

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Martin Reincke

**Tropomyosin Rezeptor Kinasen (Trks) – ein neues Target in der  
molekular zielgerichteten Tumortherapie.**

**Untersuchungen zu antiproliferativen Effekten des pan-Trk**

**Inhibitors GNF-5837 in humanen neuroendokrinen GOT1-**

**Tumorzellen in vitro und zur Expression von Trks in**

**neuroendokrinen Tumoren des GastroEnteroPankreatischen**

**Systems.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Vera Heinzle

aus Innsbruck

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichtersteller:

Prof. Dr. Christoph Auernhammer

---

Mitberichtersteller:

Prof. Dr. Thomas Knösel

PD Dr. Harun Ilhan

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dr. Svenja Nölting

---

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

23.12.2021

## **Eidesstattliche Versicherung**

Heinzle, Vera Waltraud Maria

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

**„Tropomyosin Rezeptor Kinasen (Trks) – ein neues Target in der molekular zielgerichteten Tumorthherapie.**

**Untersuchungen zu antiproliferativen Effekten des pan-Trk Inhibitors GNF-5837 in humanen neuroendokrinen GOT1-Tumorzellen in vitro und zur Expression von Trks in neuroendokrinen Tumoren des GastroEnteroPankreatischen Systems.“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und 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 ich die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.02.2021

Ort, Datum

Vera Heinzle

Unterschrift Doktorandin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>S 6</b>
1.1. Definition von Neuroendokrinen Tumoren.....	S 6
1.2. Geschichte.....	S 6
1.3. Klassifikation.....	S 7
1.4. Epidemiologie.....	S 9
1.5. Klinisches Erscheinungsbild.....	S 9
1.6. Diagnostik.....	S 11
1.6.1. Labordiagnostik.....	S 11
1.6.2. Histologische Untersuchung.....	S 13
1.6.3. Bildgebende Diagnostik.....	S 13
1.7. Therapie.....	S 14
1.7.1. Chirurgische Therapie.....	S 14
1.7.2. Lokal-ablative und loko-regionäre Therapie von Lebermetasaten.....	S 15
1.7.3. Nuklearmedizinische Therapie.....	S 15
1.7.4. Medikamentöse Therapie.....	S 16
<b>2.Grundlagen.....</b>	<b>S 20</b>
2.1. Tropomyosin Rezeptor Kinase (TRK).....	S 20
2.1.1. Entdeckung und Namensgebung.....	S 20
2.1.2. Neurotrophine.....	S 21
2.1.3. Struktur der Trk-Rezeptoren.....	S 23
2.1.4. Aktivierung und Signalwirkung von Trk-Rezeptoren.....	S 23
2.2. Trk-Inhibitoren und antitumorale Therapie.....	S 27
2.2.1. Larotrectinib und Entrectinib.....	S 27
2.2.2. GNF-5837.....	S 28
<b>3. Fragestellung.....</b>	<b>S 29</b>
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>S 30</b>
4.1. Material.....	S 30
4.1.1. Chemikalien.....	S 30
4.1.2. Geräte.....	S 32
4.1.3. Verbrauchsmaterial.....	S 33
4.1.4. verwendete Puffer.....	S 34
4.2. Methoden.....	S 35
4.2.1. Zellkultur.....	S 35
4.2.2. Patientenkohorte, Serumproben und Generierung eines Tissue Microarray (TMA).....	S 39
4.2.2.1. NGF und BDNF im Serum mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	S 40
4.2.2.2. Chromogranin A im Serum mittels IRMA.....	S 40

4.2.2.3. Immunhistochemische Färbung des TMA.....	S 40
4.2.3. Statistische Analyse.....	S 41
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>S 42</b>
5.1. Zellproliferationsassay.....	S 42
5.1.1. Inhibition der Zellproliferation von GOT1-Zellen durch den panTrk-Inhibitor GNF-5837 .....	S 42
5.1.2. Inhibition der Zellproliferation von GOT1-Zellen nach Inkubation mit dem panTrk-Inhibitor GNF-5837 und dem mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001).....	S 49
5.1.3. Keine Effekte auf die Zellproliferation von NCI-H727- und BON1-Zellen durch den panTrk-Inhibitor GNF-5837.....	S 50
5.2. Western Blot-Analyse.....	S 52
5.2.1. Proteinexpression von Trk-Rezeptoren in BON1, NCI-H727, GOT1.....	S 52
5.2.2. Expression von NGF in BON1, NCI-H727, GOT1.....	S 52
5.2.3. Phosphorylierung von TrkA in GOT1-Zellen nach Stimulation und Inhibition.....	S 53
5.2.4. Wirkung von GNF-5837 auf zelluläre Signalwege in GOT1-Zellen.....	S 55
5.2.5. Wirkung von GNF-5837 in Kombination mit RAD001 auf zelluläre Signalwege in GOT1-Zellen.....	S 57
5.3. FACS-Analyse.....	S 58
5.4. CgA-,NGF- und BDNF Serumspiegel bei NET-Patienten mit und ohne Metastasen..	S 59
5.5. Immunhistochemie.....	S 60
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>S 63</b>
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>S 71</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>S 72</b>
8.1. Ergänzende Abbildungen.....	S 72
8.1.1. Proliferationsassay.....	S 72
8.1.2. Western Blot-Analyse.....	S 74
8.1.3. CgA-, NGF- und BDNF-Serumspiegel bei Patienten mit und ohne Metastasen.....	S 79
8.2. Abkürzungsverzeichnis.....	S 82
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>S 84</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>S 91</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Definition von neuroendokrinen Tumoren**

Neuroendokrine Neoplasien umfassen eine heterogene Gruppe langsam wachsender Tumore [1] und sind definiert als epitheliale Neoplasien, die aus dem Mesoderm abstammen, mit prädominanter neuroendokriner Differenzierung [2, 3]. Der Begriff „neuroendokrin“ definiert die Zellen anhand ihrer – für den jeweiligen Zelltyp spezifischen- sekretorischen Produkte und einiger zytoplasmatischer Markerproteine, die sie mit dem neuronalen Zellsystem teilen (allgemeine neuroendokrine Marker, wie Synaptophysin, Neuronen-spezifische Enolase und Chromogranin). Damit umfasst die Bezeichnung „neuroendokrin“ alle neuronalen und endokrinen Zellen, die diesen gemeinsamen Phänotyp teilen, ohne eine Aussage über Lokalisation oder embryologischen Ursprung zu treffen [4-6]. Neuroendokrine Neoplasien können somit in vielen verschiedenen Organen entstehen und unterscheiden sich deutlich nach Tumortyp und Lokalisation, obwohl sie einige pathologische und klinische Eigenschaften teilen [7].

## **1.2. Geschichte**

Erstmals beschrieben T. Langhans, O. Lubarsch und W.B. Ransom im 19. Jahrhundert ungewöhnliche Tumoren des Dünndarms[8, 9]. Siegfried Oberndorfer, der am Pathologischen Institut der Münchner Universität tätig war, beschrieb diese 1907 als eigenständige klinische Entitäten, die sich einerseits wie benigne Tumore verhalten, morphologisch aber Karzinomen gleichen und bezeichnete sie als „Karzinoide“. 1929 berichtete Oberndorfer seine Klassifikation dahingehend, dass diese Tumoren des Dünndarms auch maligne wachsen und metastasieren können [8, 9]. Die Verbindung von intestinalen Karzinoiden zum endokrinen System wurde 1914 von Gosset und Masson erkannt und beschrieben [10]. Die Arbeit von Friedrich Feyrter und später Anthony Pearse begründete das Konzept eines diffusen endokrinen Zellsystems, dessen Zellen unterschiedlichen Lokalisationen des Organismus entspringen und Ursprung von karzinoiden Tumoren sind [5].

### **1.3. Klassifikation**

Da es sich bei NEN um eine biologisch heterogene Gruppe von Tumoren handelt, die eine starke Variabilität in Bezug auf klinische Präsentation, malignes Potenzial und Prognose aufweist [11], stellt die sinnvolle Klassifizierung eine Herausforderung dar.

Grundsätzlich können NEN in funktionell aktive und funktionell inaktive Tumore unterteilt werden. Funktionell aktive Tumore gehen mit einem hormonellen Syndrom einher und machen etwa 25% der Tumoren aus[6]. Die Mehrzahl der Tumore ist dagegen funktionell nicht aktiv [3, 6].

Da die häufigsten Lokalisationen für NEN der Gastrointestinaltrakt und die Lunge sind [12-14], werden hier die Klassifikation für diese besprochen.

Erstmals wurde eine Klassifikation für intestinale Karzinoide von Williams und Sandler 1963 vorgeschlagen. Diese basiert auf dem embryologischen Entstehungsort des Tumors und unterteilt diese in von Vorderdarm, Mitteldarm oder Hinterdarm abstammende Tumore [15]. Zum Vorderdarm zählen hierbei Lunge, Magen, Duodenum oberer Teil des Jejunum und Pankreas. Der Mitteldarm umfasst den unteren Teil des Jejunum, Ileum, Appendix und Caecum. Colon und Rectum werden zum Hinterdarm zusammengefasst[6].

Durch den Wissenszuwachs in Bezug auf NEN zeigte diese Klassifikation allerdings immer mehr Limitationen. 2000 erstellte die World Health Organization eine Klassifikation für gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasmen, 2010, 2017 und 2019 erschienen jeweils überarbeitete Versionen [14, 16]. Das Grading erfolgt anhand des Ki-67 (MIB-1) Proliferationsindex. Das nukleare Ki-67 Antigen ist ein wichtiger Marker der Zellproliferation und wird mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 immunhistochemisch detektiert. Ki-67 zeigt die Aktivität in allen Phasen des Zellzyklus, mit Ausnahme der G0 Phase [17].

NET (neuroendokrine Tumore) gut differenziert	G1	Karzinoid Ki-67 Index < 3% Mitosen (pro 10 HPFs) <2
	G2	Ki-67 Index = 3-20% Mitosen (pro 10 HPFs) = 2-10
	G3	Ki-67 Index >20%
NEC (neuroendokrine Karzinome) schlecht differenziert	G3	Großzelliger Typ oder kleinzelliger Typ Ki-67 Index > 20% Mitosen (pro 10 HPFs) > 20
MANEC/MINEN		Gemischtes adeno-neuroendokrines Karzinom/ Mixed Neuroendocrine Non-Neuroendocrine Neoplasms
		Hyperplastische und präneoplastische Läsionen

Tabelle 1, angelehnt an [6, 11, 16]: WHO Klassifikation 2010 von GEP-NEN, revidiert 2017 und 2019 [18, 19]

Die European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) verfasste 2006/2007 erstmals Leitlinien für die Diagnostik und Behandlung von GEP-NEN, die eine lokalisationspezifische TNM-Klassifizierung und ein dreistufiges Graduierungssystem enthält. Dieses basiert auf Mitosezahl und Ki-67 Index [6]. Die Leitlinienempfehlungen und Standards of Care der ENETS wurde zuletzt 2016/2017 aktualisiert.

Die TNM-Klassifikation der UICC 7. Auflage 2009/ 8. Auflage 2017 Edition [20] unterscheidet sich bei NET des Pankreas und NET der Appendix von der ENETS Klassifikation 2006/2007. Es existieren also zwei parallele Systeme bezüglich der TNM-Klassifikation von NET des Pankreas und NET der Appendix [6].

NEN der Lunge wurden erstmals 1972 in typische und atypische Karzinoide unterteilt, wobei die Bezeichnung „Karzinoid“ von enteralen NEN auf die Lunge übertragen wurde. Die WHO übernahm 2004 und 2015 diese Klassifikation. Das typische Karzinoid wird oft definiert als hoch differenziert, entsprechend G1, das atypische Karzinoid als intermediär differenziert, entsprechend G2. Diese Begrifflichkeiten werden von der WHO nicht mehr empfohlen. Die



Unterscheidung von typischem und atypischem Karzinoid nach WHO ist in der folgenden Tabelle aufgeführt [12, 21]. Eine Vereinheitlichung der Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien im GastroEnteroPankreatischen System und in der Lunge wird zukünftig angestrebt[14, 22].

	Mitosen pro 2mm <sup>2</sup>	Nekrosen
Typisches Karzinoid	<2	keine
Atypisches Karzinoid*	2-10	vorhanden

Tabelle 2, angelehnt an [21]; WHO Klassifikation 2015 von NEN der Lunge

\*nur eine der Bedingungen muss erfüllt sein (Mitosen/Nekrosen)

#### **1.4. Epidemiologie**

Grundsätzlich handelt es sich bei NEN, mit einem Anteil von 0,5% aller malignen Tumore, um seltene Tumore[23], deren Inzidenz und Prävalenz zwischen 1973 und 2012 um das 6,4-fache angestiegen ist [13]. Dies kann einerseits auf verbesserte diagnostische Möglichkeiten zurückgeführt werden, andererseits werden NEN häufiger in Betracht gezogen und pathologisch diagnostiziert [3]. Unabhängig davon ist auch von einem allgemeinen Anstieg ihrer Inzidenz auszugehen. 52,7% der Patienten mit NET sind Frauen.

Schätzungsweise 52%-58% aller NEN entstehen im Gastrointestinaltrakt, 21%-32% im bronchopulmonalen System [13, 23, 24]. Für GEP-NEN liegt die Gesamtinzidenz in der Bevölkerung bei ungefähr 3,65 Erkrankungen pro 100 000 Personen und Jahr [3, 13, 25, 26]. Die höchsten Inzidenzraten für NEN der Lunge lag im SEER 18 registry grouping (2000-2012) bei 1,49 pro 100 000 Personen, für NEN unklaren Ursprungs bei 0,84 pro 100 000 Personen [13].

Das 5-Jahres-Überleben variiert stark je nach Tumorstadium, Alter des Patienten bei Erstdiagnose und Ursprungsort. Es hat sich in der Periode von 2000-2004 auf die Periode 2009-2012 verbessert und liegt für alle NEN, unabhängig von der Lokalisation, bei ca. 79% [13, 23].

## 1.5. Klinisches Erscheinungsbild

Die Symptomatik bei Patienten mit NEN ist hauptsächlich von der hormonellen Aktivität der Tumoren, ihrer Lokalisation und der Tumorausdehnung abhängig. Nicht alle NEN sind funktionell aktiv, auch wenn sie Hormone oder Peptide enthalten können. Diese werden bei funktionell inaktiven Tumoren entweder nicht sezerniert oder verursachen kein klinisches Bild. Aus diesem Grund werden hormonell nicht aktive Neoplasmen meist entweder als Zufallsbefund entdeckt oder durch lokal raumfordernde Prozesse symptomatisch. Histopathologisch lassen sich funktionell aktive oder inaktive NEN nicht sicher voneinander unterscheiden [3, 27].

<b>Tumor</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Sekretionsprodukt</b>	<b>Symptome/Syndrom</b>
Insulinom	Vorderdarm: Pankreas	Insulin	Whipple-Trias: 1)Hypoglykämie 2)adrenerge Symptome: Tachykardie, Angst, Schwitzen, Palpitationen etc. 3)rasche Besserung auf Glukoseinfusion
Gastrinom	Vorderdarm: Duodenum, Pankreas	Gastrin	Peptische Ulcera, gastroösophagealer Reflux, selten Diarrhöen
Glukagonom	Vorderdarm	Glukagon	Diabetes mellitus, nekrolytisch-migratorisches Erythem, ausgeprägter Gewichtsverlust
VIPom	Vorderdarm: Pankreas	VIP	WDHH: wässrige Diarrhöen, Hypokaliämie, Hypochlorhydrie
„Karzinoid“	Mitteldarm: v.a. Ileum	Serotonin	Karzinoid-Syndrom: tritt meist bei vorhandenen Lebermetastasen auf, da Serotonin ansonsten hepatisch metabolisiert wird: Diarrhö, Flush, Bauchkrämpfe, Kardiomyopathie mit plaqueartiger Fibrose der Trikuspidal- und Pulmonalklappen (40-50% d.Patienten)[28]
Hormonell aktives bronchopulmonales Karzinoid	Lunge	Serotonin, ACTH, GHRH	Karzinoid-Syndrom (auch ohne Lebermetastasen), Cushing-Syndrom, Akromegalie [12, 29, 30]

Tabelle 3, angelehnt an [27, 31]: funktionell aktive NEN des Gastrointestinaltrakts und der Lunge

## Genetik von neuroendokrinen Tumoren – Keimbahnmutationen, somatische Mutationen, Epigenetik

Neuroendokrine Tumore können sich entweder sporadisch oder im Rahmen eines erblichen Syndroms manifestieren[32].

### **1.6. Diagnostik**

Neuroendokrine Neoplasien stellen eine diagnostische Herausforderung dar, da sie sich klinisch sehr unterschiedlich, teilweise unspezifisch und oftmals erst spät präsentierten [33]. In vielen Fällen werden die Metastasen von NEN vor dem Primärtumor entdeckt, dessen Lokalisation sich als schwierig erweisen kann [34]. In der Diagnostik kommen Labordiagnostik, histopathologische Verfahren und verschiedene bildgebende Verfahren zum Einsatz.

#### **1.6.1. Labordiagnostik**

Bei klinischen Hinweisen auf funktionell aktive NEN können die produzierten Hormone oder ihre Abbauprodukte laborchemisch bestimmt werden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die häufigsten funktionell aktiven NEN und die zugehörige Labordiagnostik.

<b>Tumor</b>	<b>Labordiagnostik</b>	<b>Erläuterung</b>
Insulinom	Hungerversuch mit Bestimmung von Blutzucker, Insulin, Proinsulin, C-Peptid	Abfall der Plasmaglukose unter 40 mg/dL bei zugleich nicht adäquat supprimierten Insulin- und C-Peptid-Werten;
Gastrinom	Bestimmung von Gastrin im Serum sowie Bestimmung des Magen-pH	Die Kombination eines Nüchtern gastrinwerts von > 1 000 pg/mL zusammen mit einem intragastralen pH-Wert von < 2,5 ist praktisch beweisend.
Glukagonom	Bestimmung von Glukagon im Serum	Serumglukagonspiegel von > 50 pmol/L.
VIPom	Bestimmung von VIP im Serum	VIP-Serumspiegel von mehr als 200 pg/mL
Karzinoid/ Serotonin- produzierender Tumor	Bestimmung der 5-Hydroxyindolessigsäure im angesäuerten 24h-Urin	falsch positive Werte können durch verschiedene Nahrungsmittel bedingt sein

Tabelle 4, angelehnt an[27]: Labordiagnostik bei funktionell aktiven NEN

## Tumormarker

Die aktuell verwendeten Tumormarker für NEN sind Chromogranin A (CgA) und Neuronen-spezifische Enolase (NSE). Diese Marker können im Serum bestimmt werden und gelten als allgemeine neuroendokrine Marker, da sie sowohl in neuroektodermalen als auch endodermalen Tumoren nachweisbar sind. Ihre Sensitivität ist stark abhängig vom Ausmaß des Tumors und ist bei fortgeschrittenen und metastasierten Tumoren am höchsten [35-37]. Neue „Liquid Biopsy“ Verfahren wie zum Beispiel der NETest® mit Bestimmung von 51 Tumor-assoziierten mRNAs und Risikoanalyse in einem mathematischen Algorithmus weisen eine deutlich höhere Aussagekraft als die herkömmlichen monoanalytischen Tumormarker auf und befinden sich derzeit in klinischen Evaluationsstudien [38-41].

## Chromogranin A

Chromogranin A und B, Sekretogranin II und III und einige weitere verwandte Proteine, wie VGF und 7B2, gehören zur Familie der Granine. Sie sind saure Proteine, die einen Hauptbestandteil von sekretorischen Granula verschiedener endokriner und neuroendokriner Zellen bilden und eine wichtige Rolle für die kontrollierte Abgabe von Peptiden, Hormonen, Neurotransmittern und Wachstumsfaktoren spielen. Die Expression von Chromogranin A korreliert mit der Menge sekretorischer Vesikel neuroendokriner Zellen. Dieser Marker ist zwar sensitiv, allerdings nicht spezifisch für NEN und kann bei einer Vielzahl pathologischer Prozesse erhöht sein, wie zum Beispiel bei der Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren, einer Niereninsuffizienz oder einem ausgeprägten Malabsorptionssyndrom. Zudem wird der CgA-Spiegel durch Nahrungsaufnahme beeinflusst, weshalb es sich empfiehlt ihn beim nüchternen Patienten zu bestimmen. Aus diesen Gründen eignet sich CgA vor allem als Verlaufsparemeter [27, 42-46].

## Neuronen-spezifische Enolase

Die Glycolytic Enzyme Enolase, die 2-Phosphoglycerat in Phosphopyruvat konvertiert, ist in Geweben von Säugetieren weit verbreitet. Dieses Enzym liegt als eine Reihe von Isoenzymen vor, die jeweils aus zwei Untereinheiten bestehen. Die alpha-Einheit findet sich in den meisten Geweben, die alpha-beta und beta-beta Enolase nur im Muskel. Die alpha-gamma und gamma-gamma Enolase werden hauptsächlich in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert. Diese gamma-Untereinheit wird auch als Neuronen-spezifische Enolase

bezeichnet. Sie wird vor allem als Marker für gering differenzierte neuroendokrine Karzinome verwendet [47].

