9 nach 72 Stunden (Abbildung 9A-B). Eher gering wird der Proliferationsmarker PCNA unter Cabozantinib und Tivantinib unterdrückt, jedoch vermitteln beide Substanzen einen erheblichen G2 Zellzyklus Arrest in den untersuchten Zelllinien (Abbildung 10A-D und 11 A-B). So zeigen diese Ergebnisse, dass beide RTKs die Tumorzellviabilität hauptsächlich über die Unterdrückung der Proliferation der Zellen reduzieren. Dieser Effekt scheint über die Inhibition von pAkt und seinem nachgeordneten Signalweg und durch Phosphorylierung und der damit verbundenen Inhibition von GSK3 vermittelt. In der Literatur wird die Inhibition des Signalweges über Akt und MAPK in verschiedenen Tumorarten als antitumorale Wirksamkeit für c-Met Inhibitoren beschrieben [Blumenschein GR Jr. Et al, J Clin Oncol 2012; Parikh RA. et al, Cancer Targets Ther 2014; Xiang Q. et al, Clin Cancer Res 2014]. Der Akt/mTOR Signalweg ist ein bewährtes Target zur Behandlung von Neuroendokrinen Tumoren [Zitzmann K. et al, Endocr Relat Cancer 2012; Zitzmann K. et al, Cancer Lett 2012].

In der hier vorgelegten Arbeit konnte in Bon1 und NCI-H727 Zellen ein G2 Zellzyklus Arrest unter Cabozantinib und Tivantinib gezeigt werden (Abbildung 10A-D). Dieser Effekt wurde auch in anderen Tumorarten in vitro für die beiden Substanzen beschrieben [Calles A. et al, Mol Oncol. 2013; Zhou Y et al, Mol Cancer Ther. 2014; Katayama R. et al, Cancer Res 2013, Basilico c. et al, Clin Cancer Res 2013, Yakes FM. et al, Mol Cancer Ther 2011]. Die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung des G2 Zellzyklus Checkpoint Regulators Chk1, führt ausschließlich zur Phosphorylierung und Inaktivierung der Phosphatase CDC25. Durch die Inaktivierung der CDC25 wird die Dephosphorylierung von CDK1 im CyclinB / CDK1 komplex verhindert, und somit wird final die Einleitung der Mitose inhibiert [Thompson R. et al, Br J Clin Pharmacol 2013]. Die beiden Zelllinien Bon1 und NCI-H727 zeigten unterschiedliche Effekte durch die Behandlung mit Cabozantinib und Tivantinib auf Chk1, welche auf Zelltypus-spezifische Mechanismen zurückzuführen waren (Abbildung 11 A-B). Deshalb sind weitere Studien nötig um den Mechanismus des G2-Arrests durch Cabozantinib und Tivantinib in neuroendokrinen Tumorzellen zu verstehen.

Die hier vorgelegte Studie konnte eindeutig zeigen, dass in NET die reine c-Met Inhibition nicht ausreicht, um antiproliferative und migrationshemmende Eigenschaften in vitro auszuüben. Die untersuchten Tumorzelllinien zeigten keine Abhängigkeiten von c-Met für Zellwachstum, -überleben und -migration. Aufgrund dieser in vitro Daten, scheint eine Monotherapie mit hoch spezifischen c-Met Inhibitoren in Neuroendokrinen Tumorzellen kein vielversprechendes Target zu sein. Jedoch konnten ausgeprägte Effekte auf die Zellproliferation und die Zellmigration durch die verwendeten TKIs Cabozantinib und Tivantinib beobachtet werden. So zeigen die hier vorgelegten in vitro Daten, dass Cabozantinib und Tivantinib ihre Wirkungen ausschließlich über „off-target“ Effekte, neben der c-Met Inhibition, ausüben. Diese Ergebnisse können für die zukünftige Auswahl von Multi-TKIs für die Behandlung von NET große Bedeutung haben.

Die alleinige c-Met Inhibition ist nicht ausreichend um einen antitumoralen Effekt in unstimulierten NET zu vermitteln. Synergistische Effekte der c-Met Inhibition mit anderen gleichzeitig inhibierten Signalkaskaden können durch unsere Daten nicht ausgeschlossen werden. Wie oben beschrieben, kann die Inhibition von c-Met einen antitumoralen und migrationshemmenden Effekt in Zellarten mit kompensatorischer phospho-c-Met Hochregulation ausüben [Aoyama A. et al, Mol Cancer Ther. 2014; Sennino B. et al, Cancer Discov 2012]. Resistenzen gegen die EGFR Inhibition oder gegen die Anti-VEGF-Therapie konnten in verschiedenen Tumorarten durch die kompensatorische Hochregulation der phosphorylierten c-Met gezeigt werden. In der Literatur wird die c-Met Inhibition in Kombination als potentielles Target bei vielen verschiedenen Tumorarten beschrieben, um die über c-Met vermittelte Resistenz gegenüber Anti-EGFR [Rensing Rix LL. et al, ACS chem Biol 2014; Bardelli A. et al, Cancer Discov 2013; Castoldi R. et al, Oncogene 2013; Jun HJ. et

al, Stem Cells 2014; Karamouzis MV. et al, Lancet Oncol 2009; Luraghi P. et al, Cancer Res 2014; Xu H. et al, Clin Cancer Res 2011] und Anti-VEGF [M Carty JH. et al, Clin Cancer Res 2013; Jahangiri A. et al, Clin Cancer Res 2013; Shojaei F. et al, Cancer Res 2010; Shojaei F. et al, Cancer Lett 2012] Therapien zu überwinden. Dieser Mechanismus wurde auch bei Neuroendokrinen Tumoren in der Literatur diskutiert [Oberge K. et al Clin Cancer Res 2013; De Dosso S. et al, Cancer Metastasis Rev 2013; You WK. et al, Cancer Res. 2011; Sennino B. et al, Cancer Res 2013; Sennino B. et al, Cancer Discov 2012]. Weitere Kombination mit dem hoch spezifischen c-Met Inhibitor INC280 sind in weiterführenden Studien an neuroendokrinen Xenograftmodellen nötig um diese Frage zu beantworten. Der Multityrosinkinase Inhibitor Cabozantinib zeigte in der hier vorgelegten Arbeit signifikante antitumorale Effekte auf neuroendokrine Tumorzellen in vitro. Cabozantinib zeigte mittlerweile auch in einer aktuellen Phase 2 Studie (NCT01466036) vielversprechende Effekte bei Patienten mit progredienten Carcinoiden oder neuroendokrinen Tumoren des Pankreas mit einem Progression Free Survival von jeweils 31,4 Monaten und 21,8 Monaten (Chan JA et al. Phase II trial of Cabozantinib in patients with carcinoid and pancreatic neuroendocrine tumors pNET. Journal of Clinical Oncology 35, no. 4_suppl (February 1 2017) 228-228. DOI: 10.1200/JCO.2017.35.4_suppl. 228). Eine klinische Phase 3 Studie mit Cabozantinib bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren folgt (NCT03375320).

4.2 Teil II

Wiederherstellung der wildtyp-p53 Funktion in GEP-NET-Zellen durch MDM2 -Inhibition

Durch die Regelung des Zellzyklus und der Apoptose spielt der Tumorsuppressor p53 eine Schlüsselrolle in der Tumorkontrolle.

Ein Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53 wurde bei vielen Tumorarten beobachtet. Dieser Funktionsverlust wird häufig durch eine inaktivierende Mutation des TP53 Gens oder durch einen gesteigerten Abbau des Proteins p53 erreicht. Durch eine natürliche Feedbackschleife wird p53 durch die E3 Ubiquitin Ligase „murine double minute 2“ (MDM2) an einer übermäßigen Expression gehindert. MDM2 bindet an p53 und führt so zu einem Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau des entstandenen MDM2-p53 Proteinkomplex [Brown CJ et al, Trends Pharmacol Sci 2011]. Inhibition von MDM2 durch kleine Moleküle und die daraus resultierende Reaktivierung von p53 ist somit eine vielversprechende neue Therapiestrategie in der Onkologie [Brown CJ et al, Trends Pharmacol Sci 2011; Li Q & Lozano G et al, Clin Cancer Res 2013; Zak K et al, Expert Opin Ther Pat 2013; Burgess A. et al, Front Oncol 2016]. Tabelle 12 zeigt verschiedene MDM2-Inhibitoren die sich in klinischen Phase-1-Studien befinden - unter anderem der in der vorliegenden Arbeit verwendete Inhibitor NVP-CGM097 [Brown CJ et al, Trends Pharmacol Sci 2011; Li Q & Lozano G et al, Clin Cancer Res 2013; Zak K et al, Expert Opin Ther Pat 2013; Burgess A. et al, Front Oncol 2016, Jeay S. et al, Elife 2015].

Substanz	Clinical trial number https://clinicaltrials.gov/	Firma
AMG 232	NCT02016729, NCT01723020, NCT02110355	Amgen
NVP-CGM097	NCT01760525	Novartis
HDM201	NCT02143635, NCT02343172	Novartis
RO5045337	NCT01605526, NCT01143740, NCT01164033, NCT01677780, NCT00559533, NCT01635296, NCT00623870	Hoffmann-La Roche
RO5503781	NCT01773408, NCT01462175	Hoffmann-La Roche
RO6839921	NCT02098967	Hoffmann-La Roche
SAR405838	NCT01636479, NCT01985191	Sanofi
DS-3032b	NCT02579824, NCT01877382, NCT02319369	Daichi Sankyo Inc.
MK-8242	NCT01463696, NCT01451437	Merck Sharp & Dohme Corp.

Tabelle 12 - MDM2-Inhibitoren in klinischen Studien

NVP-CGM097 (Novartis) ist einer der neuen MDM2 Inhibitoren, die unter die Kategorie der „small molecule“ Inhibitoren fallen, [Jeay S. et al, Elife 2015; Valat T. et al, Cancer Res 2014; Masuya K. et al, Cancer Res 2014]. NVP-CGM097 bindet mit einer Bindungsaffinität von K_i 1.3 nM an das menschliches MDM2 [Jeay S. et al, Elife 2015]. So untersuchte Jeay S et al, weiter in seiner Arbeit an $n=113$ Zelllinien mit p53^{wildtype}

und an n= 243 Zelllinien mit p53^{mutation} die IC50 der zwei MDM2-Inhibitoren NVP-CFC218 und NVP-CGM097. Für die empfindlichen p53^{wildtype} Zelllinien wurde eine IC50 zwischen 1 und 4 µM beschrieben [Jey S. et al, Elife 2015].

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Effekte von NVP-CGM097 auf humane neuroendokrinen Tumorzelllinien untersucht. Es wurden Tumorzelllinien mit intestinalen (GOT1), pankreatischen (Bon1) und bronchopulmonalen (NCI-H727) Ursprungs untersucht. Es konnte zum ersten Mal die antiproliferativen Eigenschaften von NVP-CGM097 an p53^{wildtype} GOT1 - Zellen in vitro gezeigt werden. Desweiteren konnten additive Effekte mit 5-Fluoruracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001) in diesem präklinischen Tumormodell in vitro gezeigt werden. Dabei entsprach die IC 50 von NVP-CGM097 für GOT1 – Zellen 1,84 µM nach einer Inkubation für 144 Stunden. Somit sind die GOT1 – Zellen die bei unseren Versuchen verwendet wurden, empfindlich gegenüber einer Behandlung mit NVP-CGM097.

Im Gegensatz hierzu hatte NVP-CGM097 in Zellen mit mutiertem TP53 Gen (p53^{mutation} Bon1 Zellen und p53^{mutation} NCI-H727 Zellen) keinen antiproliferativen Effekt.

In der Arbeit von Briest & Grabowski [Briest & Grabowski et al, Cancer Treatment Reviews 2015] wurde das Ansprechen einer neuroendokrinen Tumorzelllinie (KRJ-1) mit nicht mutiertem TP53 Gen auf den MDM2 Inhibitor Nutlin-3 besprochen. Sie kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass nur Tumorzellen mit p53^{wildtype} auf eine MDM2 Inhibition ansprechen. So zeigen sich die beiden neuroendokrinen Zelllinien GOT1 und KRJ-1 als gute Modelle für weiterführende Experimente mit MDM2 Inhibitoren.