### **1.6.2. Histologische Untersuchung**

Eindeutig diagnostisch gesichert werden NEN durch die Untersuchung eines histologischen Präparats, das durch eine Operation oder eine Biopsie gewonnen wird. Ein wichtiger Standard ist dabei die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Chromogranin A (siehe oben) und Synaptophysin.

Synaptophysin ist ein wichtiges integrales Glykoprotein der Membran synaptischer Vesikel und konnte auch in endokrinen Zelltypen nachgewiesen werden. Dort ist es in der Membran von kleinen Vesikeln lokalisiert, die vermutlich einen vorher unbekanntem sekretorischen Signalweg darstellen. Daher ist Synaptophysin ein wichtiger und spezifischer Marker für neuroendokrine Zellen [48].

### **1.6.3. Bildgebende Diagnostik**

Bildgebende Verfahren spielen eine wichtige Rolle in der Diagnostik, Staging und Therapieplanung und Verlaufskontrolle von neuroendokrinen Tumoren. Zur Verfügung stehen morphologische Bildgebung, wie CT, MRT, Sonographie, Endosonographie und funktionelle nuklearmedizinische Bildgebung, wie Szintigraphie und PET. Die Wertigkeit des jeweiligen Verfahrens ist jedoch stark abhängig von Tumorlokalisation und Typ des Primärtumors [49, 50].

Empfohlen ist ein multimodales diagnostisches Konzept, das Schnittbildtechniken und funktionelle Bildgebungstechniken kombiniert um die Sensitivität und Spezifität zu verbessern [51, 52].

### **Computertomographie und Magnetresonanztomographie**

Die Bildgebung mittels CT und MRT ist Standard in der Schnittbilddiagnostik von NEN.

Wenn keine Kontraindikationen bestehen, erfolgt die Bildgebung mittels CT und MRT als multiphasische Untersuchung mit Kontrastmittelgabe. Da NEN und ihre Metastasen gewöhnlich hypervaskularisiert sind, zeigen sie ein Kontrastmittel-Enhancement in der arteriellen Phase [51].

## **PET**

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist ein weiteres nuklearmedizinisches Verfahren. Als Somatostatin-Rezeptor spezifische Tracer stehen <sup>68</sup>Ga-DOTA-Peptide zur Verfügung. Primär werden meist <sup>68</sup>Gallium-markierte Octreotid-Derivate, wie DOTATOC, DOTATATE und DOTANOC, eingesetzt, die eine hervorragende Bildqualität bieten. Die <sup>68</sup>Ga-SSA-PET hat eine Sensitivität von >90% und ersetzt daher zunehmend die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie. In Kombination mit der CT ermöglicht sie die genaue Lokalisation einer Mehranreicherung [3, 51]. Die PET/CT Diagnostik wird auch in den aktuellen Leitlinien empfohlen [52].

Die <sup>18</sup>F-FDG-PET wird in der Diagnostik von gut differenzierten NET wegen seiner geringen Sensitivität nicht primär eingesetzt. Für die Bildgebung bei gering differenzierten neuroendokrinen Karzinomen ist dagegen die FDG-PET/CT zu bevorzugen, da diese Tumore nur eine niedrige Expressionsrate des Somatostatinrezeptors aufweisen [51].

## **1.7. Therapie**

Die Therapieplanung von Patienten mit NEN muss im multidisziplinären Team von Chirurgen, Nuklearmedizinern, interventionellen Radiologen, Strahlentherapeuten, Gastroenterologen, Endokrinologen und Onkologen erfolgen. Aufgrund des breit gefächerten Spektrums therapeutischer Maßnahmen [53, 54] sollten diese Patienten vorzugsweise an Zentren behandelt werden, die über eine hohe Kompetenz auf dem Gebiet der NEN verfügen [3]. Die Therapie sollte sich an aktuellen Leitlinienempfehlungen der ENETS und der nationalen S2K-Leitlinien Neuroendokrine Tumoren orientieren [52].

### **1.7.1. Chirurgische Therapie**

Die chirurgische Resektion von NET ist die einzige kurative Option. Auch für gut differenzierte NET mit lokalen Lymphknotenmetastasen und Lebermetastasen kann die chirurgische Therapie im Sinne eines „Tumor-debulking“ zur Reduktion der Tumormasse von Vorteil sein

[52, 55]. Sie folgt onkologischen Resektionsprinzipien, wobei generell ein lokal radikales Vorgehen bei gleichzeitig maximalem Funktionserhalt angestrebt wird.

Für frühe NET des Magens, Duodenums oder Rektums, die eine Größe von 1cm nicht überschreiten, ist die endoskopische Resektion Mittel der Wahl [52]. Für größere Tumore oder bei Infiltration der Muscularis propria, Gefäßinvasion oder einem Tumorgrad G2/G3 ist meist die Operation empfohlen [52, 56].

Treten bei gut differenzierten NET synchron oder metachron Lebermetastasen auf, sollten diese operativ reseziert werden, wenn eine komplette Resektion möglich oder eine Verringerung der Tumormasse um mehr als 90% realisierbar ist. Bei Patienten mit ausgedehnten bilobären Lebermetastasen sollte die Durchführbarkeit einer zweizeitigen Resektion an einem erfahrenen Zentrum evaluiert werden [55].

### **1.7.2. Lokal-ablative und loko-regionäre Therapie von Lebermetastasen**

Bei inoperablen Lebermetastasen und ausschließlich hepatischer Tumorlast bzw. leberdominanter Tumorlast können bei NET lokal-ablative und loko-regionäre Therapieverfahren erwogen werden. Prinzipiell kommen hier als lokal-ablative Verfahren zum Beispiel die Radiofrequenzablation (RFA) oder die Brachytherapie in Frage. Loko-regionäre Therapieverfahren stellen die transarterielle Chemoembolisation (TACE), transarterielle Embolisation (TAE) oder die selektive intraarterielle Radio-Therapie (SIRT) der Lebermetastasen dar [52].

### **1.7.3. Nuklearmedizinische Therapie**

Die Peptidrezeptor-basierte Radiotherapie (PRRT) findet in der Therapie von NET Anwendung, wenn eine kurative chirurgische Therapiemaßnahme nicht möglich ist. Sie basiert auf der Überexpression von Somatostatin-Rezeptoren auf der Oberfläche der meisten neuroendokrinen Tumorzellen und richtet sich insbesondere nach der Tumorausdehnung, dem Proliferationsindex Ki67 und der möglichen hormonellen Aktivität [3, 27]. Die aktuell für die PRRT am häufigsten verwendete Substanz ist <sup>177</sup>Lutetium-DOTA-TATE, das eine hohe Affinität zum häufigsten Rezeptor-Subtyp SSTR2 hat. Das radioaktiv markierte Somatostatin-Analogon wird von der Zelle aufgenommen und wirkt über die intrazelluläre Bestrahlung [57].

Die PRRT ist sowohl nephro-, als auch myelotoxisch. Durch die Koinfusion einer Arginin/Lysin-haltigen Aminosäurelösung, die die tubuläre Rückresorption der markierten Somatostatin-Analoga hemmt, wird die Nephrotoxizität gemindert [57].

Die Myelotoxizität ist in den meisten Fällen transient, allerdings wurde bei etwa 1% der behandelten Patienten ein myelodysplastisches Syndrom beobachtet [57].

Die Indikation für die PRRT stellt der Nachweis eines Tumorprogresses innerhalb von drei Monaten unter einer anderen etablierten Therapie (meist Somatostatinanaloga) dar. Die publizierten Raten für ein objektives Ansprechen mit Tumorregression schwanken von Zentrum zu Zentrum. Tumorstabilisierungen werden in mehr als 50%, partielle Tumorregressionen in ungefähr 20 - 30% der Fälle beobachtet. Die mediane Zeit bis zur erneuten Progression der Erkrankung liegt für die DOTATOC-Therapie bei 30 bis 40 Monaten [3, 27, 52, 53, 57].

#### **1.7.4. Medikamentöse Therapie**

##### **Biotherapie**

Die Biotherapie umfasst die Therapie mit Somatostatin-Analoga wie Octreotid und Lanreotid, sowie mit Interferon- $\alpha$  [52, 53].

##### **Somatostatin-Analoga:**

Bei Somatostatin handelt es sich um ein erstmals 1974 im Hypothalamus nachgewiesenes natives inhibitorisches Peptidhormon [3]. Es wird dort endokrin sezerniert und hemmt die Freisetzung von Hormonen in der Hypophyse. Auch an einigen anderen Stellen des Organismus befinden sich Somatostatin-produzierende Zellen, insbesondere im Gastrointestinaltrakt [3]. Hier beeinflusst Somatostatin durch Hemmung der endokrinen und exokrinen Sekretion benachbarter Zellen die intestinale Motilität und die Motilität der Gallenblase [3]. Es gibt fünf Somatostatin-Rezeptoren (sstr1-5) auf menschlichem Gewebe, an denen Somatostatin seine Wirkung entfalten kann [3]. Mehr als 80% der NET exprimieren Somatostatinrezeptoren auf ihrer Zellmembran [58].

Somatostatinanaloga sind zur Symptomkontrolle durch Hemmung der Hormonsekretion bei funktionell aktiven NET und auch zur Tumorkontrolle bei funktionell-aktiven und funktionell nicht-aktiven NET jeweils zugelassen [52, 53].



Octreotid und Lanreotid zeigen hauptsächlich eine Bindungsaffinität zu den Somatostatinrezeptor-Subtypen 2 und 5 [55, 59].

#### Interferon- $\alpha$ :

Auch wenn für Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) im Vergleich zu Somatostatin-Analoga die Datenlage geringer und das Nebenwirkungsprofil deutlich ungünstiger ist, kann auch IFN- $\alpha$  sowohl zur Hemmung der Hormonsekretion als auch zur antiproliferativen Therapie von NET verwendet werden [3, 59, 60].

Seine Wirkung beruht auf Induktion von Apoptose, Immunmodulation und antiangiogenetischen Effekten. IFN- $\alpha$  aktiviert JAK-STAT-Signalkaskaden durch Bindung an Typ-I-IFN-Rezeptoren. Bei funktionell aktiven NET kann mit IFN- $\alpha$  in ungefähr 60% der Fälle eine Symptomkontrolle erreicht werden. Seine antiproliferative Wirkung konnte in prospektiven, allerdings nicht Placebo-kontrollierten Studien gezeigt werden [3, 59, 60].

Aufgrund des deutlich ungünstigeren Nebenwirkungsprofils im Vergleich zu Somatostatin-Analoga kommt IFN- $\alpha$  nur in Ausnahmefällen als Erstlinientherapie in Frage. Die Kombinationstherapie mit Somatostatin-Analoga plus IFN- $\alpha$  ist laut aktueller Studienlage der Therapie mit den Einzelsubstanzen nicht überlegen [3, 59, 60].

#### Molekular zielgerichtete Therapie

Dies umfasst alle Therapien, die mit den Rezeptoren oder den durch sie vermittelten intrazellulären Signalkaskaden interagieren, sie hemmen oder stimulieren. Insofern ist auch die Biotherapie mit Somatostatin-Analoga und IFN- $\alpha$  eine molekular zielgerichtete Therapie [3].

#### Sunitinib:

Sunitinib ist ein oral einzunehmender Multikinase-Inhibitor und hemmt alle drei Subtypen des VEGF-Rezeptors, den PDGF-Rezeptor und einige anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren, wie KIT, FLT3 und RET [3, 59, 61]. Als proangiogenetische Substanzen sind VEGF und PDGF wichtig für die Bildung von Blutgefäßen in normalem, aber vor allem auch Tumorgewebe. Die Expression von VEGF in gut differenzierten NEN ist mit dem Auftreten von Metastasen und einem kürzeren progressionsfreiem Überleben assoziiert [3, 59, 61].

Vermutlich ist die Hemmung der Angiogenese durch Sunitinib der entscheidende Wirkmechanismus dieser Substanz in der Therapie von Patienten mit NET. Sunitinib ist unter anderem zugelassen für die Behandlung nicht resezierbarer oder metastasierter, gut differenzierter pankreatischer NET mit progressivem Krankheitsverlauf [52, 53].

#### Everolimus:

Everolimus ist ein mTOR (mammalian target of rapamycin) Inhibitor. mTOR ist eine intrazelluläre Serin-Threonin- Kinase, die eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und Angiogenese spielt [3, 61]. Sie integriert verschiedene Signalkaskaden, die durch Wachstumshormone aktiviert werden. Eine Aktivierung von mTor, wie sie bei vielen Tumoren vorliegt, führt zu vermehrter Proliferation, Angiogenese und bedeutet ein längeres Überleben der Zelle [3, 61].

Everolimus ist unter anderem zugelassen für die Behandlung von inoperablen oder metastasierten, gut oder mäßig differenzierten NET pankreatischen Ursprungs, NET des Gastrointestinaltrakts und NET der Lunge mit jeweils progressivem Verlauf [52, 53].

In der Phase-III-Zulassungsstudie RADIANT-3 wurden 410 Patienten mit inoperablen pankreatischen NET eingeschlossen. Unter Everolimusgabe von 10mg/Tag zeigte sich ein hoch signifikantes verbessertes progressionsfreies Überleben von 11,0 Monaten gegenüber 4,6 Monaten unter Placebogabe. Zudem reduzierte die Everolimusgabe die Hormonsekretion bei funktionell aktiven NET des Pankreas [62].

#### Telotristat Etiprat:

Für die Symptomkontrolle von Diarrhö und Flushs im Rahmen eines Karzinoid-Syndroms ist in 60 – 70% der Fälle die Gabe von langwirksamen Somatostatin-Analoga ausreichend [52-54]. Als Folge einer Tachyphylaxie oder bei Tumorprogress kann es im Verlauf jedoch zu einer ungenügenden Kontrolle des Karzinoid-Syndroms bei alleiniger Gabe von Somatostatin-Analoga kommen [3, 63, 64]. Der oral verfügbare Inhibitor des Enzyms Tryptophan-Hydroxylase, das die Konversion von Tryptophan zu Serotonin katalysiert, ist eine vielversprechende Ergänzung zu den Somatostatin-Analoga zur Symptomkontrolle von der Diarrhoe bei Karzinoid-Syndrom [52-54]. Außerdem wird ein möglicher positiver Effekt auf die Hemmung der Progression einer Karzinoid-Herzerkrankung diskutiert, ist jedoch bisher nicht durch Studien belegt [3, 63, 64].

## Chemotherapie

Zu beachten gilt, dass alle Daten zur Chemotherapie bei NET aus unkontrollierten Phase-II-Studien mit eher geringen Fallzahlen stammen [3, 59].

### Neuroendokrine Tumoren des Pankreas

Für inoperable NET des Pankreas ist die konventionelle Chemotherapie ein etablierter Therapieansatz [52, 53, 59].

#### *Streptozotocin-basierte Chemotherapieschemata*

Die ENETS empfiehlt in ihren Leitlinien Streptozotocin-basierte Chemotherapieschemata mit Streptozotocin in Kombination mit 5-Fluorouracil als Standard der Chemotherapie bei NET des Pankreas. Die objektiven Responderaten liegen bei etwa 40% [52, 53]. Bei der Therapie mit Streptozotocin ist insbesondere die mögliche Nephrotoxizität zu beachten [52, 53].

#### *Temozolomid und Capecitabin*

Für dieses orale Chemotherapieschema für NET des Pankreas, bei der eine Kombination von Temozolomid und Capecitabin verabreicht wird, zeigten sich objektive Responderaten von etwa 50% und ein mittleres progressionsfreies Überleben von 18 Monaten. Dieses Protokoll kann als Alternative zu Streptozotocin/5-Fluorouracil angewandt werden und wird aufgrund der oralen Chemotherapie, der guten Verträglichkeit und guten therapeutischen Effizienz häufig bevorzugt eingesetzt [52, 53].

### Neuroendokrine Karzinome des gastroenteropankreatischen Systems

Die ENETS-Leitlinien empfehlen die Gabe von Cisplatin/ Etoposid als Standardchemotherapie für klein- und großzellige NEC des GEP-Systems. Bei lokalisierten Tumoren wird die Operation mit adjuvanter Chemotherapie diskutiert. Die primäre Chemotherapie ist bei bereits stattgefundener Fernmetastasierung indiziert. Bei der Cisplatin-Etoposid-Therapie müssen Nephro-, Oto- und Neurotoxizität beachtet werden [3, 52, 53, 59].

Eine Zweitlinienchemotherapie bei NEC des GEP-Systems ist bisher nicht etabliert worden [3, 59].

## 2. Grundlagen

### 2.1. Tropomyosin Rezeptor Kinase (TRK)

Als eine der größten Familien der Proteine, die vom humanen Genom kodiert werden, sind Proteinkinasen die zentralen Regulatoren der Signaltransduktion und kontrollieren verschiedene komplexe Prozesse der Zelle. Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK's) sind eine Untergruppe der Proteinkinasen, von denen es bis zu 100 Vertreter gibt, die an die Zellmembran gebunden spezifisch auf Tyrosin-Reste von Proteinen einwirken. Eine kleine Gruppe innerhalb dieser Subfamilie sind die Tropomyosin Rezeptor Kinasen, die in drei stark homologen Isoformen vorliegen – TrkA, TrkB und TrkC – und durch die Gene Neurotrophic tyrosine receptor kinases NTRK1, NTRK2 und NTRK3 codiert werden [65-67].

Sie und ihre Liganden spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und der Erhaltung des neuronalen Netzwerks. Sie regulieren Zellproliferation, Wachstum und Struktur von Axonen und Dendriten und die Expression und Aktivität von funktionell wichtigen Proteinen, wie Ionenkanäle und Neurotransmitterrezeptoren [68].

Die Auswirkungen der Trk-Rezeptor-Aktivierung können in verschiedenen Zellen differieren und sind abhängig von der Expression der Zwischenprodukte der unterschiedlichen Signalkaskaden und vom Membrantransport, der die Lokalisation verschiedener Signalwegbestandteile reguliert [68].

Zudem sind sie bedeutsam für die maligne Transformation von Zellen, Chemotaxis und Metastasierung. Sie scheinen an der Pathogenese einer Vielzahl von Tumoren sowohl neuronalen als auch nicht-neuronalen Ursprungs beteiligt zu sein [69].

Aktuelle Studien haben außerdem gezeigt, dass Neurotrophic tyrosine receptor kinases (NTRK) Genfusionen bei verschiedenen Karzinomen auftreten können und zu Überaktivierung der Trks in diesen Karzinomen führen können. Insbesondere bei diesen Tumoren können spezifische Trk-Inhibitoren zur Tumorthherapie eingesetzt werden [70-74].

#### 2.1.1. Entdeckung und Namensgebung

Ihren Namen erhielt diese Rezeptorfamilie von dem Onkogen, das zu ihrer Entdeckung geführt hatte. Dieses Onkogen wurde in Gen-Transfer-Assays aus einem Karzinom isoliert und besteht aus den ersten sieben von insgesamt acht Exons, die für ein nichtmuskuläres Tropomyosin

kodieren, das an die transmembranen und zytoplasmatischen Domänen einer neuartigen Tyrosinkinase gebunden ist [68]. Infolgedessen wurde das Protoonkogen Tropomyosin-related-kinase (Trk) genannt und wird jetzt auch als TrkA bezeichnet. Die Gene für TrkB und TrkC konnten aufgrund ihrer Homologie zu TrkA identifiziert werden. Ihre Sequenzen deuteten beim Vergleich mit anderen transmembranen Tyrosinkinasen darauf hin, dass es sich um eine neuartige Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen der Zelloberfläche handelt [68]. Spezifische Expressionsmuster innerhalb des Nervensystems legten nahe, dass sie eine Rolle in der Entwicklung und Funktion neuronaler Strukturen spielen [68].

1991 präsentierten zwei voneinander unabhängige Forschungsgruppen einen Nachweis, dass nerve growth factor (NGF) an TrkA-Rezeptoren bindet und sie aktiviert. In der Folge wurde gezeigt, dass TrkB und TrkC durch andere Neurotrophine aktiviert werden [68, 75].

### **2.1.2. Neurotrophine**

Neurotrophine sind eine Familie kleiner (ca. 13 kDa), stark basischer Proteine, die eine starke Homologie teilen und ähnliche biologische Signalantworten auslösen. Ihr erster Vertreter, Nerve Growth Factor (NGF) wurde in den 1940er Jahren entdeckt [76]. Ein weiteres Mitglied der Neurotrophin-Familie, wurde in den 1980ern identifiziert und benannt als Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). Kurze Zeit später waren zusätzlich NT3 und NT4/5 und im Verlauf auch NT6 und NT7 bekannt [76].

Die Neurotrophine werden als Prä-Propeptide synthetisiert und in Folge N-Terminal bearbeitet, sodass sie 3 kettenübergreifende Disulfid-Brücken enthalten. Jedes Protein-Monomer enthält eine verlängerte zentrale Achse, die aus einer antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur mit einer abgeflachten hydrophoben Oberfläche besteht, die an der Bildung von Dimeren beteiligt ist.

Diese, nicht kovalent gebundenen, Homodimere sind die zirkulierende Form der Neurotrophine [76].

Obwohl Neurotrophine an mehrere Zielrezeptoren binden können, haben sie unterschiedliche Zielrezeptoren, an die sie mit hoher Affinität binden. Die genaue Zuteilung ist in Abbildung 2 dargestellt. Zu erwähnen ist speziell der Neurotrophinrezeptor p75 (p75NTR), der zur Familie der TNF Rezeptoren/Fas/CD40 gezählt wird. Bei alleiniger Expression von p75 wirkt seine Stimulation durch NGF pro-apoptotisch. Sind sowohl p75 als auch Trk-Rezeptoren exprimiert, modifiziert p75 die Trk-Signalübertragung [77].

2001 publizierten Lee et al, dass die Neurotrophin-Vorläuferproteine, wie proNGF, mit hoher Affinität an den p75NTR binden und somit proapoptotisch wirksam sind. Die gesplattene, reife Form von NGF aktiviert bevorzugt Trk-Rezeptoren und fördert somit ein längeres Überleben der Zelle [78].

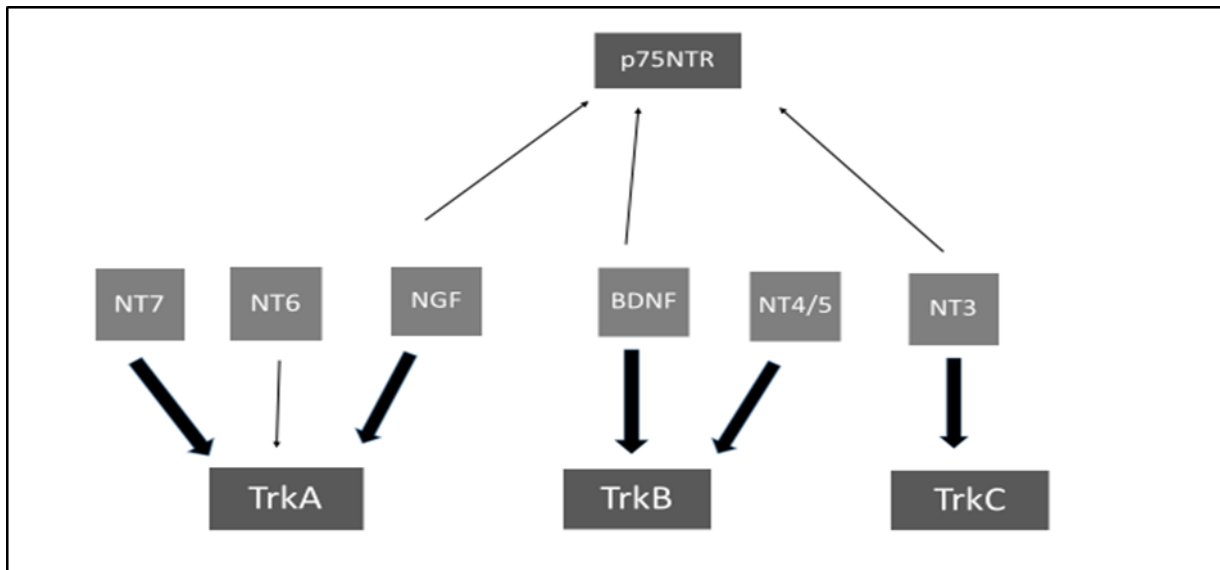


Abbildung 2, basierend auf [79]: Affinität der Neurotrophine zu ihren verschiedenen Rezeptoren; → = geringe Affinität, → = hohe Affinität

Aufgrund des differentiellen Splicings der mRNA, die für die verschiedenen Trk-Rezeptoren codiert, ist die oben dargestellte Spezifität der verschiedenen Neurotrophine gegenüber den einzelnen Rezeptoren eine starke Vereinfachung. Es konnte gezeigt werden, dass die An- oder Abwesenheit von kurzen Aminosäure-Sequenzen in der juxtamembranösen Region der Trk Rezeptoren diese Spezifität reguliert [68]. Eine Isoform von TrkA, der dieser kurze Baustein fehlt, kann zum Beispiel nur durch NGF effizient aktiviert werden. Bei Vorhandensein dieses Bausteins wird zusätzlich die Aktivierung von TrkA durch NT3 vermehrt [68]. Ähnlich verhält es sich auch bei TrkB Isoformen mit BDNF und NT3 und NT4/5 [68].

### **2.1.3. Struktur der Trk-Rezeptoren**

TrkA, TrkB und TrkC teilen eine erhebliche Sequenz-Homologie und einen konservierten Domänen-Aufbau. Dieser Aufbau umfasst von N-Terminus zu C-Terminus [79]:

- fünf extrazelluläre Domänen [79]
  - Zystein-reiche Region (Domäne 1)
  - Leukin-reiche Region (Domäne 2)
  - Zystein-reiche Region (Domäne 3)
  - Zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen (Domäne 4 und 5) [79]

Studien zu TrkB und TrkC haben gezeigt, dass die Domäne 5 für die Bindung des Liganden ausreichend und für dessen Bindungsspezifität verantwortlich ist [79].

- eine Transmembranregion [79]
- die intrazelluläre Kinase-Domäne [79]

### **2.1.4. Aktivierung und Signalwirkung von Trk-Rezeptoren**

Die Aktivierung der Trk-Rezeptoren durch Neurotrophine folgt dem allgemeinen kanonischen Schema, das für Rezeptor-Tyrosinkinase etabliert ist [77]: durch den Liganden wird eine Dimerisation induziert, was zu einer Aktivierung der Kinase-Aktivität und damit zur Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der „Aktivierungsschleife“ führt. Daraufhin kommt es zur vollen Aktivierung der Kinase und Autophosphorylierung von Tyrosinresten außerhalb der Schleife, wodurch Signalmoleküle an diese gebunden werden können. Diese Signalmoleküle werden dann phosphoryliert und damit aktiviert. Dadurch wird eine Rezeptor-unabhängige Signalkaskade in Gang gesetzt [77].

Neuere Daten zeigen, dass Trk-Rezeptoren – ähnlich wie der EGF-Rezeptor – auch durch mindestens zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den AdenosinA2a- und den PAC-1-Rezeptor, aktiviert werden können [68]. Die Aktivierung der Trk-Rezeptoren durch diese hat eine deutlich andere Kinetik und Erfordernisse, als die Aktivierung durch Neurotrophine. G-Protein-Rezeptor-vermittelte Aktivierung tritt mit außerordentlich langsamer Kinetik von Stunden statt Minuten ein und kann durch Chelatbildner von internem  $\text{Ca}^{2+}$  und durch Inhibitoren von Tyrosinkinase der Src-Familie verhindert werden [68].

### **PLC-γ1-Signalweg**

Wenn der Tyrosinrest Y785 an TrkA - und analoge Stellen an TrkB und TrkC - phosphoryliert wird, bindet er Phospholipase-C-γ1, die dann durch Phosphorylierung durch die Trk-Rezeptor-Kinase aktiviert wird. Aktivierte PLC-γ1 hydrolysiert PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) [68]. IP3 fördert die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus internen Speichern, was zu einer Aktivierung von Enzymen führt, wie Ca<sup>2+</sup> - regulierte Isoformen der Proteinkinase C und Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-regulierte Proteinkinase. DAG stimuliert DAG-regulierte Proteinkinase C Isoformen. PKCδ ist eine dieser Isoformen und aktiviert Erk1 und Erk2 in PC12 Zellen [68]. Sie scheint auch zwischen Raf und MEK in dieser Kaskade zu agieren. Der PLC-γ1-Signalweg erstreckt sich bis zum Zellkern. Hierbei ist besonders interessant, dass eine kurze Stimulation durch NGF eine Reihe von Transkriptions-Ereignissen hervorruft, die in einer Langzeitinduktion eines Natrium-Kanal-Gens resultieren [68].

Durch den Einsatz von lokalisationspezifischen Phosphotyrosin-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass ein kurzer Kontakt von PC12 Zellen mit NGF zu einer verlängerten Phosphorylierung von Y785 führt, die einige Stunden anhält. Die Resistenz dieser Region gegenüber Protein-Phosphatasen könnte eine Erklärung für die unerwartet lange Dauer der Induktion des Natrium-Kanal-Gens sein [68].

### **Ras-MAP-Kinase Signalweg**

Die Aktivierung der Ras-MAPK/ERK Signalkaskade ist essentiell für die durch Neurotrophine gesteuerte Differenzierung von Neuronen und PC12 Zellen. Mehrere Signalwege können von der Aktivierung des Trk-Rezeptors zur Aktivierung von Ras führen, wobei die meisten von ihnen die Phosphorylierung des Tyrosinrests Y490 zu beinhalten scheinen [68].

Die Anwesenheit von aktiviertem Ras stimuliert Signalantworten durch verschiedene nachfolgende Signalwege, welche die durch Klasse I PI3-Kinasen, Raf und p38MAP-Kinase vermittelten Kaskaden umfassen. Die Aktivierung von Erk1 und Erk2 benötigt die folgende Phosphorylierung von MEK1 und/oder MEK2 durch Raf, welche wiederum Erk1 und Erk2 phosphorylieren [68]. Ras-GTP aktiviert wahrscheinlich die p38MAP-Kinase über einen Signalweg, der die fortlaufende Aktivierung von RalGDS, Ral, and Src involviert. Diese aktiviert wiederum die MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase-2 [68].



Die Aktivierung von Ras leitet auch eine andere Signalkaskade ein, die unabhängig von Raf ist und durch Aktivierung von MEK3 und in der Folge MEK5 zu einer Aktivierung von Erk5 führt. Die Trk-Rezeptor-vermittelte Stimulation von Ras durch Shc und Grb2/SOS begünstigt eine vorübergehende, aber nicht verlängerte Aktivierung des Erk-Signalwegs [68].

Gegenüber der transienten Aktivierung der MAP-Kinase, die durch Shc, Grb2/SOS und Ras gefördert wird, hängt die verlängerte Erk-Aktivierung von einem bestimmten Signalweg ab, der das Adapterprotein Crk, den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor C3G, das kleine G-Protein Rap1, die Protein-Tyrosin-Phosphatase Shp2 und die Serin-Threonin-Kinase B-Raf involviert.

Die verschiedenen MAP-Kinasen, die durch Ras und Rap1 aktiviert werden, haben unterschiedliche nachfolgende Zielproteine, die miteinander arbeiten und die Gentranskription und Zelldifferenzierung regulieren [68].

Erk1, Erk2, und Erk5 Substrate umfassen die Rsk (ribosomal s6 kinase)-Familie der Proteinkinasen. Rsks und MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase-2 können jeweils CREB phosphorylieren. Dieses reguliert Gene, deren Produkte essentiell für die normale Differenzierung und verlängertes Überleben von Neuronen in vivo und in vitro sind [68].

Die verschiedenen MAP-Kinasen haben auch spezifische Transkriptionsfaktoren als Ziel. Zum Beispiel aktiviert Erk5, aber nicht Erk1 oder Erk2, MEF2 direkt, wohingegen Erk1 und Erk2, nicht aber Erk5, Elk-1 aktivieren [68].

Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass NGF-Aktivierung Erk1- und Erk2-vermittelte Signalkaskaden zwar lokal, aber nicht auf Distanz aktivieren kann, was seine Spezifität weiter erhöhen kann. Wenn NGF an den Wachstumskegeln von Axonen internalisiert und in den Zellkörper transportiert wird, scheint es nur Erk5 zu aktivieren [68].

### **PI3-Kinase Signalweg**

Die Produktion von P3-phosphorylierten Phosphoinositiden fördert das Überleben vieler Neuronen-Populationen [68]. Phosphatidylinositide werden durch die PI3-Kinase gebildet und aktivieren die PDK-1 (phosphatidylinositide-dependent protein kinase). Zusammen mit diesen 3-Phosphoinositiden aktiviert diese die Proteinkinase Akt, die dann einige Proteine phosphoryliert, die wichtig für das Zellüberleben sind. Klasse I PI3-Kinasen werden durch Ras-abhängige und –unabhängige Signalwege aktiviert [68].

Substrate von Akt umfassen Proteine, die in mehreren Schritten von Zelltod-Signalwegen involviert sind. Eines von diesen ist Bad, ein Mitglied der Bcl-2 Familie, und fördert die Apoptose durch die Sequestration von Bcl-XL, das sonst das proapoptotische Protein Bax inhibieren würde [68].

Die Aktivität der Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) wird ebenfalls negativ durch Akt-vermittelte Phosphorylierung reguliert. In kulturell gezüchteten Neuronen fördern erhöhte GSK3-Level die Apoptose. Aus diesem Grund trägt seine Inhibition durch Phosphorylierung zu den seinen das Überleben fördernden Effekten der Trk-Aktivierung bei [68].

Der inhibitorische Bindungspartner von NF $\kappa$ B ist I $\kappa$ B, welcher wiederum ein weiteres Substrat von Akt ist. Die durch Akt vermittelte Phosphorylierung von I $\kappa$ B führt zu seiner Degradation, was die Freisetzung von aktivem NF $\kappa$ B zur Folge hat. Es wurde gezeigt, dass die durch NF $\kappa$ B geförderte Gentranskription neuronales Überleben fördert [68].

Auch der Forkhead-Transkriptionsfaktor FKHRL1 ist ein Substrat von Akt. Seiner Phosphorylierung innerhalb des Zellkerns folgt die Bildung eines Komplexes aus FKHRL1 und 14-3-3. Dieser Komplex wird aus dem Zellkern exportiert und im Zytoplasma sequestriert. Da FKHRL1 die Expression einiger proapoptotischer Proteine, wie FasL, fördert, führt das Verhindern seines Eintritts in den Nukleus zum Überleben der Zelle [68]. Der PI3-Kinase Signalweg fördert aber nicht nur das Zellüberleben, denn es konnte gezeigt werden, dass Akt auch Zielproteine wie p70 und p86 S6 Kinasen aktiviert, die eine wichtige Rolle in der Translation einer Untergruppe von mRNAs, die beispielsweise für manche Cycline kodieren, spielen [68]. Außerdem rekrutieren die durch die PI3-Kinase gebildeten 3-Phosphoinositide viele Signalproteine zur Zellmembran. Diese umfassen Regulatoren der Cdc-42-Rac-Rho Familie der G-Proteine, welche durch Liganden der Trk-Rezeptoren aktiviert werden und das Verhalten des F-Aktin Zytoskeletts steuern. Es konnte gezeigt werden, dass eine lokalisierte Aktivierung der PI3-Kinase zu einer lokalisierten Aktivierung dieser G-Proteine führt, was eine gerichtete Zellmotilität ermöglicht [68].

## **2.2. Trk-Inhibitoren und antitumorale Therapie**

### **2.2.1. Larotrectinib und Entrectinib**

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Neurotrophic tyrosine receptor kinases (NTRK) Genfusionen bei verschiedenen Karzinomen in etwa 1% auftreten können und zu Überaktivierung der Trks in diesen Karzinomen führen können [70, 72].

2019 wurden Empfehlungen eines internationalen Expertenkonsensus zur tumoragnostischen Therapie von Patienten mit soliden Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität oder NTRK-Fusionen herausgegeben [80]. Patienten mit fortgeschrittenen metastasierten oder nicht-resektablen soliden Tumoren, die eine hohe Wahrscheinlichkeit einer NTRK-Fusion haben, sowie Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren mit einer hohen Inzidenz von NTRK-Fusionen, bei denen eine neoadjuvante Therapie vor Resektion in Erwägung gezogen wird, sollen auf eine solche getestet werden [80]. Bei vorliegender NTRK-Fusion wird eine Behandlung mit Trk-Inhibitoren stark empfohlen [80].

Der hoch selektive Trk-Inhibitor Larotrectinib wurde an 55 Patienten mit Tumoren, die positiv auf NTRK-Fusion getestet wurden, auf seine Wirksamkeit und Sicherheit untersucht [74]. Unabhängig vom Patientenalter oder der Tumorart sprachen 75% der Patienten positiv auf die Therapie an, davon hatten nach einem Jahr 71% ein andauerndes Ansprechen und 55% waren progressionsfrei [74, 81]. Für den Trk-Inhibitor Larotrectinib (Synonyme: LOXO-101, ARRY-470) wurde für die Therapie von Tumoren mit NTRK-Fusion 09/2019 von der European Medicines Agency (EMA) und 11/2018 von der FDA eine Zulassung erteilt [70-74, 82, 83].

Auch Entrectinib zeigte bei 54 getesteten Patienten mit NTRK-Fusion mit einer Odds ratio von 57,4% ein gutes Ansprechen [81, 84]. Bei 6% dieser Patienten lag ein neuroendokriner Tumor vor [84].

Für Entrectinib wurde von der FDA 08/2019 die Zulassung zur Behandlung von soliden Tumoren mit NTRK-Genfusionen und ROS-1-Fusions-positivem, metastasiertem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs erteilt [85]. Insgesamt zeigt dies das Potential der Trk-Inhibitoren in der molekular zielgerichteten Tumorthherapie auf.

Nur 0,3% der NEN-Patienten weisen NTRK-Fusionen auf [86].

Inwieweit auch Tumorentitäten ohne NTRK-Fusion eine hohe Expression von Trks aufweisen und welche Rolle Trk-Inhibitoren in diesem Setting spielen könnten ist Gegenstand der hier vorgelegten Untersuchung bei neuroendokrinen Tumoren.

### **2.2.2. GNF-5837**

GNF-5837 ist ein potenter, selektiver und oral bioverfügbarer pan-TRK-Inhibitor. Er wurde 2012 von Pam Albaugh et.al. am Genomics Institute of the Novartis Research Foundation (GNF) in Kalifornien, USA, entwickelt. Dazu wurde eine Reihe neuer Oxindol-Inhibitoren von Trk identifiziert und optimiert. GNF-5837 wurde an Ba/F3 Zellen und RIE (rat intestinal epithelial) Zellen, an denen die Expression von Trk A und NGF hervorgerufen wurde, getestet. An beiden Zelltypen konnte die antiproliferative Aktivität von GNF-5837 gezeigt werden [69].

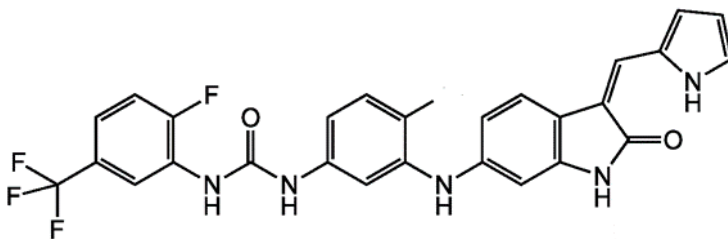


Abbildung 1: molekulare Struktur von GNF-5837 [69]

### 3. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Verfügen die neuroendokrinen Tumorzelllinien BON1, NCI-H727 und GOT1 über Rezeptoren der Trk-Familie?
2. Wie wirkt sich eine Inhibition von Trk-Rezeptoren durch GNF-5837 auf die Proliferation der untersuchten neuroendokrinen Tumorzelllinien aus?
3. Welche Signalwege werden durch Inhibition von Trk-Rezeptoren mit GNF-5837 bei diesen neuroendokrinen Tumorzellen beeinflusst?
4. Wie wirkt sich die Hemmung von Trk-Rezeptoren auf den Zellzyklus neuroendokriner Tumorzellen aus?
5. Eignen sich die für Trk-Rezeptoren spezifischen Neurotrophine NGF und BDNF im Serum als Tumormarker bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren?
6. Wie ist der Rezeptorstatus in Tumorgewebe bei Patienten mit NET und wie relevant sind vor diesem Hintergrund die in vitro untersuchten Trk-Rezeptoren im klinischen Alltag?