Das Vorhandensein eines funktionsfähigen p53^{wildtype} in Tumorzellen ist essentiell für ihr jeweiliges Ansprechen auf eine Behandlung mit MDM2 Inhibitoren und die dadurch vermittelte Hochregulation der Expression eines funktionsfähigen Tumorsuppressorproteins p53 in der Tumorzelle. Dies wurde in mehreren Arbeiten an zahlreichen Tumorzelllinien beschrieben [Saiki AY et al, Oncotarget 2015; Canon J et al, Molecular Cancer Therapeutics 2015]. Unsere eigenen Daten zu p53^{wildtype} GOT1 – Zellen, sowie die Daten von Briest & Grabowski [Briest & Grabowski et al, Cancer Treatment Reviews 2015] zu den p53^{wildtype} KRJ-1-Zellen, konnten entsprechend die Wichtigkeit von funktionsfähigen p53 in NET für die Behandlung mit MDM2 Inhibitoren zeigen. In unserem verwendeten in vitro Model, zeigten nur die GOT1 Zellen einen p53^{wildtype} Status. Die Sequenzierung ergab weiter, dass die Bon1 Zellen eine „stopgain“ Mutation p.R342Stop; c.1024 C>T im Exon 10 des TP53 Gen erwarben (Tabelle 13). Laut IARC-TP53-Datenbank ist diese Mutation in 92 verschiedenen Tumorarten und in 13 Fällen als Keimbahn Mutation zu finden [International Agency for Research on Cancer, IARC TP53 Database, <http://p53.iarc.fr>]. Dieses Ergebnis wurde in einer Publikation von Vandamme T et al. die das gesamte Genom der pankreatischen neuroendokrinen Bon1 und der QGP-1 Zelllinien jeweils sequenzierten bestätigt [Vandamme T et al, J Mol Endocrinol 2015]. Aufgrund der „stopgain“ Mutation p.R342Stop; c.1024 C>T im Exon 10 des TP53 Gen (Tabelle 13) weisen die Bon1-Zellen höchstwahrscheinlich ein gekürztes 50kD p53 Protein auf (Abbildung 14), da in der Literatur einige verschiedene Varianten von verkürzten P53 bekannt sind [Engelmann D. et al, Sci Signal 2014; Surget S. et al, Onco Targets Ther 2014].

Eine Einfügung im Exon 5 des TP53 Gen (ins. P 162 Tyr-Lys-Gln (TAC AAG CAG)) zeigten die untersuchten NCI-H727 Zellen (Tabelle13). Dies führt zu einem Einschub von 3 Aminosäuren in der Ablesefrequenz des TP53 Gen. Auch diese Mutation ist in der IRAC-TP53-Datenbank zu finden [International Agency for Research on Cancer, IARC TP53 Database, <http://p53.iarc.fr>; ATCC-identification number CRL-5815].

TP53	GOT1	Bon1	NCI-H727
Exon 5	ohne Befund	ohne Befund	ins p.162 Tyr-Lys-Gln (TACAAGCAG) het.
Exon 6	ohne Befund	ohne Befund	ohne Befund
Exon 7	ohne Befund	ohne Befund	ohne Befund
Exon 8	ohne Befund	ohne Befund	ohne Befund
Exon 9	ohne Befund	ohne Befund	ohne Befund
Exon 10	ohne Befund	p.R342Stop; c.1024 C>T	ohne Befund

Tabelle 13 - Festgestellte Mutationen in den drei untersuchten Zelllinien. Adaptiert nach Frau Prof. Dr. Stefanie Habner / Frau Dr. rer. nat. Sabine Herterich, Universitätsklinikum Würzburg.

So zeigte sich, dass nur die GOT1 - Zellen ein geeignetes Modell mit p53^{wildtype} zur Untersuchung der Effekte des MDM2 Inhibitor NVP-CGM097 alleine oder in Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen (Abbildungen 17A-C und 18A) darstellt. Bei Zellen die eine Mutation im TP53 Gen aufwiesen (Bon1 und NCI-H727), wird inaktives p53^{mutation} produziert, aufgrund dessen können keine antitumoralen Effekte durch NVP-CGM097 induziert werden (Abbildung 17A-C und 18B-C). Somit übt NVP-CGM097 seinen antitumorale Effekt durch seinen spezifischen Einfluss auf den MDM2-p53^{wildtype}-Komplex aus.

NET des Dünndarms und des Pankreas zeichnen sich durch eine relativ niedrige Rate (<5%) an somatischen TP53 Gen Mutationen aus [Banck MS. et al, J Clin Invest 2013; Jiao Y. et al, Science 2011]. Jedoch beherbergen sie oft einen „copy number gain“ der endogenen p53 Inhibitoren MDM2 in 20%, MDM4 in 30% oder von „wild-type p53-induzierte Phosphatase 1 (WIP1) in 51% der Fälle [Hu W et al, Genes Cancer 2010]. In neuroendokrinen Tumoren erscheint deshalb die Inhibition von MDM2 und der damit verbundene Anstieg von p53^{wildtype} ein vielversprechender Angriffspunkt für Patienten mit GEP-NET zu sein [Briest & Grabowski et al, Cancer Treatment Reviews 2015].

Western Blot Analysen der GOT1 Zellen, zeigten unter der Behandlung mit NVP-CGM097 einen deutlichen Anstieg der Proteine p53, PUMA und p21 und ein Abfall von phospho-Rb und E2F1 (Abbildung 15 und 19A). NVP-CGM097 zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Proteine pAkt / Akt, pmTOR / mTOR, p4EBP1 / 4EBP1, pErk1/2 / ERK1/2, pAMPK / AMPK, pCREB / CREB (Abbildung 22A und B). *Somit ist NVP-CGM097 ein hoch spezifischer MDM2 Inhibitor und nimmt damit Einfluss auf die MDM2 / p53 / PUMA / p21 / Rb / E2F1 Kaskade [Laine A et al, Clin Cancer Res 2014].* Die CDK-Komplexe CDK4/6-CyclinD und CDK2-Cyclin E vermitteln die Phosphorylierung von Rb [Dick FA et al, Nat rev Mol Cell Biol 2013]. In „Double knockout“ Experimenten in Men1 +/-; Cdk4 -/- Mäusen zeigte sich, dass CDK4 essentiell für die neuroendokrine Tumorentwicklung ist [Gillam MP et al, Oncogene 2015]. In einer Studie von Tang LH. et al, wurde gezeigt, dass die auf den Zellzyklus einflussnehmenden CDK4, Cyclin D1 und phospho-Rb, in neuroendokrinen Tumoren oft überexprimiert sind [Tang LH et al, Clin Cancer Res 2012]. In einem ähnlichen Versuchsmodell mit den neuroendokrinen Tumorzellen QGP1, konnte unter Einsatz des CDK4/6 Inhibitors PD 0332991 eine Inhibition des Tumorwachstums gezeigt werden [Tang LH et al, Clin Cancer Res 2012]. *Die Inhibition des Retinoblastom Proteins (Rb) in neuroendokrinen Tumoren durch die Inhibition von MDM2- oder CDK4/6 - Inhibitoren spricht für eine vielversprechende Therapieoption.*

Ein entscheidender Regulator für den MDM2-p53 Komplex spielt die „herpes virus associated ubiquitin specific protease“ (HAUSP). Sie ist ein natürlicher Antagonist des MDM2 und kann so p53 vor seinem Abbau schützen. Somit ist es HAUSP möglich p53 zu deubiquitieren und zu stabilisieren [Brooks CL et al, Oncogene 2007; Kon N et al, Oncogene 2010]. Ebenfalls wurde berichtet, dass der Proteingehalt an DAXX (death domain-associated protein 6) durch MDM2 (Ubiquitinase) und HAUSP (Deubiquitinase) wechselseitig reguliert wird [Tang J et al, Biochem Biophys Res Commun 2010], während DAXX seinerseits wiederum MDM2 reguliert [Tang J et al, Nat Cell Biol 2006]. DAXX spielt eine wichtige Rolle in der Telomerase Regulation und der Telomer-Verlängerung (DNA-Segment am Ende eines Chromosoms) [Heaphy CM et al, Science 2011; Tang M et al, J Cell Science 2015]. Mutationen im Gen von DAXX finden sich häufig in neuroendokrinen Tumoren pankreatischen Ursprungs [Jiao Y et al, Science 2011]. Der Verlust von DAXX Protein ist ein negativer Prognosemarker bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren [Marinoni I et al, Gastroenterology 2014]. Deshalb untersuchten wir die direkten Auswirkungen von NVP-CGM097 auf HAUSP und DAXX. Jedoch hatte die Behandlung aller drei Zelllinien mit dem MDM2 Inhibitor NVP-CGM097 keinen Effekt auf die Expressionslevel von HAUSP und DAXX (Abbildung 15).

Synergistische Effekte von MDM2 Inhibitoren mit anderen Targets, wurden unter anderem in Kombination mit Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR oder MEK/MAPK Wegs beschrieben [Saiki AY et al, Oncotarget 2014]. Mit der Kombination des MDM2 Inhibitors AMG 232 und den Zytostatika Cisplatin, Carboplatin, Doxorubicin oder Irinotecan konnte in einer weiteren präklinischen Studie vielversprechende antitumorale Effekte gezeigt werden. Diese Co-Inkubationen zeigten auf molekularer Ebene einen deutlichen synergistischen Anstieg des Proteins p21 [Canon J et al, Molecular Cancer Therapeutics 2015].

In der hier vorgelegten Arbeit zeigte die Behandlung der p53^{wildtype} GOT1 Zellen mit NVP-CGM097 und 5-Fluoruracil einen signifikant, erhöhten antitumoralen Effekt und einen erheblichen Einfluss auf die Zellviabilität (Abbildung 18A). Sun XX. et al berichtete, dass eine erhöhte p53 Expression aufgrund des Einflusses von 5-Fluoruracil auf die MDM2-p53 Interaktion zurückzuführen sei [Sun XX et al, Biol Chem. 2007]. Auf Proteinebene konnte bei der Co-Stimulation von NVP-CGM097 mit 5-Fluoruracil bei GOT1- Zellen additiv

eine Erhöhung der Proteine p53, PUMA und p21 und die Reduzierung von pRb und E2F-1 (Abbildung 19A) gezeigt werden. Dieser additive Effekt, auf die Zellproliferation der GOT1, ist auf den Einfluss auf die MDM2-p53-p21-Rb-E2F1 Achse zurückzuführen.

Ebenfalls konnte bei den GOT1-Zellen ein Einfluss auf die Zellviabilität, im Zusammenspiel von NVP-CGM097 und Temozolomid, beobachtet werden (Abbildung 18A). Der additive Effekt in unseren untersuchten GOT1 Zellen, kommt wahrscheinlich durch die additive Steigerung des p53^{wildtype} zustande (Abbildung 19A). Jedoch sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um diesen Mechanismus zu erklären. Ähnliche Effekte konnten in humanen Glioblastoma multiforme unter der Inkubation mit dem MDM2 Inhibitor ISA27 und Temozolomid gezeigt werden [Costa B. et al, PloS ONE 2013].

In den Proliferationsassays konnte eine additive Wirkung der Kombination von NVP-CGM097 und Everolimus (RAD001) auf GOT1-Zellen gezeigt werden (Abbildung 18A). Der inhibierende Effekt von NVP-CGM097 und Everolimus (RAD001) kann nur teilweise über den gemeinsamen Einfluss auf die phosphoRb Expression erklärt werden (Abbildung 19A). Vor Kurzen wurde berichtet, dass Rapamycin in menschlichen Brustkrebszellen die Rb Phosphorylierung absenkt [Chatterjee J. et al, Cancer Lett 2015]. Jedoch sollten noch weiterführende Versuche unternommen werden, um diesen Mechanismus genauer aufzuklären. Im Gegensatz zu unseren Daten, dass es keine Effekte von Everolimus (RAD001) auf die Proteine phosphoMDM2, MDM2, p53 oder p21 (Abbildung 19A) gibt, werden in der Literatur inhibitorische Effekte von Rapamycin auf das Protein MDM2 beschrieben [DU W. et al, PloS ONE 2013; KaoC-L. et al, Cancer Lett. 2012]. Auch die Inhibition der Isoformen Akt1 und Akt3 führt zu einem Rückgang des pMDM2 Level [Zitzmann K. et al, Endocr Relat Cancer. 2012].