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material:

#### 4.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Albumin Solution from bovine serum 35% in DPBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat 50%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BDNF Human	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BDNF-DuoSet ELISA Development kit, DY248	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Cell Titer 96 Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Color Protein Standard, Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM/F12 – Medium (1:1) [GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol (70% vergällt mit Ketonen)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
GNF-5837	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Halt® (Protease&Phosphatase Cocktail)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
HCl 37%	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Insulin human (40 I.E./ml)	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Magic Mark™ XP Standard to Antibodies	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
M-PER® (Mammalian Protein Extraction Reagent)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Natriumchlorid	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
NGF recombinant human protein	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pen Strep	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Chemikalie	Hersteller
Propidiumiodid	Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Restore TM Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Rotigel 30 (30% Acrylamid)	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese SDS-Page	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiquant universal	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640-Medium (mit L-Glutamin, NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS (Natriumdodezylsulfat)	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-hydrochlorid	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris pufferan®	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma Base	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau 0,4%	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trypsin	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-NGF-ELISA development kit, 900-K60	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 5: verwendete Chemikalien

#### 4.1.2. Geräte

Gerät	Hersteller
Accuri® C6 Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Brutschrank CO2-AutoZero	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Countess® Automated Cell Counter	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
ECL Chemocam Imager	Intas, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer Protean II xi Cell	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Folienschweißgerät Folio	Severin, Sundern, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Comfort, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank -40°C	Eisvoigt Kältetechnik GesmbH, Graz Österreich
Gefriertruhe -80°C	Heraeus Instruments, Osterode Deutschland
Glomax Multi Detection System	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Inkubator	Memmert, Schwabach, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Comfort, Ochsenhausen, Deutschland
Labornetzgerät TNG 30	Voltcraft, Deutschland
Medingen-Wasserbad W-22	Funke Medingen, Deutschland
Millipore-Anlage Milli-Q	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Mikroskop-CK2	Olympus, Japan
Mikrozentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Mikrozentrifuge MC13	Millipore, MA, USA
Oberflächenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Orbital Shaker OS-20	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
PerfectBlue® Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Photometer Sunrise	TECAN, Männerdorf, Schweiz
Power Pac 3000	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus instruments Osterode, Deutschland
Stickstofftank	Messer Group, Bad Soden, Deutschland
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, München
Wärmeblock	Grant instruments, Cambridge, UK
Wasserbad GFL®	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge 3200	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 320 R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 6: verwendete Geräte



#### 4.1.3. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Combitips advanced® (0,5ml; 2,5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Costar® Stripette® (Polystyren Pipetten; 5ml, 10ml, 25ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Countess® (cell counting chamber slide)	Invitrogen, Oregon, USA
Eppendorfgefäße (200 µl; 1,5 ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon® Tube (15ml, 50ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Luer-Lok® Spritze (2ml; 20ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Minisart® High-Flow Filter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Microlance® Kanülen (20G)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Multiwell Tissue culture plate (96-well, 6.-well)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Parafilm“M“®	Pechiney plastic packaging, Chicago, IL, USA
Pasteurpipetten (Glas)	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysine Cellware 96-well plate	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Präzisionspipetten (10 µl, 200µl, 1000µl mit Filter)	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Tissue Culture Dish (100x200mm style)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Wypall Wischtücher	Kimberley-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe (175cm <sup>2</sup> )	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen mit PE-Kappe	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen easy flask® (75 cm <sup>2</sup> )	Nunc, Schwerte, Deutschland

Tabelle 7: verwendetes Verbrauchsmaterial

#### **4.1.4. Verwendete Puffer:**

Lysispuffer: 10µl Halt® auf 1ml M-PER®

SDS-Elektrophorese-Puffer:

- Laufpuffer: Rotiphorese SDS-Page
- Gelpuffer: 18,8g Tris, 0,4g Natriumdodezylphosphat (SDS) in 100 ml destilliertem Wasser mit HCl auf pH von 8,8 einstellen
- Probenpuffer: 1:10 Gelpuffer & 40% Glycerol, 2% Natriumdodezylsulfat (SDS), 1% Dithiothreitol, 0,25M Tris HCl

Blocking- & Inkubationspuffer: 2% Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk in TBS-Puffer (0,01M Tris HCl; 0,15M NaCl; 0,01% Natriumacid)

Waschpuffer: 0,01M Trizma®base & 0,2% Tween®20

## **4.2. Methoden:**

### **4.2.1. Zellkultur:**

#### **NET-Zelllinien**

Zelllinie	Primarius	Medium & Zusätze
BON1	Humane Karzinoid Zellen mit Ursprung im Pankreas [87-89]; Mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. med. R. Göke (Marburg, Deutschland)	DMEM/F12 Komplettmedium: & <ul style="list-style-type: none"><li>• 10% FCS</li><li>• 1% Penicillin-Streptomycin</li><li>• 0,4% Amphotericin B</li></ul> Oder als 10% FCS-Medium ohne weitere Zusätze.
NCI-H727	Humane Bronchuskarzinoid-Zellen [87, 90]; ATCC (Manassas, VA, USA)	RPMI-1640 Komplettmedium: & <ul style="list-style-type: none"><li>• 10% FCS</li><li>• 1% Penicillin-Streptomycin</li><li>• 0,4% Amphotericin B</li></ul> Oder als 10% FCS-Medium ohne weitere Zusätze.
GOT1	Humane Mitteldarmkarzinoid-Zellen [88, 91]; Mit freundlicher Unterstützung von O. Nilsson, MD, PhD (Göteborg, Schweden)	RPMI-1640 Komplettmedium: & <ul style="list-style-type: none"><li>• 10% FCS</li><li>• 1% Penicillin-Streptomycin</li><li>• 0,4% Amphotericin B</li><li>• 0,135 IE/ml Insulin</li><li>• 5 µg/ml Apo-Transferrin</li></ul> Oder als 10% FCS-Medium ohne weitere Zusätze

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete etablierte humane NET-Zelllinien

#### **Allgemeines**

Die aufgeführten Zelllinien wurden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in entsprechenden Nährmedien im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle Arbeiten an den Zellen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. BON1 und NCI-H727 wurden zwei Mal wöchentlich gesplittet, wobei erst das Nährmedium abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5ml PBS gewaschen wurden. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit 4 ml Trypsin (1:10 Verdünnung mit PBS), welches nach ca. 5 Minuten Einwirkzeit im Brutschrank durch 8 ml Medium deaktiviert wurde. Die Zellen wurden dann in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und für 5 Minuten bei 1200-1300 Umdrehungen/Minute

abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 6-12 ml Kompletmedium (mit Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B) wieder resuspendiert. GOT1-Zellen wurden aufgrund ihres - im Vergleich zu Bon1 und NCI-H727 Zellen - deutlich langsameren Wachstums in einem Intervall von 2-3 Wochen gesplittet und mit Accutase (statt Trypsin) mit 30-40 Minuten Einwirkzeit im Brutschrank abgelöst. Alle 3 bis 4 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

#### Bestimmung der Zellzahl:

10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypan – Blau Farbstoff gemischt und 10 µl davon in eine Countess® Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden im Countess® Automated Cell Counter ausgezählt.

#### Zellproliferationsassay

Um die Wirkung des untersuchten Trk-Inhibitors GNF-5837 auf Zellwachstum und – stoffwechsel zu überprüfen wurden Proliferations-Assays durchgeführt.

Die Zellen wurden in Kompletmedium mit Penicillin/Streptomycin und AmphotericinB auf 96-Well-Platten ausgesät. Um die äußeren Zellreihen vor Austrocknung zu schützen wurden die Randwells der Platte mit je 100 µl PBS bzw. am rechten Rand mit je 100 µl Medium gefüllt.

Um für alle Zelllinien eine vergleichbare Menge Zellen bei Stimulationsbeginn zu erreichen wurden - je nach Wachstumsgeschwindigkeit - unterschiedliche Zellzahlen ausgesät (BON1 1500 Zellen/Well; NCI-H727 2000 Zellen/Well; GOT1 50000 Zellen/Well).

Vor Stimulation wuchsen die Zellen für 24h im Brutschrank bei 37°C auf den Platten fest. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Wirkstoff, der in 0,2% BSA und 10% FCS-Medium (frei von Antibiotikum bzw. Antimykotikum) auf verschiedene Konzentrationen (0,1nM-500nM) verdünnt wurde, stimuliert.

Die Auswertung erfolgte nach 48, 96 und 144 Stunden durch Zugabe von 20µl Zelltiter-Lösung (Promega) pro Well. Nach Inkubation zwischen 1-3 Stunden im Brutschrank wurde die Extinktion bei 492 nm (Referenzfilter: 620 nm) photometrisch gemessen.

#### Proteinextraktion und Western Blot-Analyse

Um die Wirkung des untersuchten Inhibitors auf zelluläre Signalwege zu überprüfen, wurde eine Proteinextraktion und Western Blot-Analyse durchgeführt.

Hierfür wurden die Zellen, in der Menge entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit (BON1: 500 000 Zellen/Well; NCI-H727: 600 000 Zellen/Well; GOT1: 1 000 000 Zellen/Well),

auf 6-Well-Platten in Kompletmedium ausgesät und für 24 Stunden zum Anwachsen im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel auf reines 10% FCS-Medium (1ml/Well) und die Stimulation mit in 0,2% BSA verdünntem Wirkstoff.

#### Proteinextraktion:

Nach erfolgter Inkubation (Inkubationszeiten von 10 Minuten bis 48 Stunden) wurden die Wells zur Proteinextraktion abgesaugt und zweimal mit eiskaltem PBS (1ml/Well) gewaschen. Anschließend wurde der Lysispuffer (200µl/Well; Zusammensetzung s.o.) zugegeben, die Platten sofort auf Eis gestellt und anschließend über Nacht bei -40°C eingefroren.

Nach dem Auftauen der Platten wurde jedes Lysat in jeweils ein Eppendorfgefäß überführt. Diese wurden anschließend für 10 Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert, die Proteinkonzentrationen mittels der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt und diese dann durch Zugabe des Lysispuffers ausgeglichen.

#### Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot:

Zur Denaturierung für die Proteinextraktion wurden die Proben mit einem SDS-Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:4 versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden 50-70µl des Protein-Puffer-Gemischs, das ca. 5-20µg Protein enthielt, in die Polyacrylamid-Gel-Taschen (T=10%, T=12%, T=15%; Acrylamidkonzentration (T) entsprechend den zu untersuchenden Proteinmolekulargewichtsmassen) gegeben und bei 50mA/200V nach dem relativen Molekulargewicht aufgetrennt.

Als Molekulargewichtsstandard diente hierbei der Color Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs, #P7712) und der Magic Mark™ XP Standard to Antibodies (Invitrogen).

Dann wurden die aufgetrennten Proteine mittels Semi-Dry-Blotter innerhalb von 60 Minuten auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und damit immobilisiert. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran in TBS-T gewaschen und durch eine Behandlung von 30-minütiger Dauer mit Milchpulver-TBS-T-Puffer geblockt. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Erstantikörper bei Raumtemperatur über Nacht. Danach wurde die Membran auf einem Rotationsschüttler für dreimal 10 Minuten gewaschen.

Anschließend wurde die Membran für zwei Stunden mit dem Zweitantikörper inkubiert und dann gründlich gewaschen. Dann folgte das Versetzen der Membran mit dem SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate für 15 Minuten, damit die Peroxidase-Aktivität des

Zweitantikörpers nachgewiesen und die entstehende Chemolumineszenz mit dem ECL Chemochem Imager festgehalten werden konnte.

Die PVDF-Membran wurde schließlich mit Restore TM Plus Western Blot Stripping Buffer gestriipt und die Antikörper so wieder von der Membran entfernt. Diese wurde dann nach gründlichem Waschen wieder mit einem weiteren Erstantikörper versetzt und der Versuch in gleicher Vorgehensweise nochmals durchgeführt.

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Actin (A5441)	Sigma, St.Louis, USA
Anti-AKT (#2920)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-Bcl-2 (ab694)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Cyclin-D3 (#2936)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-EGFR (#4267)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti- Erk1/2 (06-182)	Merck-Millipore, Darmstadt, Germany
Anti-GSK3 (#5676)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-NGF (EP1320Y) (ab52918)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-pAKT (Ser473) (#4060)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-pEGFR (Tyr1068) (#3777)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-pERK (Thr202/Tye204) 1/2(#4370)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-pGSK3 (Ser21/9) (#8566)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-pp70S6K (Thr389) (#9234)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-pS6 (Ser240/4) (#5364)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-pTrkA (Tyr674/5)/pTrkB (Tyr706/7) (#4621)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-p21 Waf1/Cip1 (BD610233)	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Anti-p4EBP1 (#9644)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-p4EBP1 (Ser65) (#9451)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-p53 (sc-126)	Santa Cruz, Heidelberg, Germany
Anti-p70S6K (#9202)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-S6 (#2217)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-TrkA (#2508)	Cell Signaling Technology, MA, USA
Anti-TrkB (ab134155)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-TrkC (ab117966)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Trkpan (#4609)	Cell Signaling Technology, MA, USA

Tabelle 9: Primärantikörper für die Western Blot Analyse

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Meerrettich Peroxidase konjugierter Zweitantikörper – Maus, #7076	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:25000
Meerrettich Peroxidase konjugierter Zweitantikörper – Kaninchen, #7074	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:25000

Tabelle 10: Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse

### **FACS-Analyse**

Wie beim Western Blot wurden die Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät, inkubiert und stimuliert (s.o.). Nach 24 und 72 Stunden wurde jedes Wells mit dem vorhandenen Medium gespült, bevor dieses in Eppendorf-Gefäße überführt wurde. Im Anschluss wurden die Wells mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin (300 µl/Well) abgelöst. Nach 5 Minuten Inkubation wurde das Trypsin mit dem Medium aus den entsprechenden Eppendorf-Gefäß deaktiviert, das Well gespült und alles wieder in die Gefäße zurückgeführt. Nach Zentrifugieren (5min, 2000 Umdrehungen/Minute) der Proben wurde der Überstand aus den Eppendorf-Gefäßen abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (s.o.) und Absaugen erfolgte die Resuspension des Pellets in ca. 350 µl Propidiumiodid-Lösung. Die gemischten Proben wurden bis zu 2 Tage im Kühlschrank bei 4°C gelagert bevor sie durchflusszytometrisch gemessen wurden.

### **4.2.2. Patientenkohorte, Serumproben und Generierung eines Tissue Microarray (TMA)**

Patienten mit neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems, die am Klinikum der Universität München behandelt wurden, wurden in das NeoExNET (Network of Excellence for Neuroendocrine Tumors in Munich)-Programm rekrutiert. Dieses wurde durch die Ethikkommission der Universität München und den Datenschutzbeauftragten der Universität München genehmigt und alle Patienten hatten ihre schriftliche Zustimmung gegeben. Im Rahmen des NeoExNET Programms wurden von den eingeschlossenen Patienten in einem doppelt-pseudonymisierten Verfahren

- Klinische Daten zur Tumorerkrankung in einer Datenbank erfasst
- Serumproben für die Laboranalytik asserviert
  - Analysiert wurden die Serumproben von insgesamt 161 Patienten mit NET des Gastrointestinaltrakts. Davon waren 79 Proben von Patienten mit pankreatischen NET, von denen 22 nicht metastasiert und 57 metastasiert waren. 82 Serumproben stammten von Patienten mit NET des Ileum, davon 31 ohne Metastasen und 51 mit Metastasen.
- in Paraffin eingelegte Gewebeproben verwendet um einen Tissue Microarray (TMA) von GEP-NET Tumorproben zu generieren:
  - Der Tissue Microarray erfasste Tumorproben von 107 Patienten. Die Histologie wurde in allen Proben zur Bestätigung der Diagnose geprüft. Die Proben wurden

nach dem WHO 2010 Schema klassifiziert. Ein TMA wurde aus 0,6 cm-Stanzbiopsien aller Proben nach Standardvorgehen zusammengestellt [92, 93].

#### **4.2.2.1. NGF und BDNF im Serum mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die Serumspiegel von Nerve growth factor (NGF) und Brain-derived neurotrophic Factor (BDNF) in den Serumproben wurden mit einem handelsüblichen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (BDNF-DuoSet ELISA Development kit; DY248, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA;  $\beta$ -NGF-ELISA development kit; 900-K60, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) gemessen. Die Vorgehensweise entsprach der Anleitung des Herstellers. Die Detektionsgrenzen für NGF und BDNF lagen bei 5.0 pg/ml.

#### **4.2.2.2. Chromogranin A im Serum mittels IRMA**

In insgesamt 151 Serumproben von Patienten mit NET war zusätzlich zu NGF und BDNF auch der Tumormarker Chromogranin A im Rahmen der klinischen Patientenversorgung bestimmt worden. Davon stammten 76 Proben von Patienten mit pankreatischen NET, 55 metastasiert und 21 nicht metastasiert. 75 Serumproben waren von Patienten mit NET des Ileum, von denen 45 metastasiert und 30 nicht metastasiert waren. Der immunoradiometrische Assay (CIS-bio) wurde durch das Institut für Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Großhadern durchgeführt.

#### **4.2.2.3. Immunhistochemische Färbung des TMA**

Die immunhistochemische Färbung wurde mit TrkA(#2508) und Trk-pan (#4609) von Cell Signaling (Danvers, MA) durchgeführt. Die Platten wurden durch Kochen vorbehandelt und anschließend mit den Antikörpern inkubiert. Dann folgte der Nachweis der Antikörper mit einem biotinylierten anti-Maus Sekundär-Antikörper und einem Multilink Biotin-Streptavidin-verstärkten Nachweissystem (Biogenex, San Ramon, CA). Mit Hilfe eines Fast Red Chromogen Systems (DAKO, Hamburg, Germany) wurde die Färbung sichtbar gemacht. Eine 4-Stufen-Skala wurde als semi-quantitativer Score genutzt (0 = negative, 1 = schwache Expression, 2 = mittelgradige Expression, 3 = starke Expression).



### **4.2.3. Statistische Analyse**

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert (SD) aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt. Jeder Versuch zu Zellproliferation bestand aus mindestens 6 Proben pro Substanzkonzentration und Inkubationszeit. A priori-Tests wurden unter Berücksichtigung der Normalverteilung und Homogenität der Varianzen mit Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests und des Levene's Tests des SPSS statistical package SPSS (version 13.0 für Windows, SPSS Inc (2005), Chicago, USA) durchgeführt. Wenn parametrische Kriterien erfüllt wurden, wurde ein ANOVA-Vergleich der Mittelwerte mit einem post hoc Tukey-Test durchgeführt. Wurden nichtparametrische Kriterien erfüllt, erfolgte die Durchführung des Kruskal-Wallis und anschließend des Mann-Whitney-Tests. Die statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

Für die Immunhistochemie wurde ein Pearson-Chi-Square-Test durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Zellproliferationsassay

#### 5.1.1. Inhibition der Zellproliferation von GOT1 –Zellen durch den panTrk-Inhibitor GNF-5837

Im Zellproliferationsassay zeigt sich bei Zugabe des pan-Trk-Inhibitors GNF-5837 ein klarer, zeit- und dosisabhängiger Rückgang der Zellproliferation von GOT1-Mitteldarm-Zellen in vitro (Abbildung 3). Zu allen Testzeitpunkten nach Inkubation für 48, 96 und 144 Stunden können signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (control DMSO) festgestellt werden ( $p < 0.05$ ). Nach Inkubation für 48 und 96 Stunden mit einer GNF-5837-Konzentration von nur 5nM zeigen sich signifikante Unterschiede und die metabolische Aktivität sinkt auf  $78,45\% \pm 8,51\%$  und  $77,40\% \pm 8,83\%$  für diese beiden Zeitwerte [94]. Nach einer Inkubation für 144 Stunden kann ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration von 1nM beobachtet werden. Ein Rückgang der metabolischen Aktivität um bis zu  $86,43\% \pm 12,12\%$  kann gemessen werden [94]. Bei der höchsten verwendeten GNF-5837-Konzentration von 500nM zeigen sich die maximalen inhibitorischen Effekte mit einer Reduktion der Zellproliferation auf  $72,24\% \pm 8,93\%$ ;  $62,95\% \pm 10,86\%$  und  $51,33\% \pm 11,83\%$  nach jeweils 48, 96 und 144 Stunden Inkubation [94].

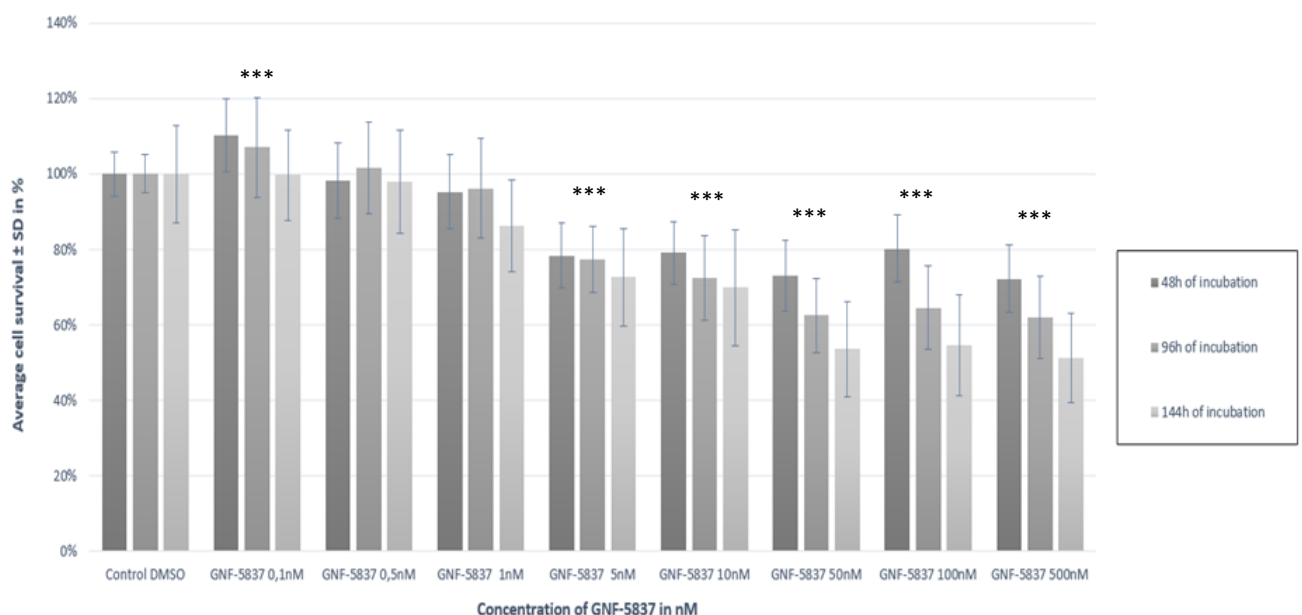


Abbildung 3: Zellproliferation von GOT1-Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten und Konzentrationen von GNF-5837 [94]; \*\*\* $p < 0,001$

Tabelle 11 zeigt die IC<sub>20</sub> Konzentration von GNF-5837 von allen drei Inkubationszeiten bei GOT1-Zellen. Der höchste IC<sub>20</sub> Wert mit 4,30nM tritt bei der kürzesten Inkubationszeit von 48 Stunden auf und der niedrigste IC<sub>20</sub> Wert von 2,45nM bei der längsten Inkubationszeit von 144 Stunden [94]. Diese Beobachtung ist erklärbar durch die langsame Proliferation von GOT1-Zellen – in der Literatur wurde für die GOT1-Zellen eine Verdoppelungszeit von 101 Stunden beschrieben [88]. Die IC<sub>50</sub> wurde nur für die effektivste Inkubationszeit (144 Stunden) berechnet und der angegebene Wert stützt sich hier auf die gewonnenen Daten, nicht auf eine Berechnung mit einer künstlichen Funktion. Aus diesem Grund ist der Wert eine Schätzung mit Berücksichtigung der Standardabweichung (Tabelle 12) [94].