Die derzeit etablierten systemischen Therapieansätze für die Behandlung von Neuroendokrinen Tumoren beinhalten die Biotherapie mit Somatostatinanaloga, die Peptid Rezeptor Radiotherapie (PRRT), die Chemotherapie (5-FU; Streptozocin; Capecitabine; Temozolomid) und molekular zielgerichtete Therapien mit dem mTORC1 Inhibitor Everolimus und dem Multityrosinkinase-Inhibitor Sunitinib. Zahlreiche neue molekular zielgerichtete Therapieansätze befinden sich derzeit in klinischer Evaluation in Phase 2 / 3 Studien bei neuroendokrinen Tumoren. Basierend auf unseren in vitro Ergebnissen sollten zukünftige präklinische und klinische Studien das Potential von MDM2 Inhibitoren bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren weiter untersuchen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten am präklinischen *in vitro* Modell humaner neuroendokriner Tumorzelllinien neue molekular zielgerichtete Therapie für neuroendokrine Tumoren evaluiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit konnte der Stellenwert der spezifischen c-Met Inhibition in neuroendokrinen Tumoren aufgezeigt werden. So zeigte sich *in vitro*, dass unter physiologischen Bedingungen eine alleinige spezifische c-Met Inhibition mit dem hochspezifischen c-Met Inhibitor INC280 nicht ausreichend erscheint, um einen antiproliferativen oder migrationshemmenden Effekt auszuüben. Jedoch zeigt der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Cabozantinib einen antiproliferativen und migrationshemmenden Effekt in neuroendokrinen Tumorzellen *in vitro*. Die Effektivität von Cabozantinib in der Therapie von Patienten mit neuroendokrinen Tumoren wurde aktuell bereits in einer Phase 2 Studie (NCT01466036) gezeigt und wird derzeit (Stand 05/2018) in einer Phase 3 Studie (NCT03375320) untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte zu der Regulation der Expression und Wirkweise des Tumorsuppressors p53 neue Erkenntnisse gewonnen werden. So zeigte sich, dass die Einflüsse des MDM2 Inhibitors NVP-CGM097 auf die MDM2-p53-PUMA-p21-Rb-E2F1-Achse die Expression eines funktionsfähigen p53^{wildtyp} voraussetzen. Die Tatsache, dass – im Gegensatz zu vielen anderen Karzinomen mit hoher Mutationslast – eine TP53 Mutation in neuroendokrinen Tumoren einen eher seltener Befund darstellt (1 bis 3 %) [Banck MS. Et al, J Clin Invest.2013; Jiao J. et al, Science 2011], belegt das enorme Potential dieser neuen Therapiemöglichkeit in GEP-NET. Die MDM2 Inhibition und die damit verbundene Reexpression von p53^{wildtyp} scheint eine vielversprechende neue Therapieoption bei NET zu sein und sollte in weiteren präklinischen Studien und nachfolgend in klinischen Studien untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

Abdel-Rahman O, Fouad M. Temozolomide-based combination for advanced neuroendocrine neoplasms: a systematic review of the literature. *Future Oncol.* 2015 Apr; 11(8):1275-90. doi: 10.2217/fon.14.302. PMID: 25832882

Ambrosini, V., Campana, D., Bodei, L., Nanni, C., Castellucci, P., Allegri, V., et al. (2010). 68Ga-DOTANOC PET/CT clinical impact in patients with neuroendocrine tumors. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(5), 669: 673. doi:10.2967/jnumed.109.071712

Aoyama A, Katayama R, Oh-Hara T, Sato S, Okuno Y, Fujita N. Tivantinib (ARQ 197) Exhibits Antitumor Activity by Directly Interacting with Tubulin and Overcomes ABC Transporter-Mediated Drug Resistance. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13(12):2978-90.

Appleman, L., Parikh, R., Wang, P., Beumer, J., & Chu, E. The potential roles of hepatocyte growth factor (HGF)-MET pathway inhibitors in cancer treatment. *OncoTargets and Therapy.* 2014; 969. doi:10.2147/OTT.S40241.

Aristizabal Prada ET, Auernhammer CJ. Targeted therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: preclinical strategies and future targets. *Endocr Connect.* 2018 Jan; 7(1): R1-R25. doi: 10.1530/EC-17-0286.

Aristizabal Prada ET, Auernhammer CJ. Targeted therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: preclinical strategies and future targets. *Endocr Connect.* 2018 Jan; 7(1): R1-R25. doi: 10.1530/EC-17-0286.

Auernhammer CJ, Göke B. Therapeutic strategies for advanced neuroendocrine carcinomas of jejunum/ileum and pancreatic origin. *Gut.* 2011 Jul;60(7):1009-21. doi: 10.1136/gut.2009.204453.

Auernhammer CJ, Reincke M. Functional diagnostics in endocrinology. *Internist (Berl).* 2018 Jan; 59(1): 38-47. doi: 10.1007/s00108-017-0360-7.

Auernhammer CJ, Spitzweg C, Angele MK, Boeck S, Grossman A, Nölting S, Ilhan H, Knösel T, Mayerle J, Reincke M, Bartenstein P. Advanced neuroendocrine tumours of the small intestine and pancreas: clinical developments, controversies, and future strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Dec 8. pii: S2213-8587(17)30401-1. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30401-1.

Azzoni C, Bottarelli L, Cecchini S, Lagrasta C, Pizzi S, D'Adda T, Tamburini E, Rindi G, Bordi C. Involvement of HER-2/neu and metastasis-related proteins in the development of ileal neuroendocrine tumors. *Virchows Arch.* 2011; 458(5):525-36.

Babu V, Paul N, Yu R. Animal models and cell lines of pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas.* 2013; 42(6):912-23.

Banck MS1, Kanwar R, Kulkarni AA, Boora GK, Metge F, Kipp BR, Zhang L, Thorland EC, Minn KT, Tentu R, Eckloff BW, Wieben ED, Wu Y, Cunningham JM, Nagorney DM, Gilbert JA, Ames MM, Beutler AS. The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors. *J Clin Invest.* 2013 Jun 3; 123(6):2502-8. doi: 10.1172/JCI67963. Epub 2013 May 15.

Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, Sartore-Bianchi A, Scala E, Cassingena A, Zecchin D, Apicella M, Migliardi G, Galimi F, Lauricella C, Zanon C, Perera T, Veronese S, Corti G, Amatu A, Gambacorta M, Diaz LA Jr, Sausen M, Velculescu VE, Comoglio P, Trusolino L, Di Nicolantonio F, Giordano S, Siena S. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2013; 3(6):658-73.

Basilico C, Pennacchietti S, Vigna E, Chiriaco C, Arena S, Bardelli A, Valdembri D, Serini G, Michieli P. Tivantinib (ARQ197) displays cytotoxic activity that is independent of its ability to bind MET. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(9):2381-92.

- Bellini MF, Cadamuro ACT, Succi M, Proença MA, Silva AE: Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:891961–13.
- Bentzien F, Zuzow M, Heald N, Gibson A, Shi Y, Goon L, Yu P, Engst S, Zhang W, Huang D, Zhao L, Vysotskaia V, Chu F, Bautista R, Cancilla B, Lamb P, Joly AH, Yakes FM. In vitro and in vivo activity of cabozantinib (XL184), an inhibitor of RET, MET, and VEGFR2, in a model of medullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2013; 23(12):1569-77.
- Berber, E., Flesher, N., & Siperstein, A. E. Laparoscopic radiofrequency ablation of neuroendocrine liver metastases. *World Journal of Surgery*. 2002; 26(8), 985-990. doi:10.1007/s00268-002-6629-5
- Bharatham, N., Bharatham, K., Shelat, A. A., & Bashford, D. Ligand binding mode prediction by docking: Mdm2/Mdmx inhibitors as a case study. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013; doi: 10.1021/ci4004656
- Blumenschein GR Jr, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2012; 30(26):3287-96.
- Bocangel D, Sengupta S, Mitra S, Bhakat KK. p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anti-cancer Res*. 2009 Oct; 29(10):3741-50.
- Bombardieri E, Ambrosini V, Aktolun C, Baum RP, Bishof-Delaloye A, Del Vecchio S, Maffioli L, Mortelmans L, Oyen W, Pepe G, Chiti A. 111In-pentetreotide scintigraphy: procedure guidelines for tumour imaging. *Oncology Committee of the EANM. Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010 Jul; 37(7):1441-8.
- Boora GK, Kanwar R, Kulkarni AA, Pleticha J, Ames M, Schroth G, et al.: Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines. *Cancer Genet* 2015 Apr 14; DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.04.002
- Brandes F, Schmidt K, Wagner C, Redekopf J, Schlitt HJ, Geissler EK, Lang SA. Targeting cMET with INC280 impairs tumour growth and improves efficacy of gemcitabine in a pancreatic cancer model. *BMC Cancer*. 2015; 15:71.
- Brazina J, Svadlenka J, Macurek L, Andera L, Hodny Z, Bartek J, Hanzlikova H. DNA damage-induced regulatory interplay between DAXX, p53, ATM kinase and Wip1 phosphatase. *Cell Cycle*. 2015; 14(3):375-87. doi: 10.4161/15384101.2014.988019.
- Briest F, Grabowski P. The p53 network as therapeutic target in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Cancer Treat Rev*. 2015 May; 41:423-430
- Briest, F., & Grabowski, P. PI3K-AKT-mTOR-Signaling and beyond: the Complex Network in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Theranostics*, 4(4), 336: 365.
- Briest F, Grass I, Christen F, Lewens F, Freitag H, Kaemmerer D, et al.: Role of MDM2 as therapeutic target in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NENs). Abstract. Proceedings of the 26th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics *European Journal of Cancer* 2014 Nov 21; 50:149–149.
- Briest F, Grass I, Sedding D, Möbs M, Christen F, Ben-ecke J, Fuchs K, Kaemmerer D, Mende S, Sängler J, Kunze A, Geisler C, Freitag H, Lewens F, Worpenberg L, Iwaszkiewicz S, Siegmund B, Walther W, Hummel M, Grabowski P. Mechanisms of targeting the MDM2-p53-FOXO1 axis in well-differentiated intestinal neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*. 2017 Sep 14. doi: 10.1159/000481506.
- Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y, Gu W. The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene*. 2007 Nov 8; 26(51):7262-6.
- Brown CJ, Cheok CF, Verma CS, Lane DP. Reactivation of p53: from peptides to small molecules. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Jan; 32(1):53-62.

- Burgess A, Chia KM, Haupt S, Thomas D, Haupt Y, Lim E: Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies. *Front Oncol* 2016; 6:7.
- Cakir M, Grossman A. The molecular pathogenesis and management of bronchial carcinoids. *Expert Opin Ther Targets*. 2011; 15(4):457-91.
- Calles A, Kwiatkowski N, Cammarata BK, Ercan D, Gray NS, Jänne PA. Tivantinib (ARQ 197) efficacy is independent of MET inhibition in non-small-cell lung cancer cell lines. *Mol Oncol*. 2015; 9(1):260-9.
- Canon J, Osgood T, Olson SH, Saiki AY, Robertson R, Yu D, Eksterowicz J, Ye Q, Jin L, Chen A, Zhou J, Cordover D, Kaufman S, Kendall R, Oliner JD, Coxon A, Radinsky R. The MDM2 Inhibitor AMG 232 Demonstrates Robust Antitumor Efficacy and Potentiates the Activity of p53-Inducing Cytotoxic Agents. *Mol Cancer Ther*. 2015 Mar; 14(3): 649-58. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0710.
- Caplin ME, Pavel M, Cwikla JB, Phan AT, Raderer M, Sedláčková E, Cadiot G, Wolin EM, Capdevila J, Wall L, Rindi G, Langley A, Martinez S, Blumberg J, Ruszniewski P; CLARINET Investigators. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2014 Jul 17; 371(3): 224-33. doi: 10.1056/NEJMoa1316158.
- Castoldi R1 Ecker V, Wiehle L, Majety M, Busl-Schuller R, Asmussen M, Nopora A, Jucknischke U, Osl F, Kobold S, Scheuer W, Venturi M, Klein C, Niederfellner G, Sustmann C. A novel bispecific EGFR/Met antibody blocks tumor-promoting phenotypic effects induced by resistance to EGFR inhibition and has potent antitumor activity. *Oncogene*. 2013; 32(50):5593-601.
- (Chan JA et al. Phase II trial of cabozantinib in patients with carcinoid and pancreatic neuroendocrine tumors pNET. *Journal of Clinical Oncology* 35, no. 4_suppl (February 1 2017) 228-228.
- Chatterjee A, Mukhopadhyay S, Tung K, Patel D, Foster DA: Rapamycin-induced G1 cell cycle arrest employs both TGF-beta and Rb pathways. *Cancer Lett* 2015; 360:134–140.
- Cives M, Ghayouri M, Morse B, Brelsford M, Black M, Rizzo A, Meeker A, Strosberg J. Analysis of potential response predictors to capecitabine/temozolomide in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Sep; 23(9): 759-67. doi: 10.1530/ERC-16-0147.
- Costa B, Bendinelli S, Gabelloni P, Da Pozzo E, Daniele S, Scatena F, Vanacore R, Campiglia P, Bertamino A, Gomez-Monterrey I, Sorrento D, Del Giudice C, Iaccarino G, Novellino E, Martini C. Human glioblastoma multiforme: p53 reactivation by a novel MDM2 inhibitor. *PLoS One*. 2013 Aug 19; 8(8): e72281.
- Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Out-comes in Patients with Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017 Oct 1; 3(10):1335-1342. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0589.
- De Dosso S, Grande E, Barriuso J, Castellano D, Tabernero J, Capdevila J. The targeted therapy revolution in neuroendocrine tumors: in search of biomarkers for patient selection and response evaluation. *Cancer Metastasis Rev*. 2013; 32(3-4):465-77.
- De Keizer, B., van Aken, M. O., Feelders, R. A., de Herder, W. W., Kam, B. L. R., van Essen, M. Hormonal crises following receptor radionuclide therapy with the radiolabeled somatostatin analogue [177Lu-DOTA0, Tyr3] octreotate. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2008; 35(4), 749-755.
- Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 May; 14(5):297-306. doi: 10.1038/nrm3567. Epub 2013 Apr 18. Review. PMID: 23594950
- Dilz L-M, Denecke T, Steffen IG, Prasad V, Weikersthal von LF, Pape U-F, et al.: Streptozocin/5-fluorouracil chemotherapy is associated with durable response in patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Cancer* 2015 Jul; 51:1253–1262.
- Dong M, Phan AT, Yao JC. New strategies for advanced neuroendocrine tumors in the era of targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr 1; 18(7):1830-6.