20% Inhibitory Concentration (IC <sub>20</sub> ) of GNF-5837 in GOT1 cells after different times of incubation	
48h	IC <sub>20</sub> = 4,30nM
96h	IC <sub>20</sub> = 4,23nM
144h	IC <sub>20</sub> = 2,45nM

Tabelle 11: IC<sub>20</sub>-Werte (nM) der durch GNF-5837 vermittelten Inhibition der Proliferation von GOT1-Zellen nach 48, 96 und 144 Stunden Inkubation [94]

50% inhibitory concentration (IC <sub>50</sub> ) of GNF-5837 in GOT1 cells after 144h of incubation	
144h	IC <sub>50</sub> ~ 500nM

Tabelle 12: angenäherter IC<sub>50</sub>-Wert (nM) der durch GNF-5837 vermittelten Inhibition der Proliferation von GOT1-Zellen nach 144 Stunden Inkubation [94]

Die Tabellen 13-15 zeigen die Gegenüberstellung verschiedener Konzentrationen GNF-5837 und ihre Auswirkung auf die Zellproliferation von GOT1-Zellen für alle drei Inkubationszeiten. Dabei steht NS für „nicht signifikant“.

Nach 48 Stunden Inkubation zeigt sich eine bessere Wirksamkeit von GNF-5837 mit ansteigender Dosierung im Bereich von 0,1nM bis 5nM mit Ausnahme der Konzentrationssteigerung von 0,5nM auf 1nM. Hier besteht kein signifikanter Unterschied der Zellproliferation. Ab einer Konzentration von 5nM zeigt sich kein zusätzlicher Effekt von GNF-5837 bei höheren Konzentrationen bis 500nM nach 48 Stunden Inkubation [94].

Sig.Dif. GOT1 -48h-	KDMSO	GNF 0,1nM	GNF 0,5nM	GNF 1nM	GNF 5nM	GNF 10nM	GNF 50nM	GNF 100nM	GNF 500nM
KDMSO	—								
GNF 0,1nM	*** high	—							
GNF 0,5nM	NS	**	—						
GNF 1nM	NS	***	NS	—					
GNF 5nM	***	***	***	***	—				
GNF 10nM	***	***	***	***	NS	—			
GNF 50nM	***	***	***	***	NS	NS	—		
GNF 100nM	***	***	***	***	NS	NS	NS	—	
GNF 500nM	***	***	***	***	NS	NS	NS	*	—

Tabelle 13: Vergleich der Auswirkung verschiedener Konzentrationen GNF-5837 auf die Zellproliferation von GOT1-Zellen nach 48 Stunden Inkubation [94]

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Nach 96 Stunden Inkubation zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Zellproliferation von GOT1-Zellen im niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 0,1nM und 1nM. Ab einer Konzentration von 5nM zeigt sich eine mit der Konzentration ansteigende signifikante Verbesserung der Inhibition der Zellproliferation. In hohen Dosisbereichen zwischen 50nM und 500nM ist allerdings kein signifikanter Unterschied mehr erkennbar. Eine Dosissteigerung ab 50nM hat demnach keinen stärkeren Effekt auf die Zellproliferation bei einer Inkubationszeit von 96 Stunden [94].

Sig.Dif. GOT1 -96h-	KDMSO	GNF 0,1nM	GNF 0,5nM	GNF 1nM	GNF 5nM	GNF 10nM	GNF 50nM	GNF 100nM	GNF 500nM
KDMSO	_____								
GNF 0,1nM	NS	_____							
GNF 0,5nM	NS	NS	_____						
GNF 1nM	NS	*	NS	_____					
GNF 5nM	***	***	***	***	_____				
GNF 10nM	***	***	***	***	*	_____			
GNF 50nM	***	***	***	***	***	*	_____		
GNF 100nM	***	***	***	***	***	NS	NS	_____	
GNF 500nM	***	***	***	***	***	**	NS	NS	_____

Tabelle 14: Vergleich der Auswirkung verschiedener Konzentrationen GNF-5837 auf die Zellproliferation von GOT1-Zellen nach 96 Stunden Inkubation [94]

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Nach 144 Stunden Inkubation zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Zellproliferation von GOT1-Zellen bei der Konzentrationserhöhung von GNF-5837 ab 1nM bis 5nM. Eine Konzentrationserhöhung von 5nM auf 10nM zeigt keine signifikanten Effekte [94]. Bei einer weiteren Konzentrationserhöhung auf 50nM wird eine signifikant bessere Inhibition der Zellproliferation erreicht, wobei eine weitere Konzentrationserhöhung auf bis zu 500nM keine zusätzlichen inhibitorischen Effekte zeigt [94].

Sig.Dif. GOT1 -144h-	KDMSO	GNF 0,1nM	GNF 0,5nM	GNF 1nM	GNF 5nM	GNF 10nM	GNF 50nM	GNF 100nM	GNF 500nM
KDMSO	—								
GNF 0,1nM	NS	—							
GNF 0,5nM	NS	NS	—						
GNF 1nM	**	***	*	—					
GNF 5nM	***	***	***	**	—				
GNF 10nM	***	***	***	***	NS	—			
GNF 50nM	***	***	***	***	***	**	—		
GNF 100nM	***	***	***	***	***	**	NS	—	
GNF 500nM	***	***	***	***	***	***	NS	NS	—

Tabelle 15: Vergleich der Auswirkung verschiedener Konzentrationen GNF-5837 auf die Zellproliferation von GOT1-Zellen nach 144 Stunden Inkubation [94]

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001



### **5.1.2. Inhibition der Zellproliferation von GOT1 –Zellen nach Inkubation mit dem panTrk-Inhibitor GNF-5837 und dem mTOR-Inhibitor Everolimus (RAD001)**

Die Zellproliferation wurde zusätzlich nach kombinierter Gabe von GNF-5837 und dem mTOR-Inhibitor Everolimus (RAD001) analysiert. Die Kombination von GNF-5837 500nM mit RAD001 10nM zeigt nach 144 Stunden eine signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation gegenüber der Gabe nur einer der beiden Substanzen (Abbildung 6) [94].

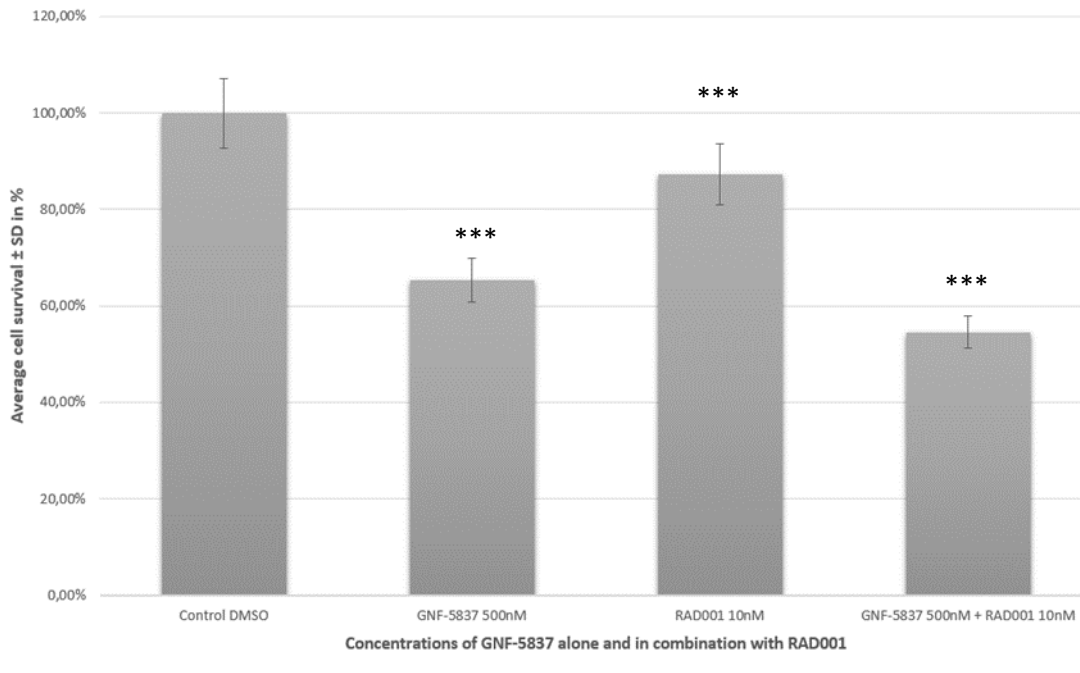


Abbildung 6: Effekte von GNF-5837 in Kombination mit RAD001 auf die Zellproliferation von GOT1-Zellen nach 144 Stunden Inkubation [94]; \*\*\*p<0,001

Tabelle 16 zeigt die Gegenüberstellung von GNF-5837 500nM, Rad001 10nM und eine Kombination beider Wirkstoffe und ihre Auswirkung auf die Zellproliferation von GOT1-Zellen für eine Inkubationszeit von 96 Stunden. Hier bestehen eine signifikant bessere Wirksamkeit von Rad001 gegenüber GNF-5837, sowie eine bessere Wirksamkeit der Kombination als der beiden Wirkstoffe im Einzelnen in Bezug auf die Inhibition der Zellproliferation von GOT1-Zellen [94].

<u>Sig.Dif.</u> <u>GOT1</u> <u>-96h-</u>	<u>KDMSO</u>	<u>GNF</u> <u>500nM</u>	<u>Rad001</u> <u>10nM</u>	<u>GNF</u> <u>500nM</u> <u>±</u> <u>Rad001</u> <u>10nM</u>
<u>KDMSO</u>	—			
<u>GNF</u> <u>500nM</u>	***	—		
<u>Rad001</u> <u>10nM</u>	***	*** <u>high</u>	—	
<u>GNF</u> <u>500nM</u> <u>±</u> <u>Rad001</u> <u>10nM</u>	***	***	***	—

Tabelle 16: Vergleich der Auswirkung von GNF-5837, Rad001 und einer Kombination beider Wirkstoffe auf die Zellproliferation von GOT1-Zellen nach 96 Stunden Inkubation[94]

\*\*\*p<0,001

### 5.1.3. Keine Effekte auf die Zellproliferation von NCI-H727- und BON1-Zellen durch den panTrk-Inhibitor GNF-5837

GNF-5837 wurde auch an der humanen pulmonalen Karzinoid-Zelllinie NCI-H727 und der humanen pankreatischen neuroendokrinen Tumorzelllinie BON1 getestet (Abbildung 4 und 5). Hier zeigt sich allerdings keine Inhibition des Zellwachstums durch GNF-5837 nach 48, 96 oder 144 Stunden. Dies kann durch das Fehlen der Expression von Trk-Rezeptoren in diesen Zelllinien erklärt werden (Abbildung 7) [94]. Beispielhaft werden die Ergebnisse nach 96 Stunden Inkubation in Abbildung 4 und 5 gezeigt. Diese werden hier als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Auf eine genauere statistische Auswertung wurde aufgrund des fehlenden Ansprechens verzichtet [94].

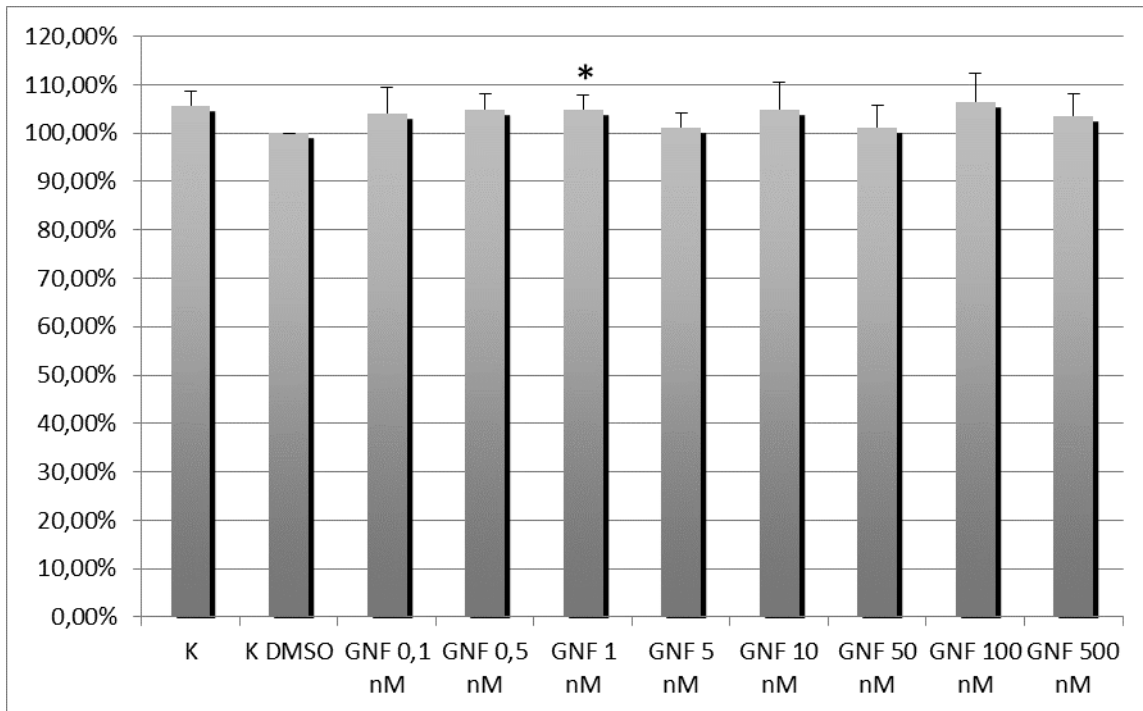


Abbildung 4: Proliferation von NCI-H727-Zellen nach 96 Stunden Inkubation mit GNF-5837 [94]  
\*p<0,05

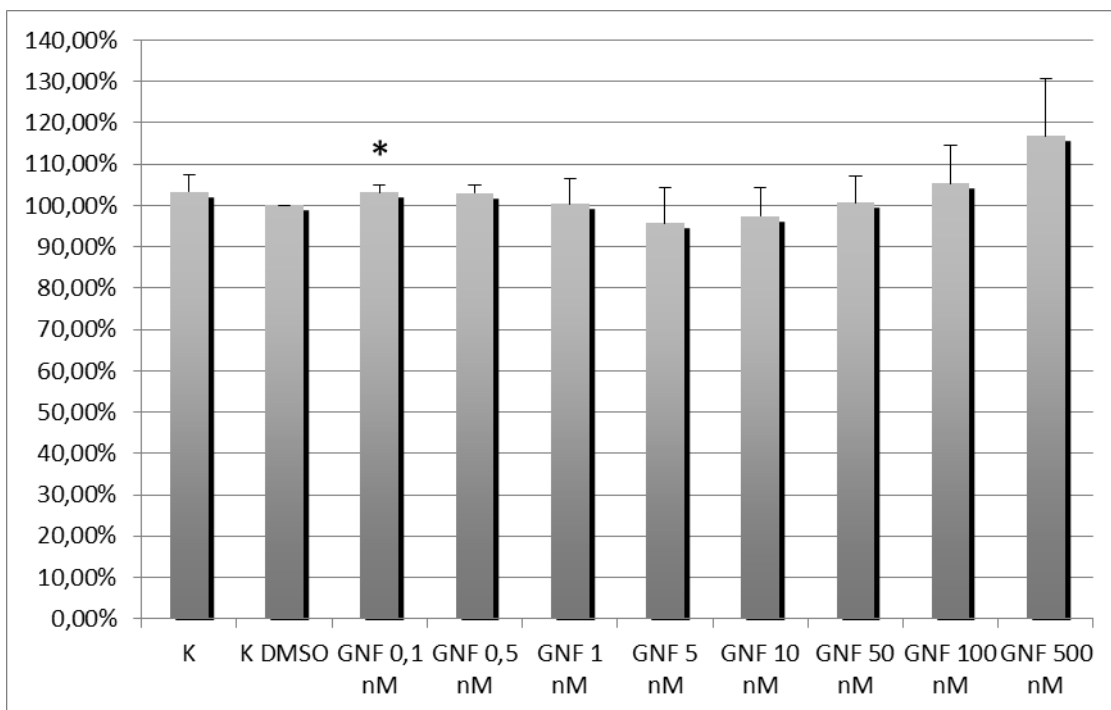


Abbildung 5: Proliferation von BON1-Zellen nach 96 Stunden Inkubation mit GNF-5837 [94]  
\*p<0,05

## 5.2. Western Blot-Analyse

### 5.2.1. Proteinexpression von Trk-Rezeptoren in BON1, NCI-H727, GOT1

In der Western Blot-Analyse bezüglich der Expression von Trk-Rezeptoren in den verwendeten NET-Zelllinien ist kein Nachweis von TrkA, TrkB oder TrkC in BON1- und NCI-H727-Zellen möglich (Abbildung 7). Auch die Testung mit dem pan-Trk-Antikörper ist bei diesen beiden Zelllinien negativ (Abbildung 7) [94]. In den humanen Mitteldarm-Karzinoidzellen GOT1 zeigen sich dagegen deutliche Level der TrkA-Expression, eine leichte TrkC-Expression, jedoch keine TrkB-Expression (Abbildung 7). Als Positivkontrolle für alle drei Typen von Trk-Rezeptoren dienten Lysate aus humanem adulten Gehirngewebe (ab29466, Abcam, Cambridge, UK) (Abbildung 7) [94].

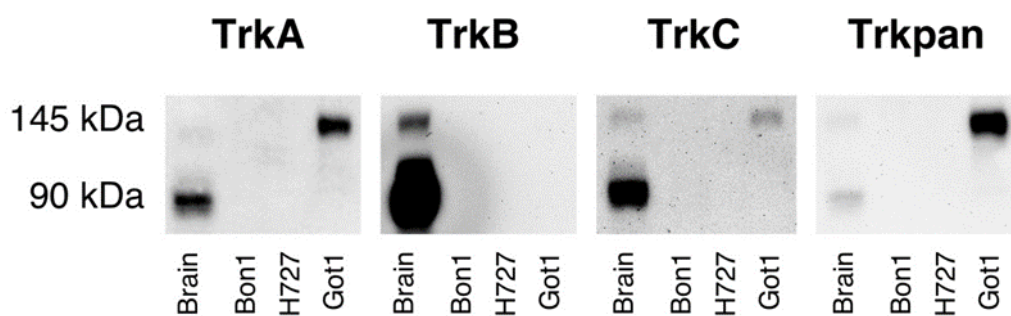


Abbildung 7: Expressionslevel der verschiedenen Trk-Rezeptoren (TrkA, TrkB, TrkC und pan-Trk) in den neuroendokrinen Tumorzelllinien BON1, NCI-H727 und GOT1 und der Positivkontrolle – humanes adultes Gehirngewebe [94]

### 5.2.2. Expression von NGF in BON1, NCI-H727, GOT1

Sowohl BON1- als auch NCI-H727-Zellen exprimieren Nerve growth factor (NGF), wobei NCI-H727 das höchste Expressionslevel der drei untersuchten Zelllinien zeigt. In GOT1-Zellen kann dagegen keine klare Expression von NGF in der Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 8) [94]. Eine Hypothese hierzu ist, dass die Expression von NGF in den Zellen mit fehlendem spezifischen Rezeptor höher ist, da es hier zu keiner Änderung der zellulären Signalwege kommt. Die niedrige Expression von NGF in GOT1-Zellen hingegen kommt durch die Anwesenheit des TrkA-Rezeptors zustande, infolgedessen diese empfindlich auf diese Signalübertragung sind [94].

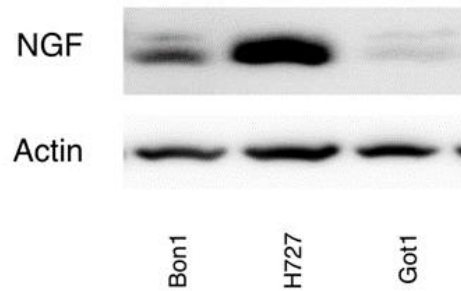


Abbildung 8: Basislevel der NGF-Expression in den neuroendokrinen Tumorzelllinien BON1, NCI-H727 und GOT1 [94]

### 5.2.3. Phosphorylierung von TrkA in GOT1-Zellen nach Stimulation und Inhibition

Unterschiedliche Konzentrationen von NGF bewirkten bei einer Inkubationsdauer von 10 Minuten eine Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors in GOT1-Zellen. Verschiedene Konzentrationen BDNF hingegen konnten keine TrkA-Phosphorylierung stimulieren. Bei steigenden NGF-Konzentrationen wurde eine verstärkte Phosphorylierung von TrkA beobachtet. Als Grundsatzbeweis konnte die Funktionalität des TrkA-Rezeptors in GOT1-Zellen durch seinen spezifischen Liganden NGF gezeigt werden (Abbildung 9) [94].

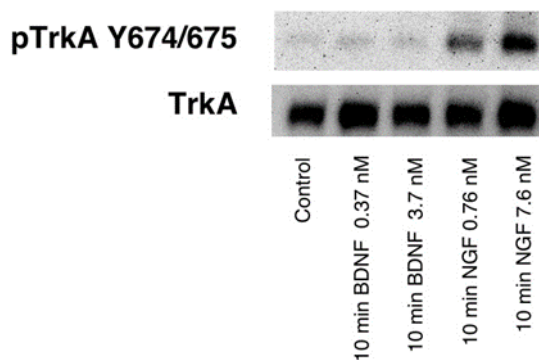


Abbildung 9: Repräsentativer Blot der ausbleibenden pTrkA-Expression nach BDNF Stimulation und Induktion der pTrkA-Expression durch NGF-Stimulation in GOT1-Zellen. Die Zellen wurden mit BDNF in den Konzentrationen 0,37nM und 3,7nM und mit NGF in den Konzentrationen 0,76nM und 7,6nM für jeweils 10 Minuten stimuliert [94].

Das Ausbleiben der TrkA-Phosphorylierung nach Inkubation mit dem panTrk-Inhibitor GNF-5837 für 2 Stunden, ist durch die Inhibition des Rezeptors durch GNF-5837 zu erklären. NGF wiederum bewirkt eine Phosphorylierung nach 10 Minuten Inkubation [94]. Folglich kommt es bei einer kombinierten Anwendung von Ligand (NGF) und Inhibitor (GNF-5837) zu einer Abnahme der pTrka-Expression im Vergleich zur alleinigen NGF-Stimulation. Dies beweist die inhibitorische Eigenschaft von GNF-5837 auf TrkA [94].

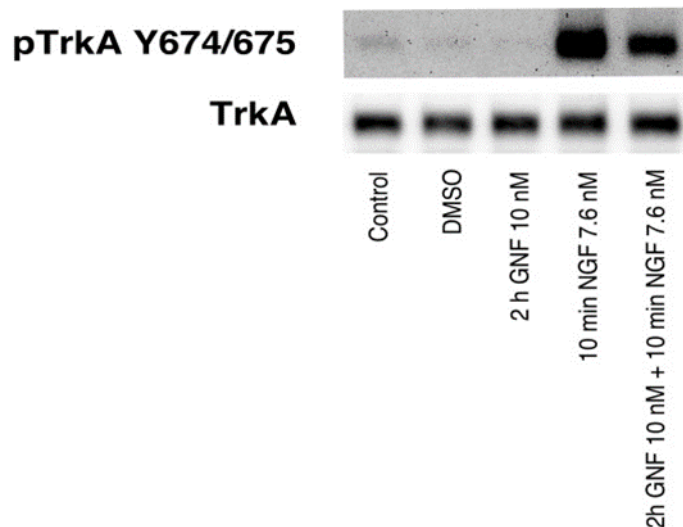


Abbildung 10: Der Western Blot zeigt die Expression von pTrkA in GOT1-Zellen nach 2 Stunden Inkubation mit GNF-5837 10nM, nach 10 Minuten Inkubation mit NGF 7,6nM und nach einer Kombination beider [94]

Der Phosphorylierungsstatus von TrkA nimmt mit der kontinuierlichen Konzentrationserhöhung des pan-Trk-Inhibitors GNF-5837 von 5nM, 50nM bis hin zu 500nM ab. Die stärksten Effekte der Dephosphorylierung zeigen sich bei der höchsten verwendeten Konzentration des Inhibitors. Diese konzentrationsabhängige Dephosphorylierung besteht bei allen Inkubationszeiten [94]. Interessanterweise wird die Expression von TrkA nach längerer Inkubationsdauer (24, 48 und 72 Stunden) mit dem panTrk-Inhibitor GNF-5839 hochreguliert. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Hochregulation durch einen kompensatorischen Feedback-Mechanismus als Reaktion auf die dauerhafte Rezeptorhemmung zustande kommt [94].

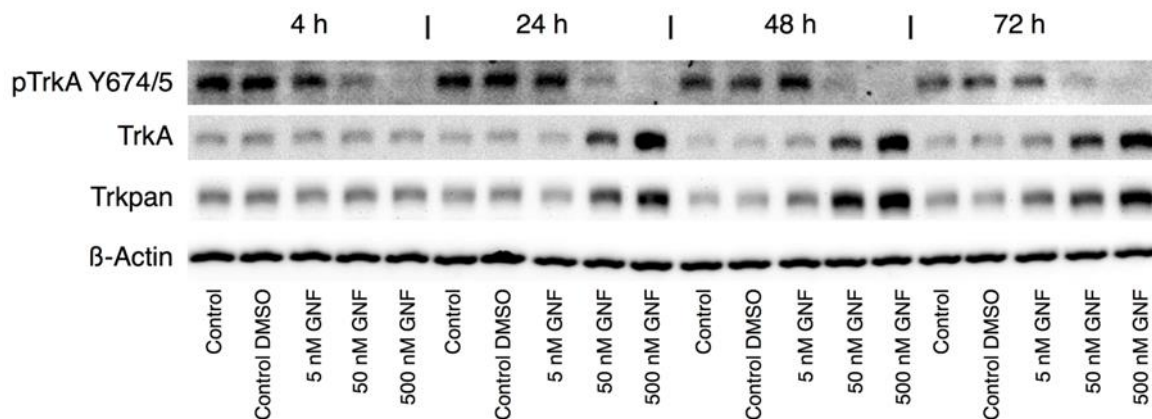


Abbildung 11: Expressionslevel des pan-Trk-Rezeptors, des TrkA-Rezeptors und seiner Phosphorylierungslevel nach verschiedenen Inkubationsdauern (4, 24, 48 und 72 Stunden) mit GNF-5837 in steigender Konzentration (5nM, 50nM und 500nM) in GOT1-Zellen [94]

#### **5.2.4. Wirkung von GNF-5837 auf zelluläre Signalwege in GOT1-Zellen**

Kürzlich wurde gezeigt, dass der panTrk-Inhibitor GNF-5837 effektiv in durch Trk-regulierte, Karzinom-spezifische Signalwege eingreift [69]. In der Western Blot-Analyse (Abbildung 12) wurde untersucht, welche Signalwege durch die inhibitorische Funktion von GNF-5837 (5nM, 50nM und 500nM) nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden betroffen sind. Der PI3K-Akt-mTor Signalweg, einer der wichtigsten zellulären Signalwege, der während der Karzinogenese und Tumorpheriferation oft aktiviert ist [95], wird durch die Behandlung mit GNF-5837 deutlich herabreguliert. Die Hauptkomponenten dieses Signalwegs, wie pAkt, pp70S6K, pS6 und p4EBP1 sind herabreguliert. Der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg, der ebenfalls an der Karzinomentstehung und Proliferation beteiligt ist, wird auch durch GNF-5837 gehemmt. Das Expressionslevel seiner Schlüsselkomponente pErk nimmt nach Inkubation mit dem pan-Trk-Inhibitor ab. Interessanterweise ist auch das Expressionslevel des anti-apoptotischen Bcl2 rückläufig, was eine Verstärkung der apoptotischen Zelltodmechanismen bedeuten kann [94].

Weitere untersuchte Proteine und Inkubationszeiten mit GNF-5839 und NGF von GOT1-Zellen in der Western Blot-Analyse sind den ergänzenden Abbildungen 5, 6 und 7 im Anhang zu entnehmen [94].

Auch die ausgewerteten Western Blot-Analysen für BON1- Zellen und NCI-H727-Zellen, die aufgrund des fehlenden Rezeptors keinen Einfluss von GNF-5837 auf die entsprechenden Signalwege zeigen, sind im Anhang aufgeführt (ergänzende Abbildung 8) [94].

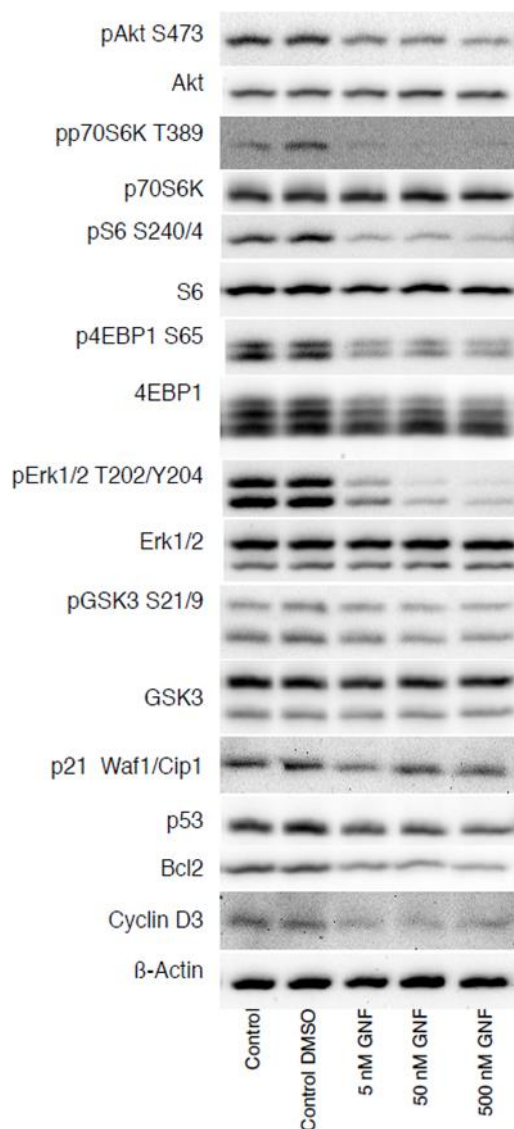


Abbildung 12: Effekt verschiedener Konzentration GNF-5837 (5nM, 50nM und 500nM) auf die Expressionslevel verschiedener Signalwegkomponenten, die wichtig für die Karzinogenese und Proliferation sind, nach 24 Stunden Inkubation in GOT1-Zellen [94]



### 5.2.5. Wirkung von GNF-5837 in Kombination mit RAD001 auf zelluläre Signalwege in GOT1-Zellen

Da im Proliferationsassay eine signifikant gesteigerte Hemmung der Zellproliferation von GOT1-Zellen bei Kombination von Everolimus (RAD001) mit GNF-5837 gegenüber der alleinigen Gabe der einzelnen Substanzen festgestellt wurde, wurde die Auswirkung dieser Kombination auf zelluläre Signalwege bei GOT1-Zellen im Western Blot untersucht. Hier zeigt sich eine agonistische Herabregulation von Komponenten des PI3K-Akt-mTor-Signalwegs und auch Cyclin D3 (Abbildung 13) [94].

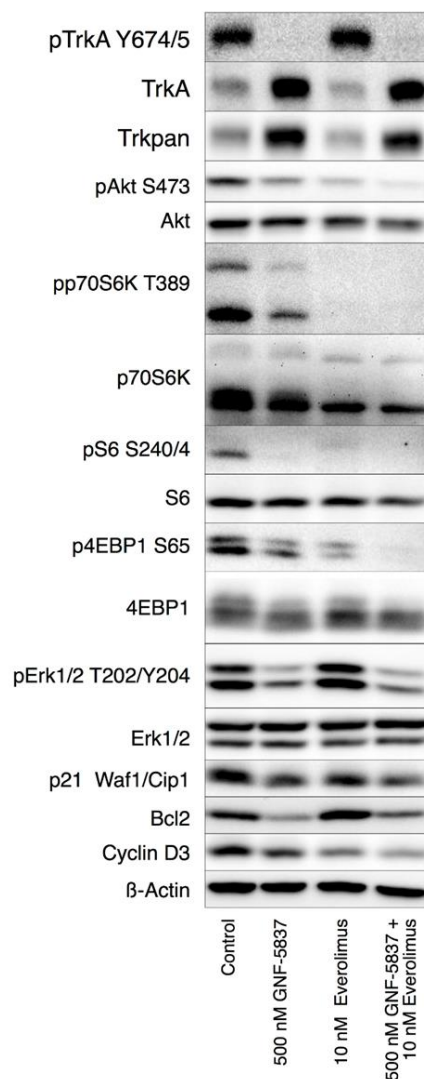


Abbildung 13: Effekt von GNF-5837 500 nM und RAD001 10 nM (Everolimus) alleine und in Kombination auf Expressionslevel verschiedener Signalwegkomponenten, die wichtig für die Karzinogenese und Proliferation sind, nach 24 Stunden Inkubation in GOT1-Zellen. Hier ist einer von drei unabhängigen Versuchen dargestellt [94]

### 5.3. FACS-Analyse

Um den Einfluss von GNF-5837 auf den Zellzyklus und die Apoptose genauer zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

Es wurden drei unabhängige Versuche mit GOT1-Zellen durchgeführt, die jeweils mit 5nM und 500nM GNF-5837 für 72 Stunden inkubiert wurden. Hier zeigt sich ein signifikanter ( $p < 0,01$ ) G1-Arrest und eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen in der S-Phase. Bei einer Konzentration von 5nM zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 14). Der prozentuale Anteil der GOT1-Zellen in der Sub-G1-Phase – welche apoptotische Zellen anzeigt - nach Inkubation mit GNF-5837 5nM und 500nM ist separat in Abbildung 15 dargestellt. Auch hier zeigen sich eine signifikante Erhöhung des Anteils der Zellen in der Sub-G1-Phase bei 500nM und keine signifikante Veränderung bei einer Konzentration von 5nM [94].

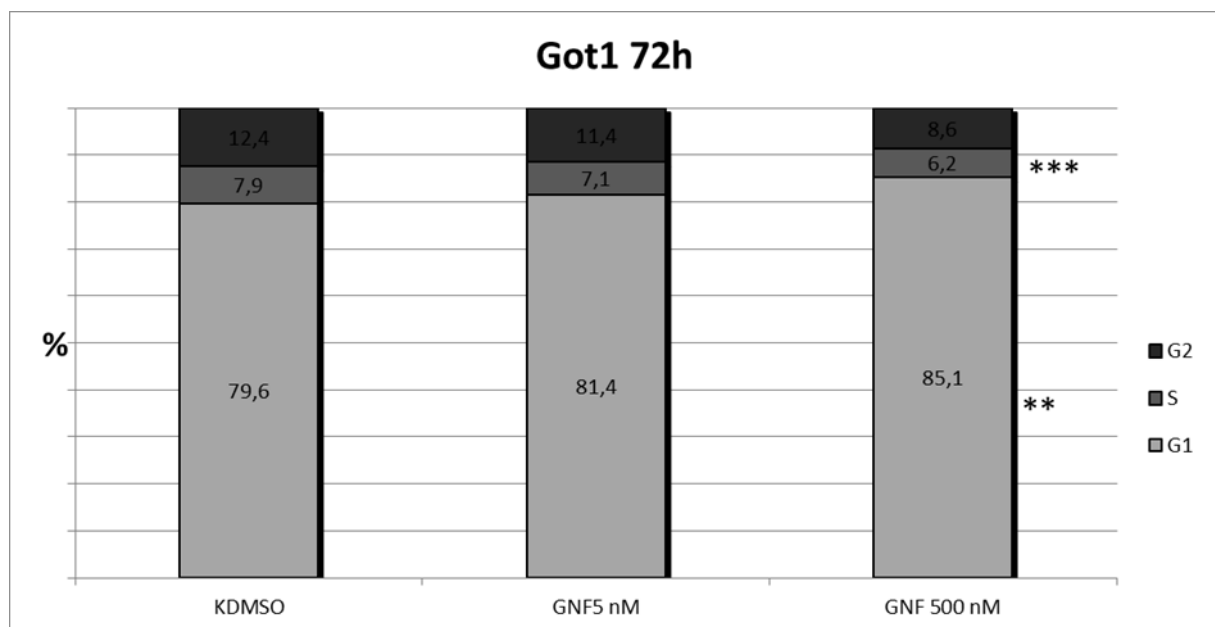


Abbildung 14: Prozentualer Anteil von GOT1-Zellen in G2-, S- und G1-Phase des Zellzyklus nach 72h Inkubation mit GNF-5837 in einer Konzentration mit 5nM und 500nM [94]

\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

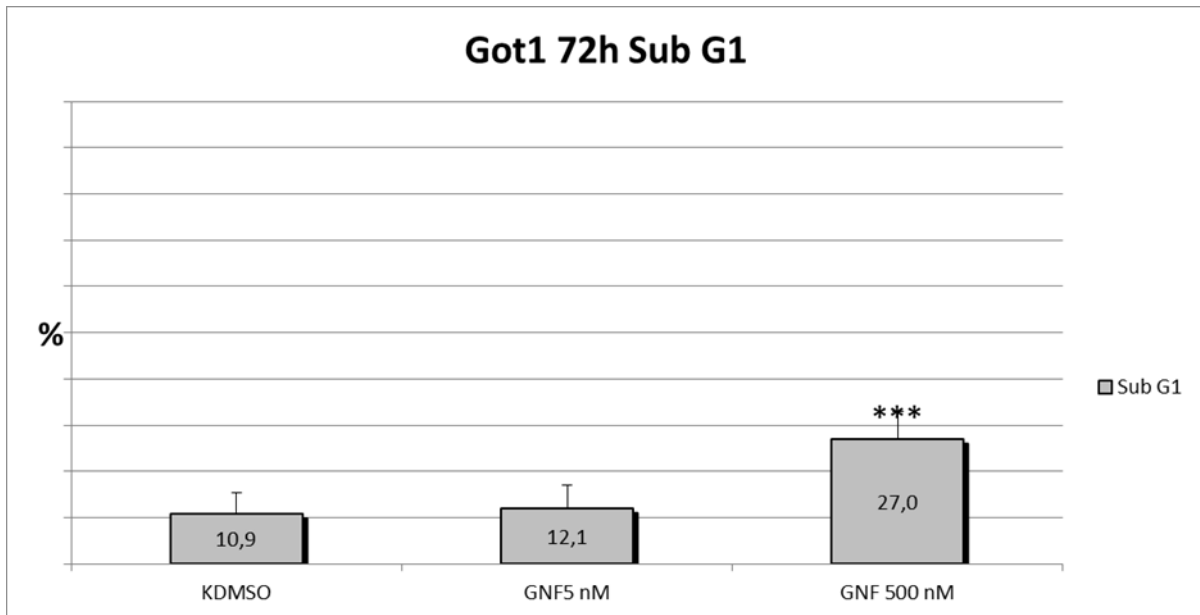


Abbildung 15: Prozentualer Anteil von GOT1-Zellen in der Sub-G1-Phase nach 72h Inkubation mit GNF-5837 in einer Konzentration von 5nM und 500nM [94]

\*\*\*p<0,001

#### **5.4. CgA-, NGF- und BDNF Serumspiegel bei NET-Patienten mit und ohne Metastasen**

Patienten mit NET ohne Metastasen zeigen niedrigere CgA-Spiegel (206,7ng/ml ± 378,3ng/ml) als Patienten mit Metastasen (1694ng/ml ± 6557ng/ml). Daher ist CgA als laborchemischer Marker für NET etabliert. NGF zeigt im Gegensatz hierzu keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit metastasierten NET (78,09pg/ml ± 375,8pg/ml) im Vergleich zu Patienten mit nicht-metastasierten NET (169,8pg/ml ± 542,5pg/ml). NGF eignet sich somit nicht als Tumormarker/Verlaufsmarker bei Patienten mit metastasierten oder nicht metastasierten NET und scheint nicht mit der Tumorlast/ dem Tumorstadium zu korrelieren [94]. BDNF zeigt im Gegensatz hierzu keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit metastasierten NET (39,89ng/ml ± 18,14ng/ml) im Vergleich zu Patienten mit nicht-metastasierten NET (49,27ng/ml ± 16,28ng/ml). BDNF eignet sich somit nicht als Tumormarker/ Verlaufsmarker bei Patienten mit metastasierten oder nicht-metastasierten NET und scheint nicht mit der Tumorlast/ dem Tumorstadium zu korrelieren. Die folgende Abbildung fasst die Auswertung der Serumproben von Patienten mit NET des Pankreas und des Ileum zusammen. Die separate Darstellung dieser Ergebnisse findet sich im Anhang (ergänzende Abbildungen 9 und 10) [94].