- Du W, Wu J, Walsh EM, Zhang Y, Chen CY, Xiao ZX. Nutlin-3 affects expression and function of retinoblastoma protein: role of retinoblastoma protein in cellular response to nutlin-3. *J Biol Chem*. 2009 Sep 25; 284(39):26315-21.
- Du W, Yi Y, Zhang H, Bergholz J, Wu J, Ying H, Zhang Y, Xiao ZX. Rapamycin inhibits IGF-1-mediated up-regulation of MDM2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *PLoS One*. 2013 Apr 30; 8(4): e63179.
- Duerr, E.-M., & Chung, D. C. Molecular genetics of neuroendocrine tumors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 21(1), 1-14.
- Elisei R, Schlumberger MJ, Müller SP, Schöffski P, Brose MS, Shah MH, Licitra L, Jarzab B, Medvedev V, Kreissl MC, Niederle B, Cohen EE, Wirth LJ, Ali H, Hessel C, Yaron Y, Ball D, Nelkin B, Sherman SI. Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2013; 31(29):3639-46.
- Engelmann D, Puetzer BM: Emerging from the shade of p53 mutants: N-terminally truncated variants of the p53 family in EMT signaling and cancer progression. *Sci Signal* 2014; 7: –re9
- Evers BM, Townsend CM Jr, Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology*. 1991; 101:303-11.
- Fine, R. L., Gulati, A. P., Krantz, B. A., Moss, R. A., Schreiberman, S., Tsushima, D. A. Capecitabine and temozolomide (CAPTEM) for metastatic, well-differentiated neuroendocrine cancers: The Pancreas Center at Columbia University experience. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013; 71(3), 663: 670.
- Frilling A, Akerström G, Falconi M, Pavel M, Ramos J, Kidd M, Modlin IM. Neuroendocrine tumor disease: an evolving landscape. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Sep 14; 19(5): R163-85.
- Gao, J., Gao, J., Qian, L., Wang, X., Wu, M., Zhang, Y. Activation of p38-MAPK by CXCL4/CXCR3 axis contributes to p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil. *Cancer Biology & Therapy*. 2014; 15(8).
- Gillam MP, Nimbalkar D, Sun L, Christov K, Ray D, Kaldis P, Liu X1, Kiyokawa H. MEN1 tumorigenesis in the pituitary and pancreatic islet requires Cdk4 but not Cdk2. *Oncogene*. 2015 Feb 12;34(7):932-8.
- Golubovskaya, V. M., & Cance, W. G. Targeting the p53 pathway. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2013; 22(4), 747-764.
- Goudarzi KM, Nistér M, Lindström MS. mTOR inhibitors blunt the p53 response to nucleolar stress by regulating RPL11 and MDM2 levels. *Cancer Biol Ther*. 2014; 15(11):1499-514.
- Gu, J., Tang, Y., Liu, Y., Guo, H., Wang, Y., Cai, L. Murine double minute 2 siRNA and wild-type p53 gene therapy enhances sensitivity of the SKOV3/DDP ovarian cancer cell line to cisplatin chemotherapy in vitro and in vivo. *Cancer Letters*. 2014; 343(2),
- Guo, X.-L., Hu, F., Zhang, S.-S., Zhao, Q.-D., Zong, C., Ye, F. Inhibition of p53 increases chemosensitivity to 5-FU in nutrient-deprived hepatocarcinoma cells by suppressing autophagy. *Cancer Letters*. 2014; 346(2), 278-284.
- Hansel DE, Rahman A, House M, Ashfaq R, Berg K, Yeo CJ, Maitra A. Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(18 Pt 1):6152-8.
- Hao, M., Lowy, A. M., Kapoor, M., Deffie, A., Liu, G., & Lozano, G. Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(46), 29380-29385.
- Harris, S. L., & Levine, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005; 24(17), 2899: 2908.

Haug, A. R., Cindea-Drimus, R., Auernhammer, C. J., Reincke, M., W., ngler, B., Uebleis, C. The role of 68Ga-DOTATATE PET/CT in suspected neuroendocrine tumors. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. 2012; 53(11), 1686-1692.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997; 387(6630), 296-299.

Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, Bettegowda C, Rodriguez FJ, Eberhart CG, Hebbar S, Offerhaus GJ, McLendon R, Rasheed BA, He Y, Yan H, Bigner DD, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Hruban RH, Maitra A, Papadopoulos N, Meeker AK. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*. 2011 Jul 22; 333(6041):425.

Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem* 2006 Feb; 96(3):766-76

Hicks RJ, Kwekkeboom DJ, Krenning E, Bodei L, Gro-zinsky-Glasberg S, Arnold R, Borbath I, Cwikla J, Toum-panakis C, Kaltsas G, Davies P, Hörsch D, Tiensuu Jan-son E, Ramage J; Antibes Consensus Conference partici-pants. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasia: Peptide Recep-tor Radionuclide Therapy with Radiolabeled Somatostatin Analogues. *Neuroendocrinology* 2017; 105(3): 295-309.doi: 10.1159/000475526

Hofsli E, Thommesen L, Yadetie F, Langaas M, Kusnierczyk W, Falkmer U, Sandvik AK, Laegreid A. Identification of novel growth factor-responsive genes in neuroendocrine gastrointestinal tumour cells. *Br J Cancer*.2005; 92(8):1506-16.

Hofving T, Arvidsson Y, Almobarak B, Inge L, Pfragner R, Persson M, Stenman G, Kristiansson E, Johanson V, Nilsson O. The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines. *Endocr Relat Cancer*.2018 Mar; 25(3): 367-380.doi: 10.1530/ERC-17-0445.

Howe JR, Cardona K, Fraker DL, Kebebew E, Untch BR, Wang YZ, Law CH, Liu EH, Kim MK, Menda Y, Morse BG, Bergsland EK, Strosberg JR, Nakakura EK, Pommier RF. The Surgical Management of Small Bow-el Neuroendocrine Tumors: Consensus Guidelines of the North American Neuroendocrine Tumor Society. *Pancreas*.2017. Jul; 46(6): 715-731.doi: 10.1097/MPA.0000000000000846.

Hu W, Feng Z, Modica I, Klimstra DS, Song L, Allen PJ, Brennan MF, Levine AJ, Tang LH. Gene Amplifications in Well-Differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors Inactivate the p53 Pathway. *Genes Cancer*. 2010 May 15;1(4):360-368.

Huang Y., Wolf, S., Beck, B., Köhler, L.-M., Khoury, K., Popowicz, G. M. Discovery of Highly Potent p53-MDM2 Antagonists and Structural Basis for Anti-Acute Myeloid Leukemia Activities. *ACS Chemical Biology*. 2014.

Imura Y, Yasui H, Outani H, Wakamatsu T, Hamada K, Nakai T, Yamada S, Myoui A, Araki N, Ueda T, Itoh K, Yoshikawa H, Naka N. Combined targeting of mTOR and c-MET signaling pathways for effective management of epithelioid sarcoma. *Mol Cancer*.2014; 13:185.

Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R. A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis. *The EMBO Journal*. 1997; 16(14), 4384-4392.

Jahangiri A, De Lay M, Miller LM, Carbonell WS, Hu YL, Lu K, Tom MW, Paquette J, Tokuyasu TA, Tsao S, Marshall R, Perry A, Bjorgan KM, Chaumeil MM, Ronen SM, Bergers G, Aghi MK. Gene expression profile identifies tyrosine kinase c-Met as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance. *Clin Cancer Res*. 2013;19(7):1773-83.

Jeay S, Gaulis S, Ferretti S, Bitter H, Ito M, Valat T, et al.: A distinct p53 target gene set predicts for response to the selective p53-HDM2 inhibitor NVP-CGM097. *Elife* 2015;4. DOI: 10.7554/eLife.06498

- Jeay S, Berghausen J, Buschmann N, Chene P, Cozens R, Erdmann D, Ferretti S, Furet P, Gabriel T, Gessier F, Graus-Porta D, Hofmann F, Holzer P, Ito M, Jacoby E, Jensen M, Kallen J, Lang M, Lisztwan J, Murakami M, Pissot-Soldermann C, Ruetz S, Rynn C, Sterker D, Stutz S, Valat T, Wiesmann M, Masuya K. Abstract 1797: Discovery of NVP-CGM097, a highly potent and optimized small molecule inhibitor of Mdm2 under evaluation in a phase I clinical trial. *Cancer Res* October 1, 2014 74; 1797; *Proceedings AACR Annual Meeting* 2014; April 5-9, 2014; San Diego, CA.
- Jin XF, Spampatti MP, Spitzweg C, Auernhammer CJ. Supportive therapy in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: Often forgotten but important. *Rev Endocr Metab Disord*. 2018 Feb 20. doi: 10.1007/s11154-018-9443-6. [Epub ahead of print] Review.
- Jiang G, Jiang AJ, Xin Y, Li LT, Cheng Q, Zheng JN. Progression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and temozolomide resistance in cancer research. *Mol Biol Rep*. 2014 Oct; 41(10):6659-65.
- Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N. DAXX/ATRAX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*. 2011 Mar 4; 331(6021):1199-203.
- Joseph k, Stapp J, Reinecke J et al (1992) Rezeptorzintigraphie bei endokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren. *Dtsch Med Wochenschr* 117: 1025-1028
- Jun HJ, Bronson RT, Charest A. Inhibition of EGFR induces a c-MET-driven stem cell population in glioblastoma. *Stem Cells*. 2014; 32(2):338-48.
- Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB. The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocr Rev*. 2004 Jun;25(3):458-511 doi: 10.1210/er.2003-0014
- Kao CL, Hsu HS, Chen HW, Cheng TH. Rapamycin increases the p53/MDM2 protein ratio and p53-dependent apoptosis by translational inhibition of mdm2 in cancer cells. *Cancer Lett*. 2009 Dec 28; 286(2):250-9.
- Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. Targeting MET as a strategy to overcome cross-talk-related resistance to EGFR inhibitors. *Lancet Oncol*. 2009; 10(7):709-17.
- Katayama R, Aoyama A, Yamori T, Qi J, Oh-hara T, Song Y, Engelman JA, Fujita N. Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition. *Cancer Res*. 2013; 73(10):3087-96.
- Kim SS, Rait A, Kim E, Pirolo KF, Nishida M, Farkas N, Dagata JA, Chang EH. A nanoparticle carrying the p53 gene targets tumors including cancer stem cells, sensitizes glioblastoma to chemotherapy and improves survival. *ACS Nano*. 2014 Jun 24;8 (6):5494-514.
- Kımlıoğlu Şahan E, Erdoğan N, Ulusoy İ, Samet E, Akyıldız İğdem A, Gönüllü D: P53, KI-67, CD117 expression in gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumours and evaluation of their correlation with clinicopathological and prognostic parameters. *Turk J Gastroenterol* 2015 Mar; 26:104–111.
- Klöppel G. Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications. *Visc Med*. 2017 Oct; 33(5): 324-330.doi: 10.1159/000481390.
- Klöppel, G. Neuroendocrine tumors: Oberndorfer's legacy. *Virchows Archiv: an International Journal of Pathology*. 2007; 451 Suppl 1, S1.
- Klöppel, 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*. 2004; 1014, 13-27.
- Klöppel, G., Rindi, G., Anlauf, M., Perren, A., & Komminoth, P. Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Archiv: International Journal of Pathology*. 2007; 451 Suppl 1, S9-27.