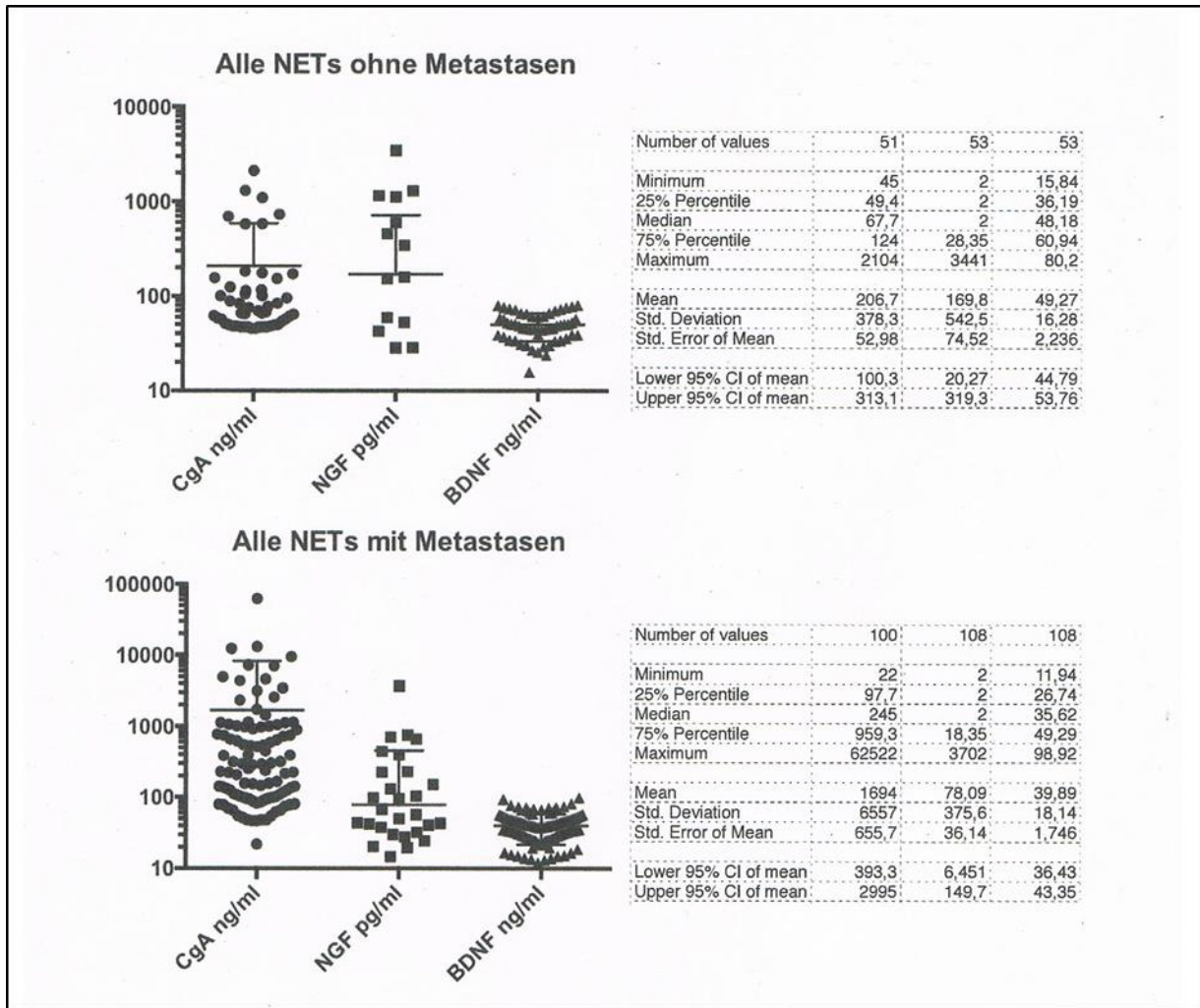


Abbildung 16: Spiegel von CgA, NGF und BDNF bei Patienten mit NET mit und ohne Metastasen. Auf der rechten Seite wird die statistische Auswertung, links die dazugehörige graphische Darstellung gezeigt [94].

## 5.5. Immunhistochemie

Um die Prävalenz der Trk-Rezeptor-Expression in GEP-NET Tumorproben zu beurteilen, wurden im Tissue Microarray (TMA) die GEP-NET-Tumorproben immunhistochemisch mit TrkA- und panTrk-Antikörpern gefärbt.

Von insgesamt 107 (100%) GEP-NET Tumorproben sind die Mehrzahl Dünndarm- (small intestine, SI) NET mit 65 Fällen (60,7%), Pankreas-(p)NET mit 33 Fällen (30,8%), gastrische NET mit 1 Fall (0,9%), Kolon-NET mit 3 Fällen (2,8%), Appendix-NET mit 3 Fällen (2,8%) und CUP (cancer of unknown primary) mit 2 Fällen (1,9%) [94].

TrkA expression level	Primary tumor localization						Total
	Small intestine	Pancreas	CUP	Stomach	Colon	Appendix	
TrkA negative	n = 65	n = 25	n = 2	n = 1	n = 3	n = 3	n = 99
TrkA weak expression	n = 0	n = 7	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0	n = 7
TrkA moderate expression	n = 0	n = 1	n = 0	n = 0	n = 0	n = 0	n = 1
Total TrkA positive	n = 0/65 (= 0%)	n = 8/33 (= 24.2%)	n = 0/2 (= 0%)	n = 0/1 (= 0%)	n = 0/3 (= 0%)	n = 0/3 (= 0%)	n = 8/107 (= 7.5%)

Abbildung 17: Expressionslevel von TrkA in 107 Patientenproben mit unterschiedlichen Tumorlokalisationen. Tumoren unklaren Ursprungs wurden als "CUP" aufgeführt [94].

Der Antikörper gegen TrkA färbt nur NET des Pankreas schwach und mittelgradig positiv. 24% (8/33) aller pNET-Proben färben sich positiv auf TrkA. Damit besteht eine statistisch signifikante Relation zwischen primärer Tumorlokalisation und TrkA-/pan-Trk-Expressionslevel [94].

Unter Verwendung eines pan-Trk-Antikörpers, welcher endogene Level der gesamten Trk-Proteine (umfassend TrkA, TrkB und TrkC) nachweist, wird wie erwartet eine positive immunhistochemische Expression von allen 8 zuerst als TrkA positiv getesteten pNET-Proben festgestellt. Zudem führt der pan-Trk-Antikörper zu einer positiven Färbung 3 weiterer pNET-Proben, die bei der Färbung mit TrkA-Antikörpern eine negative immunhistochemische Expression zeigen [94].

Insgesamt färben sich 33,3% (11/33) aller pNET mit dem pan-Trk-Antikörper positiv für eine Rezeptorexpression der Trk-Familie. Zusätzlich sind 1/65 (= 1,5%) SI-NET und 1/3 (= 33,3%) NET der Appendix positiv für pan-Trk [94].

pan-Trk expression level	Primary tumor localization						Total
	Small intestine	Pancreas	CUP	Stomach	Colon	Appendix	
pan-Trk negative	n = 64	n = 22	n = 2	n = 1	n = 3	n = 2	n = 94
pan-Trk weak expression	n = 0	n = 9	n = 0	n=0	n = 0	n = 0	n = 9
pan-Trk Moderate expression	n = 0	n = 1	n = 0	n=0	n = 0	n = 1	n = 2
pan-Trk strong expression	n = 1	n = 1	n = 0	n=0	n = 0	n = 0	n = 2
Total pan-Trk positive	n = 1/65 (= 1.5%)	n = 11/33 (= 33.3%)	n = 0/2 (= 0%)	n = 0/1 (= 0%)	n = 0/3 (= 0%)	n = 1/3 (= 33.3%)	n = 13/107 (=12.2%)

Abbildung 18: Expressionslevel von pan-Trk in 107 Patientenproben mit unterschiedlichen Tumorlokalisationen. Tumoren unklaren Ursprungs wurden als "CUP" aufgeführt [94].

Zusammengefasst zeigt sich eine positive Expression mit dem panTrk-Antikörper in insgesamt 12,2% (13/107) aller untersuchten GEP-NET Proben, wobei insbesondere in der Subgruppe der pankreatischen NET 33,3% (11/33) eine positive Expression mit dem panTrk-Antikörper aufweisen [94].

## 6. Diskussion

GEP-NET und deren Therapie stellen aufgrund ihrer Heterogenität und unterschiedlichen Tumorbiologie noch immer eine klinische Herausforderung dar. Die chirurgische Resektion ist die einzig kurative Therapiemöglichkeit [33, 52, 96]. Die Tumoren des Dünndarms und des Pankreas werden jedoch häufig erst im fortgeschrittenen Tumorstadium IV mit inoperabler Fernmetastasierung diagnostiziert [13].

Da das Ansprechen von GEP-NET auf die verschiedenen Systemtherapieoptionen der Biotherapie, Chemotherapie, molekular zielgerichteten Therapie und der Peptidrezeptor-basierten Radiotherapie (PRRT) nur palliative Therapieoptionen bietet [53] und das 5-Jahresüberleben im Tumorstadium IV bei NET des Dünndarms und insbesondere NET des Pankreas immer noch unbefriedigend ist [3, 13, 27, 59], werden neue effiziente Strategien zur Therapie von GEP-NET dringend benötigt. Die hier durchgeführten Versuche dienen zur Evaluation der Expressionshäufigkeit von Tropomyosin-Rezeptor Kinase (Trk) in neuroendokrinen Tumoren und der Charakterisierung von Trk als mögliches Target in der molekular zielgerichteten Therapie von neuroendokrinen Tumoren. Die Untersuchungen hierzu wurden am Beispiel des selektiven und oral verfügbaren pan-TRK-Inhibitors GNF-5837 an humanen neuroendokrinen Tumorzellen in vitro durchgeführt.

Der panTrk-Inhibitor GNF-5837 hemmt die Zellproliferation von humanen neuroendokrinen GOT1-Zellen (Abbildung 3) durch Inhibition von TrkA (Abbildung 7). Ähnliche anti-proliferative Effekte von GNF-5837 demonstriert eine Studie zu einem Xenotransplantat im Mausmodell, abgeleitet von RIE-Zellen, die sowohl TrkA als auch dessen Liganden NGF exprimierten [69]. Neue mit GNF-5837 beladene Albumin-Hybrid-Nanopartikel wurden von Shargh et al. auf ihre antineoplastische Wirksamkeit bei Brustkrebs-Zelllinien untersucht. Hier wurde die TrkA-Phosphorylierung inhibiert, was in anti-proliferativen und pro-apoptischen Effekten resultierte. Zudem wurde die Migration und Invasion der Krebszellen deutlich gehemmt [97]. Auch mit anderen Trk-Inhibitoren konnten ähnliche Effekte auf verschiedene Zelllinien erzielt werden. In pankreatischen Krebszelllinien führte eine Hemmung von TrkA zu einem Rückgang des Zellwachstums und der Angiogenese [98]. Der TrkA-Inhibitor K-252a konnte das Wachstum von Brustkrebszellen effektiv inhibieren [99]. Eine TrkA-Aktivierung hingegen

fürhte in Brustkrebszellen zu Tumorwachstum, Metastasenformation und invasivem Wachstum [100]. Außerdem reguliert eine TrkA-Aktivierung in neuronalen Zellen Überleben und Differenzierung [101]. Eine Studie zur Prostata-Adenokarzinom-Zelllinie LNCaP beschreibt eine signifikante und dosisabhängige Zunahme der Proliferation nach einer TrkA-Stimulation mit NGF [102]. Allerdings gibt es neben diesen Ergebnissen auch Studien, die zeigen, dass TrkA und TrkC paradoxerweise in bestimmten Zellen auch Zelltod induziert [103]. Beispielsweise ist die TrkA-Expression verbunden mit Tumorregression und einer positiven Prognose von Neuroblastomen [104]. TrkC ist wiederum ein positiver prognostischer Indikator beim Medulloblastom [105]. Harel et al. vermuten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen TrkA und p75 oder auch CCM2, die für das Umschalten von Überleben fördernder zu Zelltod fördernder Aktivität verantwortlich sein könnten. Ob diese beiden Mechanismen in verschiedenen Zelltypen bevorzugt werden oder ob es sich hierbei nur um weitere Facetten der vielseitigen Trk-Signalwege handelt, bleibt offen [103]. Zwei voneinander unabhängige Studien lassen wiederum vermuten, dass es sich bei TrkA und TrkC – im Gegensatz zu TrkB – in Neuronen um Abhängigkeitsrezeptoren handelt [106, 107]. Diese Gruppe von Rezeptoren teilt demnach die Eigenschaft Zelltod auszulösen, wenn ihr Ligand nicht gebunden ist, aber ihre proapoptotische Aktivität zu unterdrücken, wenn der Ligand gebunden ist. So schaffen diese Rezeptoren eine zelluläre Abhängigkeit von ihren zugehörigen Liganden [108, 109].

Derzeit sind drei humane Isoformen von TrkA, nämlich TrkAI, TrkAII und TrkAIII bekannt, die durch alternatives Splicing entstehen [110]. Tacconelli et al. vermuten, dass die onkogene Wirkung von TrkA bei aggressiven Formen von Neuroblastomen auf die TrkAIII-Isoform zurückzuführen ist. Diese hat demnach antagonistische Effekte zum tumorsupprimierenden TrkAI, das vor allem bei günstig verlaufenden Neuroblastomen zu finden ist [111, 112]. Eine tumorsupprimierende Wirkung von TrkA und damit eine Zunahme der Proliferation unter GNF-5837 zeigten sich weder bei GOT1-, noch bei H727- oder BON1-Zellen (Abbildung 3,4,5). In GOT1-Zellen erreichte die Hemmung der Proliferation durch GNF-5837 bei einer Konzentration von 50nM ein Plateau und eine weitere Dosissteigerung führte nicht zu einem stärkeren Effekt (Abbildung 3, Tabelle 13-15). Dies lässt sich durch eine maximale Rezeptor-Besetzung mit GNF-5837, die bei dieser Konzentration erreicht wird, erklären [113].

Die Proliferation der neuroendokrinen Tumorzelllinien NCI-H727 und BON1 wurde durch GNF-5837 nicht reduziert (Abbildung 4 und 5, ergänzende Abbildungen 1-4). Beide besitzen keine Trk-Rezeptoren, wie in Abbildung 7 dargestellt, und sind daher resistent gegen GNF-5837.



Dass nur die Zelllinie GOT1, die über einen Trk-Rezeptor, nämlich TrkA, verfügt, auf den pan-Trk-Inhibitor reagiert, bestätigt die Spezifität von GNF-5837 [69]. Die TrkA-Expression in GOT1-Zellen ändert sich nach kurzen Inkubationszeiten von 4 Stunden mit GNF-5837 nicht. Nach einer Inkubation von 24 Stunden steigen die Expressionslevel von TrkA dosisabhängig an, was auf Feedback-Mechanismen hindeutet. Ähnliche Feedback-Schleifen mit einer Hochregulierung von TrkA nach Inhibition des Rezeptors konnten bereits an humanen glatten Muskelzellen des Atemwegs gezeigt werden [114].

In BON1- und NCI-H727-Zellen, die keinen Trk-Rezeptor exprimieren war NGF hochreguliert (Abbildung 8). Dies könnte den Schluss zulassen, dass dies ein Kompensationsmechanismus für das Fehlen des spezifischen Rezeptors – in diesem Fall TrkA – ist. Die fehlende zelluläre Signalkaskade von TrkA und NGF würde demnach zu hohen Expressionslevels von NGF führen. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Tagliabue et al. und zeigten, dass Brustkrebszellen mit niedriger TrkA-Expression hohe Expressionslevel von NGF hatten um andere Rezeptoren für das Tumorzellwachstum zu rekrutieren [115].

Der PI3-Akt-mTOR und der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg sind in humanen Krebszellen häufig fehlreguliert. Dies betrifft auch NET und die Tragweite dieses Signalweges umfasst zelluläre Mechanismen der onkogenen Regulation, wie Zellwachstum, Überleben, Proliferation, Angiogenese und Beweglichkeit [116-122]. Die TrkA-Aktivierung und Signalübertragung nach Stimulation mit NGF hat ihre proliferativen und antiapoptotischen Eigenschaften vor allem über das Auslösen der PI3K-Akt-mTOR und Ras-Raf-MEK-ERK Kaskaden gezeigt [68, 101, 123-125]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei GOT1-Zellen mit Aktivierung von Bestandteilen aus beiden Signalwegen nach Stimulation mit NGF (ergänzende Abbildung 6). Folglich führte die Inhibition von TrkA durch den pan-Trk-Inhibitor GNF-5837 zu einer Herunterregulierung beider Signalwege (Abbildung 12, ergänzende Abbildung 5). Da der PI3K-Akt-mTOR Signalweg an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist, ist es nicht verwunderlich, dass die Zellzyklus-Komponente Cyclin D3 bei NGF-Stimulation hochreguliert und bei GNF-5837-Stimulation herunterreguliert ist (ergänzende Abbildung 6, Abbildung 12) [126, 127].

GOT1-Zellen zeigten nicht nur eine TrkA-, sondern auch eine leichte TrkC-Expression (Abbildung 7). Neben einer Inhibition von TrkA könnte demnach auch eine Inhibition von TrkC dazu beitragen, dass der Ras-Raf-MEK-ERK- und der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg nach

Inkubation mit dem pan-Trk-Inhibitor GNF-5837 gehemmt werden. In adenoidzystischen Karzinomzellen war TrkC aktiviert und sein Ligand NT-3 war notwendig um invasives Verhalten über den Ras-Raf-MEK-ERK- und den PI3K-Akt-mTOR- Signalweg zu stimulieren [128].

Interessanterweise ist der Zyklin-dependent-Kinaseinhibitor p21 nach NGF-Stimulation hochreguliert (ergänzende Abbildung 6) und nach Trk-Inhibition mit GNF-5837 herunterreguliert (Abbildung 12, ergänzende Abbildung 5). Dies könnte durch eine Induktion des anti-apoptotischen Bcl2 nach NGF-Stimulation und Hemmung von Bcl2 nach Inhibition mit GNF-5837 erklärt werden (Abbildung 12, ergänzende Abbildung 6). p21 ist bekannt für seine Rolle im Zellzyklus-Arrest, insbesondere die Vermittlung des von p53 abhängigen G1-Wachstums-Arrest [129]. p21 reagiert aber auch unabhängig von p53 auf verschiedene Stimuli und fungiert sowohl als Sensor, als auch Effektor einer Vielzahl anti-proliferativer Signale [130]. Trotz seiner wichtigen Rolle bei Anhalten der zellulären Proliferation, gibt es Studien, die gezeigt haben, dass p21 unter bestimmten Umständen auch Proliferation und Onkogenität fördern kann [130, 131]. Folglich ist p21 in Tumoren oft fehlreguliert und die Ergebnisse hier weisen ebenfalls darauf hin, dass p21 nicht nur als Tumorsuppressor, sondern auch als Onkogen agieren kann.

Da die alleinige Trk-Inhibition mit GNF-5837 zu einer Herunterregulierung des PI3K-Akt-mTOR- und des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges führt (Abbildung 12), wurden zudem die Effekte von GNF-5837 in Kombination mit dem mTORC1-Inhibitor Everolimus untersucht. Die antitumorale Wirksamkeit des mTOR-Inhibitors Everolimus wurde in klinischen Phase-3-Studien an Patienten mit neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen [132-134]. An neuroendokrinen Tumor-Zelllinien hat Everolimus eine Inhibierung des mTOR-Signalweges und eine kompensatorische Hochregulation der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade gezeigt [135-140]. Es wurde beobachtet, dass die neuroendokrinen Tumorzellen bei Langzeitbehandlung mit Everolimus eine Resistenz gegen dieses entwickeln [135-139]. Daher ist ein dualer Therapieansatz nicht nur vorteilhaft um die Wirksamkeit der einzelnen Substanzen zu verstärken, sondern auch um eine Resistenzentwicklung zu vermeiden oder dieser entgegenzuwirken. In Abbildung 6 und Tabelle 16 zeigt sich, dass eine Kombination von GNF-5837 mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus zu zusätzlichen anti-proliferativen Effekten führt.

Der PI3K-Akt-mTor-Signalweg und auch Cyclin D3 wurden agonistisch herabreguliert (Abbildung 13). Rhein et al testeten den mTORC1-Inhibitor Rapamycin und dessen Analogon RAD001 (Everolimus) an durch Trk-Alteration ausgelöster Leukämie am Mausmodell. Auch hier zeigte sich ein signifikant verlängertes Überleben durch das Herabregulieren der PI3K-Akt-mTOR- und der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade [141]. Bisher gibt es keine Biomarker um das Ansprechen von Krebspatienten auf Rapamycin vorherzusehen. Diese Studie lässt vermuten, dass ein veränderter Trk-Signalweg ein guter Prädiktor der Tumorsensitivität auf mTOR-Inhibition sein könnte [141].

Um den Einfluss von GNF-5837 auf den Zellzyklus und die Apoptose genauer zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

Es zeigten sich ein signifikanter G1-Arrest und eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen in der S-Phase nach Inkubation von GOT1-Zellen mit GNF-5837 500nM für 72 Stunden (Abbildung 14). Der prozentuale Anteil der GOT1-Zellen in der Sub-G1-Phase nach Inkubation mit GNF-5837 500nM ist signifikant erhöht (Abbildung 15).

Bei vielen Tumoren kommt es zu einer Fehlregulation des Zellzyklus und damit zu einem unkontrollierten Zellwachstum [142]. Während der G1-Phase entscheidet sich durch verschiedene Kontrollmechanismen ob es zum Zellzyklusarrest oder zur Zellteilung kommt [143]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass GNF-5837 den Übertritt der GOT1-Zellen in die S-Phase hemmt. Die Zellen in der Sub-G1 Phase entsprechen den apoptotischen Zellen [144]. Der vergrößerte Anteil an Tumorzellen in der Sub-G1-Phase nach Inkubation mit GNF-5837 (Abbildung 15) zeigt, dass die Trk-Inhibition die Apoptose fördert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Heinen et al bei der Untersuchung des pan-Trk-Inhibitors K252a an SK-ES-1-Zellen. Hier zeigten sich ebenfalls eine Zunahme der G1-Zellen, sowie eine Abnahme der Zellen in der S-Phase in der Durchflusszytometrie nach einer Inkubation der Zellen mit K252a für 24 Stunden [145]. Eine Anwendung desselben Trk-Inhibitors an HepG2 und HCCLM3 führte ebenfalls zu einer Verstärkung der Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen [146].

Dass Trk-Rezeptoren, in diesem Fall TrkA, eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus besitzen zeigt auch eine Studie von Pierucci et al. Es wurden Beta-Zellen, die sowohl

einen Trk-Rezeptor exprimieren als auch NGF produzieren und sezernieren, untersucht. Hier führte der alleinige Entzug von NGF zu einer durch TrkA-vermittelten Apoptose [147].