Kölby L, Bernhardt P, Ahlman H, Wängberg B, Johanson V, Wigander A, Forssell-Aronsson E, Karlsson S, Ahrén B, Stenman G, Nilsson O. A transplantable human carcinoid as model for somatostatin receptor-mediated and amine transporter-mediated radionuclide uptake. *Am J Pathol.* 2001;158(2):745-55.

Kon N, Kobayashi Y, Li M, Brooks CL, Ludwig T, Gu W. Inactivation of HAUSP in vivo modulates p53 function. *Oncogene.* 2010 Mar 4;29(9):1270-9.

Kulke MH, Hornick JL, Frauenhoffer C, Hooshmand S, Ryan DP, Enzinger PC, Meyerhardt JA, Clark JW, Stuart K, Fuchs CS, Redston MS. O6-methylguanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 1; 15(1):338-45.

Kulke MH, Shah MH, Benson ABI, Bergsland E, Berlin JD, Blaszkowsky LS, et al.: Neuroendocrine Tumors, Version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 2015 Jan; 13: 78–108.

Kwekkeboom, D. J., de Herder, W. W., Kam, B. L., van Eijck, C. H., van Essen, M., Kooij, P. Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177 Lu-DOTA 0, Tyr3] octreotate: toxicity, efficacy, and survival. *Journal of Clinical Oncology.* 2008; 26(13), 2124-2130.

Laine A, Westermarck J. Molecular pathways: harnessing E2F1 regulation for prosenescence therapy in p53-defective cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2014 Jul 15;20(14):3644-50.

Lee HS1, Chen M, Kim JH, Kim WH, Ahn S, Maeng K, Allegra CJ, Kaye FJ, Hochwald SN, Zajac-Kaye M. Analysis of 320 gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors identifies TS expression as independent biomarker for survival. *Int J Cancer.* 2014 Jul 1; 135(1):128-37.

Li Q, Lozano G. Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013 Jan 1; 19(1):34-41.

Liu X, Wang Q, Yang G, Marando C, Koblisch HK, Hall LM, Fridman JS, Behshad E, Wynn R, Li Y, Boer J, Diamond S, He C, Xu M, Zhuo J, Yao W, Newton RC, Scherle PA. A novel kinase inhibitor, INCB28060, blocks c-MET-dependent signaling, neoplastic activities, and cross-talk with EGFR and HER-3. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):7127-38.

Heinrich Peter C., Müller Matthias, Graeve Lutz (Hrsg.). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, ISBN 978-3-642-17972-3

Luo, H., Yount, C., Lang, H., Yang, A., Riemer, E. C., Lyons, K. Activation of p53 with Nutlin-3a radiosensitizes lung cancer cells via enhancing radiation-induced premature senescence. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2013; 81(2), 167-173.

Luraghi P, Reato G, Cipriano E, Sassi F, Orzan F, Bigatto V, De Bacco F, Menietti E, Han M, Rideout WM 3rd, Perera T, Bertotti A, Trusolino L, Comoglio PM, Boccaccio C. MET signaling in colon cancer stem-like cells blunts the therapeutic response to EGFR inhibitors. *Cancer Res.* 2014;74(6):1857-69.

MANUAL Endokrine Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. B. Göke, H. Fürst, M. Reincke, C. Auernhammer; 2013 3.Auflage. Zuckschwerdt Verlag für Medizin und Naturwissenschaften; ISBN: 978-3-86371-080-4

Marinoni I, Kurrer AS, Vassella E, Dettmer M, Rudolph T, Banz V, Hunger F, Pasquinelli S, Speel EJ, Perren A. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology.* 2014 Feb; 146(2):453-60. e5.

Masuya K, Furet P, Stutz S, Holzer P, Pissot-Soldmann C, Buschmann N. Discovery of CGM097 as a novel Mdm2 inhibitor. *Cancer Res* 2014; 74:-DDT01-01

Mayo, L. D., Dixon, J. E., Durden, D. L., Tonks, N. K., & Donner, D. B. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002; 277(7), 5484-5489.

- McCarty JH. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy: has the challenge been MET? *Clin Cancer Res.* 2013; 19(7):1631-3.
- McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Sokolosky M, Abrams SL, Montalto G, D'Assoro AB, Libra M, Nicoletti F, Maestro R, Basecke J, Rakus D, Gizak A, Demidenko ZN, Cocco L, Martelli AM, Cervello M. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget.* 2014;5(10):2881-911.
- Meyer René, Lorenza A. D'Alessandro, Sandip Kar, Bernhard Kramer, Bin She, Daniel Kaschek, Bettina Hahn, David Wrangborg, Johan Karlsson, Mats Kvarnström, Mats Jirstrand, Wolf-Dieter Lehmann, Jens Timmer, Thomas Höfer, Ursula Klingmüller. Heterogeneous kinetics of AKT signaling in individual cells are accounted for by variable protein concentration. *Front Physiol.* 2012; 3: 451
- Miao W, Liu X, Wang H, Fan Y, Lian S, Yang X, Wang X, Guo G, Li Q, Wang S. p53 upregulated modulator of apoptosis sensitizes drug-resistant U251 glioblastoma stem cells to temozolomide through enhanced apoptosis. *Mol Med Rep.* 2015 Jun; 11(6):4165-73.
- Milczarek, G. J., Martinez, J., & Bowden, G. T. p53 Phosphorylation: biochemical and functional consequences. *Life Sciences.* 1997; 60(1), 1-11.
- Mitry E, Walter T, Baudin E, Kurtz JE, Ruzsniowski P, Dominguez-Tinajero S, Bengrine-Lefevre L, Cadiot G, Dromain C, Farace F, Rougier P, Ducreux M. Bevacizumab plus capecitabine in patients with progressive advanced well-differentiated neuroendocrine tumors of the gastro-intestinal (GI-NETs) tract (BETTER trial) --a phase II non-randomised trial. *Eur J Cancer.* 2014 Dec; 50(18):3107-15.
- Modali SD, Parekh VI, Kebebew E, Agarwal SK. Epigenetic regulation of the lncRNA MEG3 and its target c-MET in pancreatic neuroendocrine tumors. *Mol Endocrinol.* 2015 Jan 7:me20141304. [Epub ahead of print]
- Munshi N, Jeay S, Li Y, Chen CR, France DS, Ashwell MA, Hill J, Moussa MM, Leggett DS, Li CJ. ARQ 197, a novel and selective inhibitor of the human c-Met receptor tyrosine kinase with antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(6):1544-53.
- Naranjo Gómez JM1, Bernal JF, Arranz PG, Fernández SL, Roman JJ. Alterations in the expression of p53, KLF4, and p21 in neuroendocrine lung tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Jul; 138(7): 936-42.
- Nasir, A., Gardner, N. M., Strosberg, J., Ahmad, N., Choi, J., Malafa, M. P. Multimodality management of a polyfunctional pancreatic endocrine carcinoma with markedly elevated serum vasoactive intestinal polypeptide and calcitonin levels. *Pancreas.* 2008; 36(3), 309-313.
- Natsume A, Ishii D, Wakabayashi T, Tsuno T, Hatano H, Mizuno M, Yoshida J. IFN-beta down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. *Cancer Res.* 2005 Sep 1; 65(17):7573-9.
- Natsume A, Wakabayashi T, Ishii D, Maruta H, Fujii M, Shimato S, Ito M, Yoshida J. A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 Apr; 61(4):653-9.
- Neeta K. Venepalli and Laura Goff: Targeting the HGF-cMET Axis in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Hepatology* 2013, Article ID 341636.
- Nenutil R, Smardova J, Pavlova S, Hanzelkova Z, Muller P, Fabian P, et al.: Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. *J Pathol* 2005 Nov; 207: 251–259.
- Nölting, S., & Grossman, A. B. Signaling Pathways in Pheochromocytomas and Paragangliomas: Prospects for Future Therapies. *Endocrine Pathology.* 2012; 23(1), 21-33.
- Oberndorfer S. Karzinoide des Dünndarms. *Frankfurter Zeitschrift für Pathologie* 1907; 1:426-429

Oberg K, Casanovas O, Castaño JP, Chung D, Delle Fave G, Denèfle P, Harris P, Khan MS, Kulke MH, Scarpa A, Tang LH, Wiedenmann B. Molecular pathogenesis of neuroendocrine tumors: implications for current and future therapeutic approaches. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(11):2842-9.

Oberg K, Hellman P, Ferolla P, Papotti M; ESMO Guidelines Working Group. Neuroendocrine bronchial and thymic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012 Oct; 23 Suppl 7: vii120-3.

Oberg K, Knigge U, Kwekkeboom D, Perren A; ESMO Guidelines Working Group. Neuroendocrine gastroentero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012 Oct; 23 Suppl 7: vii124-30.

Pape, U.-F., Berndt, U., Müller-Nordhorn J., Böhmig, M., Roll, S., Koch, M. Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocrine-Related Cancer.* 2008; 15(4), 1083-1097.

Pape, U.-F., Jann, H., Müller-Nordhorn J., Bockelbrink, A., Berndt, U., Willich, S. N. Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer.* 2008; 113(2), 256-265.

Partelli S, Bartsch DK, Capdevila J, Chen J, Knigge U, Niederle B, Nieveen van Dijkum EJM, Pape UF, Pascher A, Ramage J, Reed N, Ruszniewski P, Scoazec JY, Toumpanakis C, Kianmanesh R, Falconi M; Antibes Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines for Standard of Care in Neuroendocrine Tumours: Surgery for Small Intestinal and Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *Neuroendocrinology* 2017; 105(3): 255-265. doi: 10.1159/000464292.

Parikh RA, Wang P, Beumer JH, Chu E, Appleman LJ. The potential roles of hepatocyte growth factor (HGF)-MET pathway inhibitors in cancer treatment. *Onco Targets Ther.* 2014; 7:969-83.

Park, E. J., Choi, K. S., Yoo, Y. H., & Kwon, T. K. Nutlin-3, a small-molecule MDM2 inhibitor, sensitizes Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through p53-mediated PUMA upregulation and ROS-mediated DR5 upregulation. *Anti-Cancer Drugs.* 2013; 24(3), 260-269.

Pavel M. Translation of molecular pathways into clinical trials of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology.* 2013; 97(1):99-112

Pavel M, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Hörsch D, Winkler RE, Klimovsky J, Lebowitz D, Jehl V, Wolin EM, Oberg K, Van Cutsem E, Yao JC; RADIANT-2 Study Group. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet.* 2011; 378(9808):2005-12.

Pavel M, O'Toole D, Costa F, Capdevila J, Gross D, Kianmanesh R, Krenning E, Knigge U, Salazar R, Pape UF, Öberg K; Vienna Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site. *Neuroendocrinology* 2016; 103(2): 172-85. doi: 10.1159/000443167.

Pavel M, Valle JW, Eriksson B, Rinke A, Caplin M, Chen J, Costa F, Falkerby J, Fazio N, Gorbounova V, de Herder W, Kulke M, Lombard-Bohas C, O'Connor J, Sorbye H, Garcia-Carbonero R; Antibes Consensus Conference Participants; Antibes Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms: Systemic Therapy - Biotherapy and Novel Targeted Agents. *Neuroendocrinology* 2017 C; 105(3): 266-280. doi: 10.1159/000471880.

Peghini PL, Iwamoto M, Raffeld M, Chen YJ, Goebel SU, Serrano J, Jensen RT. Overexpression of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor receptors in a proportion of gastrinomas correlates with aggressive growth and lower curability. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2273-85.

Peruzzi, B., & Bottaro, D. P. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research.* 2006; 12(12), 3657-3660.

- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al.: Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007 Jun; 28:622–629.
- Plöckinger U, Wiedenmann B. Neuroendocrine tumores. *Best Pract res Clin Endocrinol Metabol.* 2007; 21:145-62
- Porter, J. Small molecule c-Met kinase inhibitors: a review of recent patents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2010; 20(2), 159-177.
- Qiang, W., Jin, T., Yang, Q., Liu, W., Liu, S., Ji, M. PRIMA-1 selectively induces global DNA demethylation in p53 mutant-type thyroid cancer cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2014; 10(7), 1249-1258.
- Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Hörsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruszniewski P. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med.* 2011; 364(6):501-13.
- Raymond E, García-Carbonero R, Wiedenmann B, Grande E, Pavel M. Systemic therapeutic strategies for GEP-NETS: what can we expect in the future? *Cancer Metastasis Rev.* 2014; 33(1):367-72.
- Remsing Rix LL, Kuenzi BM, Luo Y, Remily-Wood E, Kinose F, Wright G, Li J, Koomen JM, Haura EB, Lawrence HR, Rix U. GSK3 alpha and beta are new functionally relevant targets of tivantinib in lung cancer cells. *ACS Chem Biol.* 2014; 9(2):353-8.
- René Meyer, Lorenza A. D'Alessandro, Sandip Kar, Bernhard Kramer, Bin She, Daniel Kaschek, Bettina Hahn, David Wrangborg, Johan Karlsson, Mats Kvarnström, Mats Jirstrand, Wolf-Dieter Lehmann, Jens Timmer, Thomas Höfer and Ursula Klingmüller: Heterogeneous kinetics of AKT signaling in individual cells are accounted for by variable protein concentration. *Front. Physiol.* 2012
- Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SW, Somatostatin receptors in human Cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992; 43:27-35
- Rindi, G., Klöppel, G., Alhman, H., Caplin, M., Couvelard, A., de Herder, W. W. TNM staging of foregut neuroendocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv: an international journal of pathology.* 2006; Vol. 449, pp. 395-401.
- Rindi, G., Klöppel, G., Couvelard, A., Komminoth, P., Kärner, M., Lopes, J. M., et al. TNM staging of midgut and hindgut neuroendocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv: an international journal of pathology.* 2007; Vol. 451, pp. 757-762.
- Rindi, G., Villanacci, V., & Ubiali, A. Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion.* 2000;62 Suppl 1, 19-26.
- Roh, J.-L., Ko, J. H., Moon, S. J., Ryu, C. H., Choi, J. Y., & Koch, W. M. The p53-reactivating small-molecule RITA enhances cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer Letters.* 2012; 325(1), 35-41.
- Rohini Keshava, Mathivanan Jothi, Mohan L. Gope, Rajalakshmi Gope FUNCTIONAL MODULATION OF THE P53 GENE AND ITS PROTEIN IN HUMAN BRAIN TUMORS. *Annals of Neurosciences.* 2008; Vol 15, No 3.
- Romano, S., Staibano, S., Greco, A., Brunetti, A., Nappo, G., Ilardi, G. FK506 binding protein 51 positively regulates melanoma stemness and metastatic potential. *Cell Death & Disease.* 2013; 4, e578.
- Saiki AY, Caenepeel S, Cosgrove E, Su C, Boedigheimer M, Oliner JD. Identifying the determinants of response to MDM2 inhibition. *Oncotarget.* 2015 Feb 3. [Epub ahead of print] PMID: 25730903
- Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, Salvagni S, Van Laethem JL, Van Vlierberghe H, Trojan J, Kolligs FT, Weiss A, Miles S, Gasbarrini A, Lencioni M, Cicalese L, Sherman M, Gridelli C, Buggisch P,

Gerken G, Schmid RM, Boni C, Personeni N, Hassoun Z, Abbadessa G, Schwartz B, Von Roemeling R, Lamar ME, Chen Y, Porta C. Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2013; 14(1):55-63.

Scagliotti GV, Novello S, von Pawel J. The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology. *Cancer Treat Rev.* 2013; 39(7):793-801.

Scarpa A, Chang DK, Nones K. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature.* 2017 Mar 2;543(7643):65-71. doi: 10.1038/nature21063. Epub 2017 Feb 15. Erratum in: *Nature.* 2017 Sep 27;

Schmitt AM, Pavel M, Rudolph T, Dawson H, Blank A, Komminoth P, Vassella E, Perren A. Prognostic and predictive roles of MGMT protein expression and promoter methylation in sporadic pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Neuroendocrinology.* 2014; 100(1):35-44.

Schuller HM, Falzon M, Gazdar AF, Hegedus T. Cell type-specific differences in metabolic activation of N-nitrosodiethylamine by human lung cancer cell lines. *IARC Sci Publ.* 1987; (84):138-40.

Selvarajah J, Nathawat K, Moumen A, Ashcroft M, Carroll VA. Chemotherapy-mediated p53-dependent DNA damage response in clear cell renal cell carcinoma: role of the mTORC1/2 and hypoxia-inducible factor pathways. *Cell Death Dis.* 2013 Oct 17; 4: e865.

Sennino B, Ishiguro-Oonuma T, Schriver BJ, Christensen JG, McDonald DM. Inhibition of c-Met reduces lymphatic metastasis in RIP-Tag2 transgenic mice. *Cancer Res.* 2013; 73(12):3692-703.

Sennino B, Ishiguro-Oonuma T, Wei Y, Naylor RM, Williamson CW, Bhagwandin V, Tabruyn SP, You WK, Chapman HA, Christensen JG, Aftab DT, McDonald DM. Suppression of tumor invasion and metastasis by concurrent inhibition of c-Met and VEGF signaling in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Discov.* 2012; 2(3):270-287.

Sequist LV, von Pawel J, Garmey EG, Akerley WL, Brugger W, Ferrari D, Chen Y, Costa DB, Gerber DE, Orlov S, Ramlau R, Arthur S, Gorbachevsky I, Schwartz B, Schiller JH. Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29(24):3307-15.

Shojaei F, Lee JH, Simmons BH, Wong A, Esparza CO, Plumlee PA, Feng J, Stewart AE, Hu-Lowe DD, Christensen JG. HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors. *Cancer Res.* 2010; 70(24):10090-100.

Shojaei F, Simmons BH, Lee JH, Lappin PB, Christensen JG. HGF/c-Met pathway is one of the mediators of sunitinib-induced tumor cell type-dependent metastasis. *Cancer Lett.* 2012; 320(1):48-55.

Smyth EC, Sclafani F, Cunningham D. Emerging molecular targets in oncology: clinical potential of MET/hepatocyte growth-factor inhibitors. *Onco Targets Ther.* 2014; 7:1001-14.

Song J, Li M, Tretiakova M, Salgia R, Cagle PT, Husain AN. Expression patterns of PAX5, c-Met, and paxillin in neuroendocrine tumors of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(11):1702-5.

Spampatti M, Vlotides G, Spöttl G, Maurer J, Göke B, Auernhammer CJ. Aspirin inhibits cell viability and mTOR downstream signaling in gastroenteropancreatic and bronchopulmonary neuroendocrine tumor cells. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(29):10038-49.

Steinmüller, T., Kianmanesh, R., Falconi, M., Scarpa, A., Taal, B., Kwেকেboom, D. J. Consensus guidelines for the management of patients with liver metastases from digestive neuroendocrine tumors: foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology.* 2008; 87(1), 47-62.

Strosberg, J. R., Choi, J., Cantor, A. B., & Kvols, L. K. Selective hepatic artery embolization for treatment of patients with metastatic carcinoid and pancreatic endocrine tumors. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center.* 2006; 13(1), 72-78.

Sun XX, Dai MS, Lu H. 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *J Biol Chem*. 2007 Mar 16; 282(11):8052-9.

Sundin A, Arnold R, Baudin E, Cwikla JB, Eriksson B, Fanti S, Fazio N, Giammarile F, Hicks RJ, Kjaer A, Krenning E, Kwekkeboom D, Lombard-Bohas C, O'Connor JM, O'Toole D, Rockall A, Wiedenmann B, Valle JW, Vulliermé MP; Antibes Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Radiological, Nuclear Medicine & Hybrid Imaging. *Neuroendocrinology*. 2017;105(3):212-244. doi: 10.1159/000471879. Epub 2017 Mar 30.

Surget S, Khoury MP, Bourdon J-C: Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther* 2014; 7:57–67.

Takechi, T., Fujioka, A., Matsushima, E., & Fukushima, M. Enhancement of the antitumour activity of 5-fluorouracil (5-FU) by inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase activity (DPD) using 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine (CDHP) in human tumour cells. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*. 2002; 38(9), 1271-7.

Takizawa N, Ohishi Y, Hirahashi M, Takahashi S, Nakamura K, Tanaka M, et al.: Molecular characteristics of colorectal neuroendocrine carcinoma; similarities with adenocarcinoma rather than neuroendocrine tumor. *Hum Pathol* 2015 Dec; 46:1890–1900.

Tang J, Qu L, Pang M, Yang X. Daxx is reciprocally regulated by Mdm2 and Hausp. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 12;393(3):542-5.

Tang J, Qu LK, Zhang J, Wang W, Michaelson JS, Degenhardt YY, El-Deiry WS, Yang X. Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nat Cell Biol*. 2006 Aug;8(8):855-62. Epub 2006 Jul 16.

Tang LH, Contractor T, Clausen R, Klimstra DS, Du YC, Allen PJ, Brennan MF, Levine AJ, Harris CR. Attenuation of the retinoblastoma pathway in pancreatic neuroendocrine tumors due to increased cdk4/cdk6. *Clin Cancer Res*. 2012 Sep 1; 18(17):4612-20.

Tang M, Li Y, Zhang Y, Chen Y, Huang W, Wang D, Zaug AJ, Liu D, Zhao Y, Cech TR, Ma W, Songyang Z. Disease mutant analysis identifies a new function of DAXX in telomerase regulation and telomere maintenance. *J Cell Sci*. 2015 Jan 15; 128(2):331-41.

Telega A, Kos-Kudła B, Foltyn W, Blicharz-Dorniak J, Rosiek V. Selected neuroendocrine tumour markers, growth factors and their receptors in typical and atypical bronchopulmonary carcinoids. *Endokrynol Pol*. 2012; 63(6):477-82.

Thompson R, Eastman A. The cancer therapeutic potential of Chk1 inhibitors: how mechanistic studies impact on clinical trial design. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 76(3):358-69.

Trusolino, L., Bertotti, A., & Comoglio, P. M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2010; 11(12), 834-848.

Ullrich S. J., Sakaguchi K., Lees-Miller S. P., Fiscella M., Mercer W. E., Anderson C. W., & Appella E. Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90(13), 5954-5958.

Valat T, Masuya K, Baysang F, Albrecht G, Buschmann N, Erdmann D, Furet P, Gabriel T, Gessier F, Hofmann F, Holzer P, Kallen J, Pissot-Soldermann C, Stutz S, Chene P, Jeay S. Mechanistic study of NVP-CGM097: a potent, selective and species-specific inhibitor of p53-Mdm2. *Cancer Res*, 2014; 74; 1798;

van Essen, M., Krenning, E. P., Kam, B. L., de Herder, W. W., van Aken, M. O., & Kwekkeboom, D. J. Report on short-term side effects of treatments with ¹⁷⁷Lu-octreotate in combination with capecitabine in seven patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2008; 35(4), 743-748.

- Van Maerken, T., Rihani, A., Dreidax, D., De Clercq, S., Yigit, N., Marine, J.-C., et al. Functional analysis of the p53 pathway in neuroblastoma cells using the small-molecule MDM2 antagonist nutlin-3. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011; 10(6), 983-993.
- Vandamme T, Beyens M, Peeters M, Van Camp G, de Beeck KO: Next generation exome sequencing of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1 reveals different lineages. *Cancer Genet* 2015
- Vandamme T, Peeters M, Dogan F, Pauwels P, Van Assche E, Beyens M, Mortier G, Vandeweyer G, de Herder W, Van Camp G, Hofland LJ, Op de Beeck K. Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1. *J Mol Endocrinol*. 2015 Apr; 54(2):137-47.
- Vatsyayan, R., Singhal, J., Nagaprashantha, L. D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. Nutlin-3 enhances sorafenib efficacy in renal cell carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*. 2011; 52(1), 39-48.
- Venepalli, N. K., & Goff, L. Targeting the HGF-cMET Axis in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Hepatology*. 2013; 2013(2), 1-11.
- Villalonga-Planells, R., Coll-Mulet, L., Martínez-Soler, F., Castaño, E., Acebes, J.-J., Giménez-Bonaf, P. Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme. *PLoS One*. 2011; 6(4), e18588.
- Voortman J, Harada T, Chang RP, Killian JK, Suuriniemi M, Smith WI, Meltzer PS, Lucchi M, Wang Y, Giaccone G. Detection and therapeutic implications of c-Met mutations in small cell lung cancer and neuroendocrine tumors. *Curr Pharm Des*. 2013; 19(5):833-40.
- Wade, M., Li, Y.-C., & Wahl, G. M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*. 2013; 13(2), 83-96.
- Walter T, van Brakel B, Vercherat C, Hervieu V, Forestier J, Chayvialle JA, Molin Y, Lombard-Bohas C, Joly MO, Scoazec JY. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase status in neuroendocrine tumours: prognostic relevance and association with response to alkylating agents. *Br J Cancer*. 2015 Feb 3; 112(3):523-31.
- Warner, R. R. P. Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances. *Gastroenterology*. 2005; 128(6), 1668-1684.
- Watanabe G, Ishida T, Furuta A, Takahashi S, Watanabe M, Nakata H, et al.: Combined Immunohistochemistry of PLK1, p21, and p53 for Predicting TP53 Status: An Independent Prognostic Factor of Breast Cancer. *Am J Surg Pathol* 2015 Aug; 39:1026–1034.
- Wild, D., Bomanji, J. B., Benkert, P., Maecke, H., Ell, P. J., Reubi, J. C., & Caplin, M. E. Comparison of 68Ga-DOTANOC and 68Ga-DOTATATE PET/CT within patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. 2013; 54(3), 364-372.
- Xiang Q, Chen W, Ren M, Wang J, Zhang H, Deng DY, Zhang L, Shang C, Chen Y. Cabozantinib suppresses tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma by a dual blockade of VEGFR2 and MET. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(11):2959-70.
- Xiong, J., Yang, Q., Li, J., & Zhou, S. Effects of MDM2 inhibitors on vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human breast cancer. *Angiogenesis*. 2014; 17(1), 37-50.
- Xu H, Stabile LP, Gubish CT, Gooding WE, Grandis JR, Siegfried JM. Dual blockade of EGFR and c-Met abrogates redundant signaling and proliferation in head and neck carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(13):4425-38.
- Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, Qian F, Chu F, Bentzien F, Cancilla B, Orf J, You A, Laird AD, Engst S, Lee L, Lesch J, Chou YC, Joly AH. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10(12):2298-308.

Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Oberg K. RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med.* 2011 Feb 10; 364(6):514-23.

Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, Tomasek J, Raderer M, Lahner H, Voi M, Pacaud LB, Rouyrre N, Sachs C, Valle JW, Fave GD, Van Cutsem E, Tesselaar M, Shimada Y, Oh DY, Strosberg J, Kulke MH, Pavel ME; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial (RADIANT-4) Study Group. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastro-intestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet.* 2016 Mar 5; 387(10022): 968-977. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00817-X.

Yilong Zhang, Rajul K. Jain, Min Zhu: Recent Progress and Advances in HGF/MET-Targeted Therapeutic Agents for Cancer Treatment: *Biomedicines* 2015, 3(1), 149-181.

You WK, Sennino B, Williamson CW, Falcón B, Hashizume H, Yao LC, Aftab DT, McDonald DM. VEGF and c-Met blockade amplify angiogenesis inhibition in pancreatic islet cancer. *Cancer Res.* 2011;71(14):4758-68.

Zak K, Pecak A, Rys B, Wladyka B, Dömling A, Weber L, Holak TA, Dubin G. Mdm2 and MdmX inhibitors for the treatment of cancer: a patent review (2011-present). *Expert Opin Ther Pat.* 2013 Apr; 23(4):425-48.

Zaninetti, R., Tacchi, S., Erriquez, J., Distasi, C., Maggi, R., Cariboni, A., et al. Calcineurin primes immature gonadotropin-releasing hormone-secreting neuroendocrine cells for migration. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.). 2008; 22(3), 729-736.

Zhang, L., Yan, Y., Zhu, D., Yang, W., Wang, W., Hu, Y. Nutlin-1 strengthened anti-proliferation and differentiation-inducing activity of ATRA in ATRA-treated p-glycoprotein deregulated human myelocytic leukemia cells. *Investigational New Drugs.* 2012; 30(1), 37-47.

Zhang, X., Gu, L., Li, J., Shah, N., He, J., Yang, L. Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells. *Cancer Research.* 2010; 70(23), 9895-9904.

Zhou BP, Hung MC. Novel targets of Akt, p21(Cipl/WAF1), and MDM2. *Semin Oncol.* 2002 Jun; 29(3 Suppl 1):62-70. Review.

Zhou Y, Zhao C, Gery S, Braunstein GD, Okamoto R, Alvarez R, Miles SA, Doan NB, Said JW, Gu J, Phillip Koeffler H. Off-target effects of c-MET inhibitors on thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13(1):134-43.

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.* 2001; 3(11), 973982.

Zietz C, Rössle M, Haas CH, Sendelhofert A, Hirschmann A, Stürzl M, Löhrs U. MDM-2 Oncoprotein Overexpression, p53 Gene Mutation, and VEGF Up-Regulation in Angiosarcomas. *Am J Pathol.* 1998 Nov; 153(5): 1425–1433. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65729-X

Zitzmann K, De Toni EN, Brand S, Göke B, Meinecke J, Spöttl G, Meyer HH, Auernhammer CJ. The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology.* 2007; 85(1):54-60.

Zitzmann K, Rüdén Jv, Brand S, Göke B, Lichtl J, Spöttl G, Auernhammer CJ. Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors – a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer Lett.* 2010; 295(1):100-9.

Zitzmann K, Vlotides G, Brand S, Lahm H, Spöttl G, Göke B, Auernhammer CJ. Perifosine-mediated Akt inhibition in neuroendocrine tumor cells: role of specific Akt isoforms. *Endocr Relat Cancer.* 2012; 19(3):423-34.

Zitzmann, K., Brand, S., De Toni, E. N., Baehs, S., G"ke, B., Meinecke, J. SOCS1 silencing enhances anti-tumor activity of type I IFNs by regulating apoptosis in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Research.* 2007; 67(10), 5025-5032.

7 Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
BAX	Bc2-assoziiertes X Protein
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
BSA	Bovines Serumalbumin
CgA	Chromogranin A
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Chomputertomographie
DAXX	Death domain-associated protein 6
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMEM/F12	Dulbecco´s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleine acid
DR-4/DR-5	Death receptor 4/5
4EDP1	4E-bindendes Protein
E2F1	Transkriptions Faktor E2F1
EC-Zellen	Enterochromaffine-Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial mesenchymal transition
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescence aktivated cell sorting
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FCS	Fetales Calfserum
FLIP	FLICE inhibitory protein
GEP	Gastroenteropankreatisch
G-Phase	Engl. „gap“-Phase der Mitose

HAUSP	Herpes virus associated ubiquitin specific protease
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
5-HIES	5-Hydroxy-Indolessigsäure
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IGFR	Insulin-like growth factor
Ki	Dissoziationskonstante eines Inhibitors bei der Enzymkinetik
Mcl-1	Myeloid leukemia cell differentiation protein
MDCT	Multidetektor-CT
MEK	MAP/ERK Kinase
MEN1	Multiple Endokrine Neoplasie 1
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
M-Phase	Teilungsphase der Mitose
MPR	Multiplanare Reformation
MRT	Magnetresonanztomographie
MSCT	Mehrschicht-CT
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NANETS	North American Neuroendocrine Tumor Society
NEN	Neuroendokrine Neoplasien
NET	Neuroendokrine Tumore
NSE	Neuron spezifische Enolase
PBS	Phosphate buffert saline
PCR	Polymrase chain reaction
PDGFR	Platelet derived growth factor
PET	Positronen Emission Tomographie
P70S6K	P70 ribosomale Protein S6 Kinase
PI(3)K	Phosphoinositol-(3) -Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5 Triphosphat
PRRT	Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deteted on chromosom ten
RAF	Rapidly growing fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma

RFA	Radiofrequenzablation
rhHGF	rekombinant hergestellter Hepatocyte growth factor
RNA	Ribonucleine acid
RPMI	Roswell park memorial institute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RTKI	Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium Dodecylsulfate polyacrylamide
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomographie
S-Phase	Synthesephase der Mitose
SSA	Somatostatinanaloga
SSR	Somatostatinrezeptor
TAE	Transarterielle Embolisation
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNM-Stadien	Tumor, lymphknoten, Metastasen-abhängige Tumorstadien
TRAIL	Tumornekrosefaktor-assoziiertes Apoptose-induzierendes Ligand
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - WHO-Klassifikation 2010 der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien [Bosman F. et al, IRAC Press 2010; Lloyd RV. Et al, IRAC 2017].....	7
Tabelle 2 - Grading NEN des GEP-System [MANUAL Endokrine Tumore, 2013 3.Auflage].	8
Tabelle 3 - Funktional-aktive NET des Pankreas und Duodenums nach [Kaltsas G. et al, Endocrine Reviews 2004]	9
Tabelle 4 - Tyrosinkinase-Inhibitoren und deren Zielstrukturen nach Blumenschein GR Jr. Et al J Clin Oncol 2012.	16
Tabelle 5 - In den Versuchen eingesetzte Chemikalien.....	20
Tabelle 6 - Für die Versuche benötigte Geräte.....	21
Tabelle 7 - Verwendete Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 8 - Verwendete NET-Zelllinien und dazugehörige Medien [Evers BM. et al, Gastroenterology 1991; Babu V. et al, Pancreas 2013; Kölby L. et al, Am J Pathol. 2001; Schuller HM. Et al, IARC Sci Publ. 1987; Cakir M. et al, Expert Opin Ther Targets. 2011].	23
Tabelle 9 - Verwendete Erstantikörper	28
Tabelle 10 - Verwendete Zweitantikörper	28
Tabelle 11 - Verwendete Primer bei der p53 Sequenzierung.	29
Tabelle 12 - MDM2-Inhibitoren in klinischen Studien.....	59
Tabelle 13 - Festgestellte Mutationen in den drei untersuchten Zelllinien. Adaptiert nach Frau Prof. Dr. Stefanie Hahner / Frau Dr. rer. nat. Sabine Herterich, Universitätsklinikum Würzburg.....	60

9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 - Struktur der c-MET-Rezeptortyrosinkinase nach Organ SL. et al, Ther Adv Med Oncol 2011.....13
- Abbildung 2 - Weitere RTK die in räumlichen Nähe zu der c-Met-Kinase stehen. Adaptiert aus: Neeta K. Venepalli and Laura Goff et al, International Journal of Hepatology 2013.14
- Abbildung 3 - Schematische Darstellung der c-Met-Tyrosinkinase Signalkaskade. Adaptiert ausfolgenden Literaturstellen: Rene Meyer et al, Front. Physiol, 28 November 2012; Yilong Zhang et al, Biomedicines 2015; Neeta K. Venepalli and Laura Goff et al,.....15
- Abbildung 4 - Schematische Darstellung der p53 Aktivierung und dessen Auswirkungen. Zusätzlich ist der Abbau über E3-Ligase angezeigt. Adaptiert aus: Rohini Keshava et al, Annals of Neurosciens 2008.....18
- Abbildung 5 – A und B: 5A: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1-, Bronchopulmonale NCI-H727- und Dünndarm GOT1-Zellen wurden mit HGF (1.25 nM) für 10 Minuten inkubiert. Die Vorstimulation mit INC280 (100 nM) für 2 Stunden, wurde in der Kontrollgruppe und in der HGF behandelten Gruppe durchgeführt. Anschließend wurden die Expressionsmuster von pc-Met Y1234/5, c-Met, pAkt S473, pERK1/2 T202/Y204 und β -Actin als „Loading control“ mittels Western Blot ermittelt. 5B: Unbehandelte Zelllysate der Bon1, NCI-H727 und GOT1 Tumorzellen. Die Expression von HGF und das Protein β -Actin, zur Kontrolle der Beladung, werden gezeigt. Es wurde jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.30
- Abbildung 6 - A-C: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1-, Bronchopulmonale NCI-H727- und Dünndarm GOT1-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib in zunehmender Konzentration von 1 nM bis 10000 nM für 24h, 48h und 72h inkubiert. Die Zellviabilität wurde mit dem Cell Titer 96 Kit (Promega) bestimmt. Mittelwerte und Standartabweichung von vier unabhängigen Versuchen werden gezeigt. Eine statistische Analyse durch den T-Test zeigte signifikante Ergebnisse. Dargestellt durch: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$32
- Abbildung 7 – A - B: 7A: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1-, Bronchopulmonale NCI-H727- und Dünndarm GOT1-Zellen wurden entweder mit einer non-targeted siRNA (50 nM) oder einer spezifischen siRNA gegen c-Met transfiziert. Die Effektivität der siRNA wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse überprüft. Betrachtet wurde die c-Met Expression nach 72 stündiger Transfektion. 7B: Die Zellviabilität der mit siRNA transfizierten Bon1- und NCI-H727-Zellen wurde mittels Cell Titer 96 Kit (Promega) nach 72 Stunden ermittelt. Ein repräsentativer Blot mit dazugehörigen Mittelwerten und Standartabweichungen, von drei unabhängigen ermittelten Experimenten, werden gezeigt.....33
- Abbildung 8 Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib in zunehmender Konzentration von 1 nM bis 10000 nM für 24h inkubiert. Die unter der Inhibierung entstanden Expressionsmuster von phospho-c-Met Y1234/5 und C-Met werden gezeigt. Ein Blot von drei unabhängigen Experimenten wird gezeigt.....34
- Abbildung 9 – A - B Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (10000 nM) für 2h, 24h, 48h und 72h inkubiert. Im Western Blot wird die Expression der Proteine von phospho-c-Met Y1234/5, c-Met, pEGFR Y1068, EGFR, pIGFR Y1135, IGFR, pAkt S473, Akt, p4EBP1 S65, p4EBP1 T37/47, 4EBP1, pp70S6K T389, pERK1/2 T202/Y204, ERK1/2, pGSK3 S21/9, GSK3 und β -Actin als "loading control" gezeigt. Ein Blot von drei unabhängigen Experimenten wird dargestellt.....35

- Abbildung 10 - A-D: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib mit einer Konzentration 10000 nM für 24 Stunden inkubiert. Da gestellt sind die G2, S, G1 und sub G1 Events der FACS-Analyse. Eine von drei unabhängigen FACS-Analysen wird gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen der drei unabhängigen Versuche werden durch Abb. 10 B und 10 D gezeigt. Eine statistische Auswertung mittels T-Test ergab signifikante Ergebnisse, diese wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 37
- Abbildung 11 – A – B: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (10000nM) für 2, 24,48 und 72 Stunden behandelt. Im Western Blot wurden die Expressionslevel von pMet Y1234/5, c-Met, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin D3, CDK4, CDK6, pChk1 S345, Chk1, PCNA, pRb S780, Rb, PARP und β -Actin als "loading control" evaluiert und gezeigt. Einer von drei unabhängigen Blots wird dargestellt..... 39
- Abbildung 12 – A-D: Humane neuroendokrine Pankreas Bon1(12A und B) - und Bronchopulmonale NCI-H727(12C und D) -Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (100nM und 10000nM) für 72 Stunden behandelt. Analysiert wurde die Spaltbreite nach 0 Stunden und 72 Stunden. Ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Experimenten wird durch Abb. 12B und 12 D gezeigt. Eine von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen der drei unabhängigen Versuche werden durch Abb. 12 A und 12 C gezeigt. Eine statistische Auswertung mittels T-Test ergab signifikante Ergebnisse, diese wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 41
- Abbildung 13 - Humane neuroendokrine Pankreas Bon1- und Bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit INC280, Cabozantinib und Tivantinib (10000nM) für 24 Stunden behandelt. Die Expressionsmuster der EMT-Marker E-Cadherin, N-Cadherin, β -Cadherin, src, Twist, Vimentin, ZO-1 und β -Actin als "loading control" wurden im Western Blot ermittelt und gezeigt. Hierbei handelt es sich um einen repräsentativen Blot aus drei unabhängigen Versuchen..... 42
- Abbildung 14 - Western Blot Analyse der Basisproteine in Humanen Pankreatischen Bon1, Bronchopulmonalen NCI-H727 und Dünndarm GOT1 NET. Leberkarzinomzellen HepG2 und Huh7 wurden als Kontrolle verwendet. Die Expressionmuster von p53, MDM2, p21, Rb, E2F1, MGMT und β -Actin als „loading control“ werden in allen drei Tumorzelllinien dargestellt. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus drei voneinander unabhängigen Experimenten..... 43
- Abbildung 15 –: Western Blot Analyse der Expressionsmuster von pMDM2, MDM2, p53, p21, PUMA, E2F1, pRB, Rb, Cyclin B1, Cyclin D3, BclxL, Bid, DAXX, HAUSP, PCNA und β -Actin als "loading control", in p53^{wildtype}GOT1 Zellen, p53^{mutation} Bon1 und p53^{mutation} NCI-H727 Zellen während der Inkubation mit NVP-CGM097. Hierbei handelt es sich um einen repräsentativen Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen. 44

- Abbildung 16 - A - C: A: Sequenzierungsanalyse der Mutationen des TP53 Gens. Bon1 beherbergen ein. p R342Stop; c.1024 C>T in Exon 10. B: NCI-H727 weisen eine heterozygote Insertion ins p. 162 Tyr-Lys-Gln (TAC AAG CAG) im Exon 5 auf. C: Dies führt zu einem Einschub von 3 Aminosäuren im Leseraster des Tp53 Gen.....45
- Abbildung 17 - A - C: Zellviabilität-Assay der p53^{wildtype} GOT1-, p53^{mutation} Bon1- und p53^{mutation} NCI-H727 Zellen während der Inkubation mit CGM097 (4 nM bis 2500 nM) für 48, 96 und 144 Stunden. Gezeigt werden die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier unabhängigen ermittelten Versuchen. Signifikante Ergebnisse wurden durch die Anwendung eines T-Test ermittelt und wie folgt dargestellt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.....47
- Abbildung 18 - 18A-C: Zellviabilität-Assay der p53^{wildtype} GOT1-, p53^{mutation} Bon1- und p53^{mutation} NCI-H727 Zellen während der Inkubation für 96 Stunden mit CGM097 alleine und in Kombination mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001). Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Ereignisse gegen die unbehandelte Kontrolle wurden durch statistische Analyse mit Hilfe des T-Test ermittelt und wie folgt dargestellt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Statistische Analysen mit dem T-Test zeigten signifikante Ergebnisse im Vergleich Kontrolle zu CGM097. Dargestellt mit a < 0,05 und b < 0,01. Statistische Analysen mit dem T-Test zeigten signifikante Ergebnisse von 5-Fluorouracil, Temozolomid und RAD001 alleine, verglichen mit CGM097 + 5-Fluorouracil, Temozolomid und RAD001. Dargestellt mit # < 0,05 und ## < 0,01.49
- Abbildung 19 - A - B: A: Western Blot Analyse der Proteine pMDM2, MDM2, p53, p21, PUMA, E2F1, pRb, Rb, Cyclin B1, Cyclin D3, Cyclin E, CDK2, CDK4, CDK6, PCNA und β -Actin als „loading control“ in p53^{wildtype} GOT1 Zellen. Sowohl durch den MDM2 Inhibitor alleine, als auch in Kombination mit 5-Fluorouracil, Temozolomid und Everolimus (RAD001). Hierbei handelt es sich um einen von drei repräsentativen Western Blots. B: Zeigt das arithmetische Mittel und die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Ereignisse gegen die unbehandelte Kontrolle wurden durch statistische Analyse mit Hilfe des T-Test ermittelt und wie folgt dargestellt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Statistische Analysen mit dem T-Test zeigten signifikante Ergebnisse im Vergleich Kontrolle zu NVP-CGM097. Dargestellt mit a < 0,05 und b < 0,01. Statistische Analysen mit dem T-Test zeigten signifikante Ergebnisse von 5-Fluorouracil, Temozolomid und RAD001 alleine, verglichen mit NVP-CGM097 + 5-Fluorouracil, Temozolomid und RAD001. Dargestellt mit # < 0,05 und ## < 0,01.....51

Abbildung 20 - A-C: Caspase 3/7-Assay (A) und Zellzyklus Analyse durch FACS (B) in p53^{wildtype} GOT1-Zellen während der Inkubation mit NVP-CGM097 für 72 h alleine und in Kombination mit 5-Fluorouracil. Das arithmetische Mittel und die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen wurden bestimmt. Signifikante Ereignisse gegen die unbehandelte Kontrolle wurden durch statistische Analyse mit Hilfe des T-Test ermittelt und wie folgt dargestellt: * p < 0,05; ** p < 0,01; Mittels Western-Blot wurden die Apoptosis abhängigen Proteine bestimmt (C). p53^{wildtype} GOT1-Zellen wurden für 48 h mit NVP-CGM097 alleine und in Kombination mit 5-Fluorouracil behandelt. Einer von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt..... 53

Abbildung 21 -: Western Blot Analyse der Proteine p53, p21, pRb, Rb, CDK1, Cyclin B1, Cyclin D3, pAkt, Akt, pErk1/2, Erk1/2, Parp und β -Actin als „loading control“ in p53wildtype GOT1 Zellen. Behandelt wurden die Zellen mit NVP-CGM097 (500nM) alleine sowie mit Octreotid (1 μ m; 10 μ m) für 48h und 72h. Hierbei handelt es sich um einen von drei repräsentativen Western Blots..... 54

Abbildung 22 - A - B: Western Blot Analyse der Proteine p53, p21, pMDM2, MDM2, pAMPK, AMPK, pCREB, CREB, HSP90, pEGFR, EGFR, pAkt, Akt, pErk1/2, Erk1/2, pmTor, mTor, pS6, S6, p4EBP1, 4EBP1 und β -Actin als “loading control” während der Inkubation mit CGM097 für 2 und 24 Stunden. Jeweils einer von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt. 55

10 Publikationen

Originalpublikationen

Reuther C, Heinzle V, Spampatti M, Vlotides G, de Toni E, Spöttl G, Maurer J, Nölting S, Göke B, Auernhammer CJ. Cabozantinib and Tivantinib, but Not INC280, Induce Antiproliferative and Antimigratory Effects in Human Neuroendocrine Tumor Cells in vitro: Evidence for 'Off-Target' Effects Not Mediated by c-Met Inhibition. *Neuroendocrinology*. 2016;103(3-4):383-401. doi: 10.1159/000439431. Epub 2015 Aug 25. PMID: 26338447

(Current Impact Factor: 3.608; 5-year Impact Factor: 4.392)

Reuther C, Heinzle V, Nölting S, Herterich S, Hahner S, Halilovic E, Jeay S, Wuerthner JU, Aristizabal Prada ET, Spöttl G, Maurer J, Auernhammer CJ. The HDM2 (MDM2) Inhibitor NVP-CGM097 Inhibits Tumor Cell Proliferation and Shows Additive Effects with 5-Fluorouracil on the p53-p21-Rb-E2F1 Cascade in the p53wild type Neuroendocrine Tumor Cell Line GOT1. *Neuroendocrinology*. 2018;106(1):1-19. doi: 10.1159/000453369. Epub 2016 Nov 21. PMID: 27871087

(Current Impact Factor: 3.608; 5-year Impact Factor: 4.392)

Kongressbeiträge

C. Reuther, V. Heinzle, M. Spampatti, G. Vlotides, E. de Toni, G. Spöttl, J. Maurer, B. Göke, C.J. Auernhammer.: Spezifische c-Met Inhibition hat keine direkten antiproliferativen Effekte auf humane neuroendokrine Tumorzelllinien in vitro. Vortrag für den Kongress der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Leipzig, Oktober 2014

C. Reuther, V. Heinzle, S. Nölting, G. Spöttl, J. Maurer, B. Göke, C.J. Auernhammer. Antiproliferative Effekte des MDM-2 Inhibitors CGM-097 auf humane neuroendokrine GOT1 Tumorzellen in vitro. Vortrag für den Kongress der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Leipzig, Oktober 2014

11 Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. med. Christoph Auernhammer, Arbeitsgruppe Neuroendokrine Tumoren der Medizinischen Klinik 4 des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern (früher Medizinische Klinik 2 des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern) für das Überlassen der Themen, die Betreuung meiner Arbeit und der exzellenten Unterstützung während der gesamten Zeit.

Gerald Spöttl und Julian Maurer für die Einarbeitung, die Hilfestellungen für den experimentellen Abschnitt und die technische Unterstützung. Für die gemeinsamen lustigen und arbeitsreichen Stunden im Labor.

Nina Schmidt für die unterhaltsamen Stunden im Labor.

Meiner Frau Leonie-Alexa Reuther und meinen Kindern Carla und Vincent für das aufgebrachte Verständnis in den letzten 5 Jahren und ihre liebevolle Unterstützung.

Meinen Eltern Marlene und Dr. Herbert Reuther für das entgegengebrachte Vertrauen und die moralische Unterstützung.

Meiner Schwester Sylvia Schmidt und Johann Webersberger für die exzellente technische und graphische Unterstützung.