Obwohl Neurotrophine wie NGF und BDNF für ihre Überleben-fördernden Eigenschaften in neuronalen Zellen bekannt sind [148], sind sie tatsächlich pleiotrope Wachstumsfaktoren, die physiologisch in vielen verschiedenen Zelltypen des Körpers agieren [149]. Eine Fehlregulierung ihrer Signaltransduktion findet sich in vielen Tumoren, wo sie mit einer malignen Transformation einhergehen oder diese begünstigen. Tumorzellen können autokrine Schleifen entwickeln, indem sie die Wachstumsfaktoren und zugleich deren Rezeptor exprimieren [149]. Alternativ können auch nur die Rezeptoren in geänderter Form, die sich ständig aktiv verhalten, exprimiert werden [149]. Um ein umfassenderes Bild von der Bedeutung der Neurotrophine bei neuroendokrinen Tumoren zu bekommen, wurden Serumproben von Patienten mit NET des Pankreas und Ileum, jeweils mit und ohne Metastasen, auf NGF und BDNF untersucht. Zudem wurde auch der bereits etablierte Tumormarker CgA bestimmt.

Es zeigte sich erwartungsgemäß ein Anstieg von CgA bei metastasierenden Tumoren im Vergleich zu Patienten ohne nachgewiesene Metastasen (Abbildung 16, ergänzende Abbildung 9 und 10), was seine Eignung als Tumormarker bestätigt. NGF zeigte allerdings eine fallende Tendenz bei Patienten mit metastasierten NET ( $78,09\text{pg/ml} \pm 375,8\text{pg/ml}$ ) im Vergleich zu Patienten mit NET ohne Metastasen ( $169,8\text{pg/ml} \pm 542,5\text{pg/ml}$ ) (Abbildung 16, ergänzende Abbildung 9 und 10). BDNF hingegen zeigte keine Tendenzen bei Tumoren mit oder ohne Metastasen (Abbildung 16, ergänzende Abbildung 9 und 10). Somit sind beide Neurotrophine nicht als Tumormarker für NET geeignet. Getestet wurden hier, wie bereits erwähnt, Serumproben von Patienten mit NET des Ileum und auch des Pankreas. Die Analyse des später diskutierten TMA mit Gewebeproben von Patienten mit NET zeigte eine positive Färbung mit dem TrkA- und dem pan-Trk-Antikörper von hauptsächlich Proben pankreatischer NET. Doch auch bei gesonderter Betrachtung von Serumproben bei Patienten mit pankreatischen NET zeigte sich eine eher fallende Tendenz von NGF bzw. keine Tendenz von BDNF (ergänzende Abbildung 9). Einschränkend ist hier natürlich zu bemerken, dass es sich bei den beiden Untersuchungen nicht um dieselben Patientengruppen handelt und somit

nicht klar ist, ob es eine Korrelation von positiv gefärbten Gewebeproben mit Trk-Antikörpern und NGF-Serumspiegel gibt.

Im zweiten Abschnitt der Studie wurde in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der Universität München die Expression von Rezeptoren der Trk-Familie an einem tissue-microarray (TMA) untersucht, der 107 Proben von Patienten mit GEP-NET umfasste. Mit Hilfe eines spezifischen TrkA-Antikörpers konnten 8 von 107 Proben positiv gefärbt werden. Alle diese 8 positiven Färbungen waren ausschließlich der Untergruppe der 33 pankreatischen NET zuzuordnen, was insgesamt 24% entspricht (Abbildung 17). Durch Verwendung des pan-Trk-Antikörpers, welcher endogene Gesamtlevel des Trk-Proteins, somit TrkA, TrkB und TrkC, anzeigt, wurden 13 von 107 Tumorproben positiv gefärbt. Auch hier war die positive Färbung hauptsächlich bei der Untergruppe pankreatischer NET zu verzeichnen - insgesamt 11 von 33 pNET-Proben, was einem Anteil von 33% entspricht (Abbildung 18). Diese Daten sprechen für eine hohe Prävalenz der Expression des Trk-Rezeptors bei pankreatischen NET. Deshalb könnte ein immunhistochemisches oder molekulares Screening für die Expression des Trk-Rezeptors bei Patienten mit pankreatischen NET ein sinnvoller prädiktiver Marker sein, um Patienten mit Expression von Trk für eine molekular zielgerichtete Therapie mit Trk-Inhibitoren auszuwählen.

Aktuell publizierte Studien haben gezeigt, dass Neurotrophic tyrosine receptor kinases (NTRK) Genfusionen bei verschiedenen Karzinomen in etwa 1% auftreten können und zu Überexpression/ Überaktivierung der Trks in diesen Karzinomen führen können. Insbesondere bei diesen Tumoren können spezifische Trk-Inhibitoren zur Tumorthherapie eingesetzt werden. 2019 wurden Empfehlungen eines internationalen Expertenkonsensus zur tumoragnostischen Therapie von Patienten mit soliden Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität oder NTRK-Fusionen herausgegeben [80]. Bei vorliegender NTRK-Fusion wird eine Behandlung mit Trk-Inhibitoren stark empfohlen [80].

Der hoch selektive Trk-Inhibitor Larotrectinib wurde an 55 Patienten mit Tumoren, die positiv auf NTRK-Fusion getestet wurden, auf seine Wirksamkeit und Sicherheit untersucht [74]. Unabhängig vom Patientenalter oder der Tumorart sprachen 75% der Patienten positiv auf die Therapie an, davon hatten nach einem Jahr 71% ein andauerndes Ansprechen und 55% waren progressionsfrei [74, 81]. Für den Trk-Inhibitor Larotrectinib (Synonyme: LOXO-101, ARRY-

470) wurde für die Therapie von Tumoren mit NTRK-Fusion 09/2019 von der European Medicines Agency (EMA) und 11/2018 von der FDA eine Zulassung erteilt [70-74, 82, 83].

Auch Entrectinib zeigte bei 54 getesteten Patienten mit NTRK-Fusion mit einer Odds ratio von 57,4% ein gutes Ansprechen [81, 84]. Bei 6% dieser Patienten lag ein neuroendokriner Tumor vor [84].

Für Entrectinib wurde von der FDA 08/2019 die Zulassung zur Behandlung von soliden Tumoren mit NTRK-Genfusionen und ROS-1-Fusions-positivem, metastasiertem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs erteilt [85].

Ob NTRK-Genfusionen auch bei neuroendokrinen Tumoren vorkommen, sollte in weiteren molekulargenetischen Studien geprüft werden. Erste publizierte Studien zeigen eine NTRK-Genfusion nur in 0,3% aller NET [86]. Erste klinische Fallberichte zeigen, dass bei diesen selektionierten neuroendokrinen Tumoren mit NTRK-Genfusionen pan-Trk-Inhibitoren erfolgreich zur Therapie eingesetzt werden können [150].

Es stellt sich jedoch die Frage ob nicht NET ohne NTRK-Genfusion aber mit Trk-Expression in der Immunhistochemie durch Trk-Inhibitoren behandelbar wären und somit 25% - 35% aller pNET eine Therapie mit Trk-Inhibitoren zugänglich sein könnten.

Eine Limitation der hier vorgelegten in vitro Untersuchungen ist die Tatsache, dass die aktuell zur Verfügung stehenden humanen neuroendokrinen Tumor-Zelllinien nicht unbedingt den tatsächlichen biologischen Expressionsstatus von Trk-Rezeptoren in neuroendokrinen Tumoren in vivo darstellen. Während die Dünndarm-Karzinoid-Zelllinie GOT1 als einzige auf Expression eines funktionellen Trk-Rezeptors positiv getestet wurde (Abbildung 7), zeigte die TMA-Analyse der Tumorproben, dass die Expression eines Trk-Rezeptors an Gewebeproben von Dünndarm-NET - mit nur 1,5% (1/65) - selten ist (Abbildung 18). Stattdessen zeigten vor allem Proben pankreatischer NET in 33% (11/33) eine positive Färbung mit dem Trk-Antikörper (Abbildung 18).

Inwieweit aufgrund der in der hier vorgelegten Untersuchung berichteten immunhistochemischen Expressionsdaten von TrkA in 33% der untersuchten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas möglicherweise auch ein größeres vorselektioniertes Patientenkollektiv mit neuroendokrinen Tumoren mit Expression von Trk von einer molekular zielgerichteten Therapie mit panTrk-Inhibitoren profitieren könnte, muss erst in weiteren präklinischen und klinischen Studien untersucht werden.

## 7. Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Expression von Tropomyosin Rezeptor Kinasen (Trks) in humanen neuroendokrinen Tumoren des GastroEnteroPankreatischen (GEP) Systems und die mögliche Rolle der Trks als neues Target für eine molekular zielgerichtete Therapie von neuroendokrinen Tumoren untersucht.

Aus Tumorgewebeproben von Patienten aus dem NeoExNET-Register wurde ein Tissue Microarray (TMA) generiert. In der immunhistochemischen Untersuchung des TMA zeigten 33% (11/33) der NET des Pankreas, aber nur 1-2% (1/65) der NET des Dünndarms eine Expression von Trks.

Die humane neuroendokrine Tumorzelllinie GOT1 zeigte die Expression eines funktionellen TrkA Rezeptors. Am Modell der GOT1-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit dem panTrk-Inhibitor GNF-5837 antiproliferative und Apoptose-induzierende Effekte bewirkte.

Erste panTrk-Inhibitoren wie Larotrectinib [73, 74] oder Entrectinib [151, 152] sind bereits für verschiedene Karzinome mit seltenen NTRK-Genfusionen zugelassen [70-72].

Inwieweit aufgrund der in der hier vorgelegten Untersuchung berichteten immunhistochemischen Expressionsdaten von TrkA in 33% der untersuchten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas möglicherweise auch ein größeres vorselektioniertes Patientenkollektiv mit neuroendokrinen Tumoren mit Expression von Trk von einer molekular zielgerichteten Therapie mit panTrk-Inhibitoren profitieren könnte, muss erst in weiteren präklinischen und klinischen Studien untersucht werden.

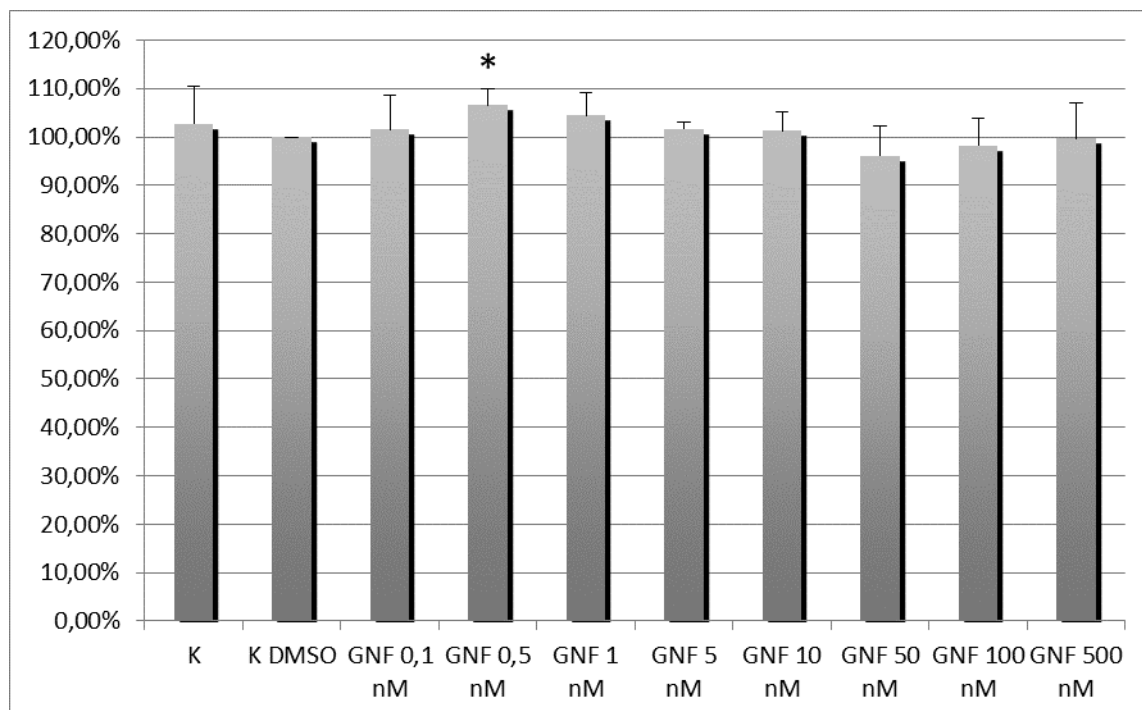
## 8. Anhang

### 8.1. Ergänzende Abbildungen

Hier sind Graphiken zu verschiedenen Versuchen enthalten, die aus Gründen der Übersichtlichkeit im Ergebnisteil nicht aufgeführt wurden. Um ein vollständigeres Bild der durchgeführten Versuche zu zeigen, werden sie hier dargestellt.

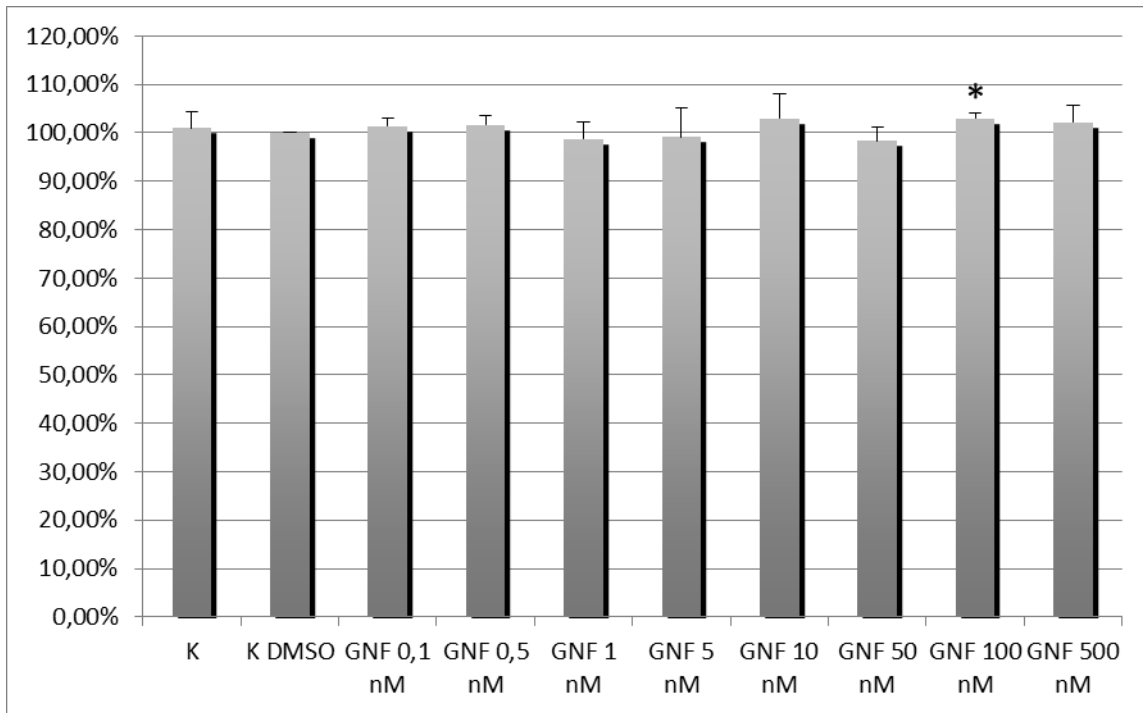
#### 8.1.1. Proliferationsassay

Die ergänzenden Abbildungen 1-4 enthalten die Proliferation von NCI-H727- und BON1- Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden und 144 Stunden mit GNF-5837 in Konzentrationen von 0,1nM – 500nM. Auch hier zeigt sich kein Effekt von GNF-5837 auf die Proliferation, da diese Zelllinien keinen Trk-Rezeptor besitzen, wie im Western Blot in Abbildung 7 bereits gezeigt wurde.

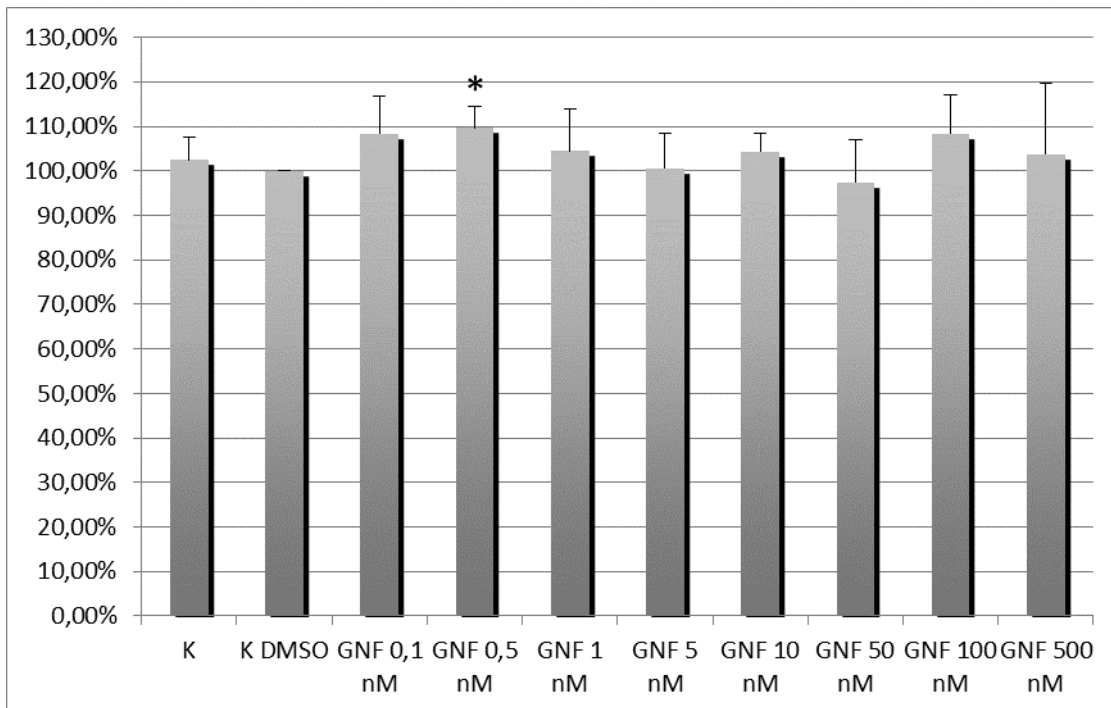


Ergänzende Abbildung 1: Proliferation von NCI-H727-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit GNF-5837; \* $p < 0,05$

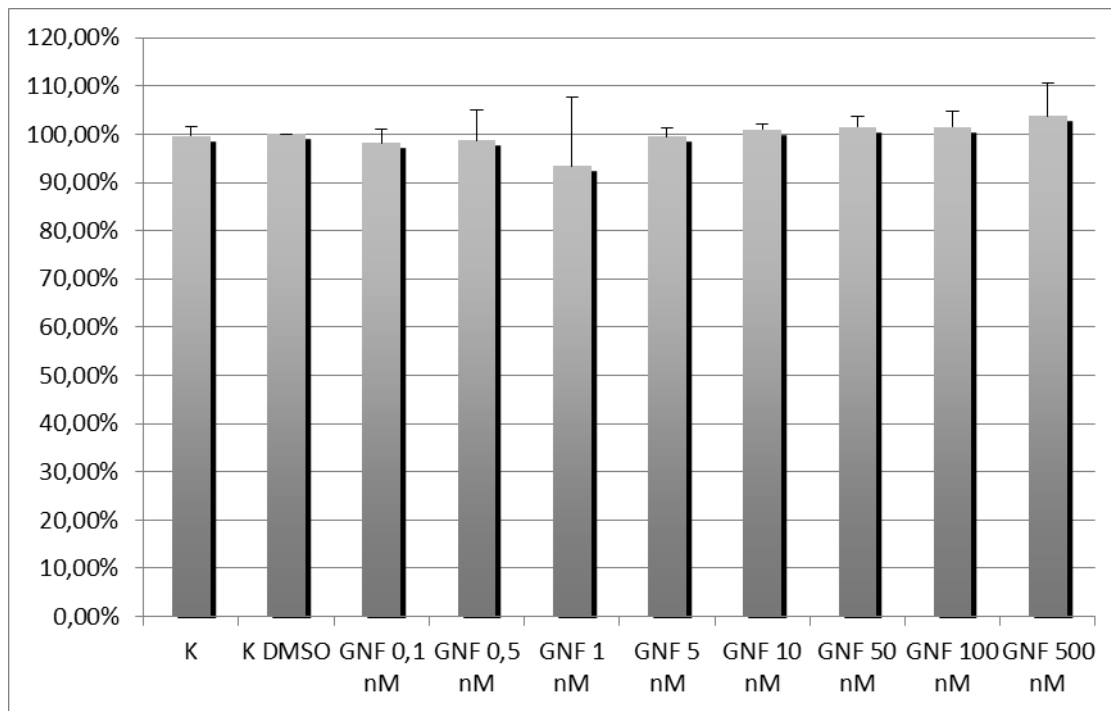




Ergänzende Abbildung 2: Proliferation von NCI-H727-Zellen nach 144 Stunden Inkubation mit GNF-5837; \* $p < 0,05$



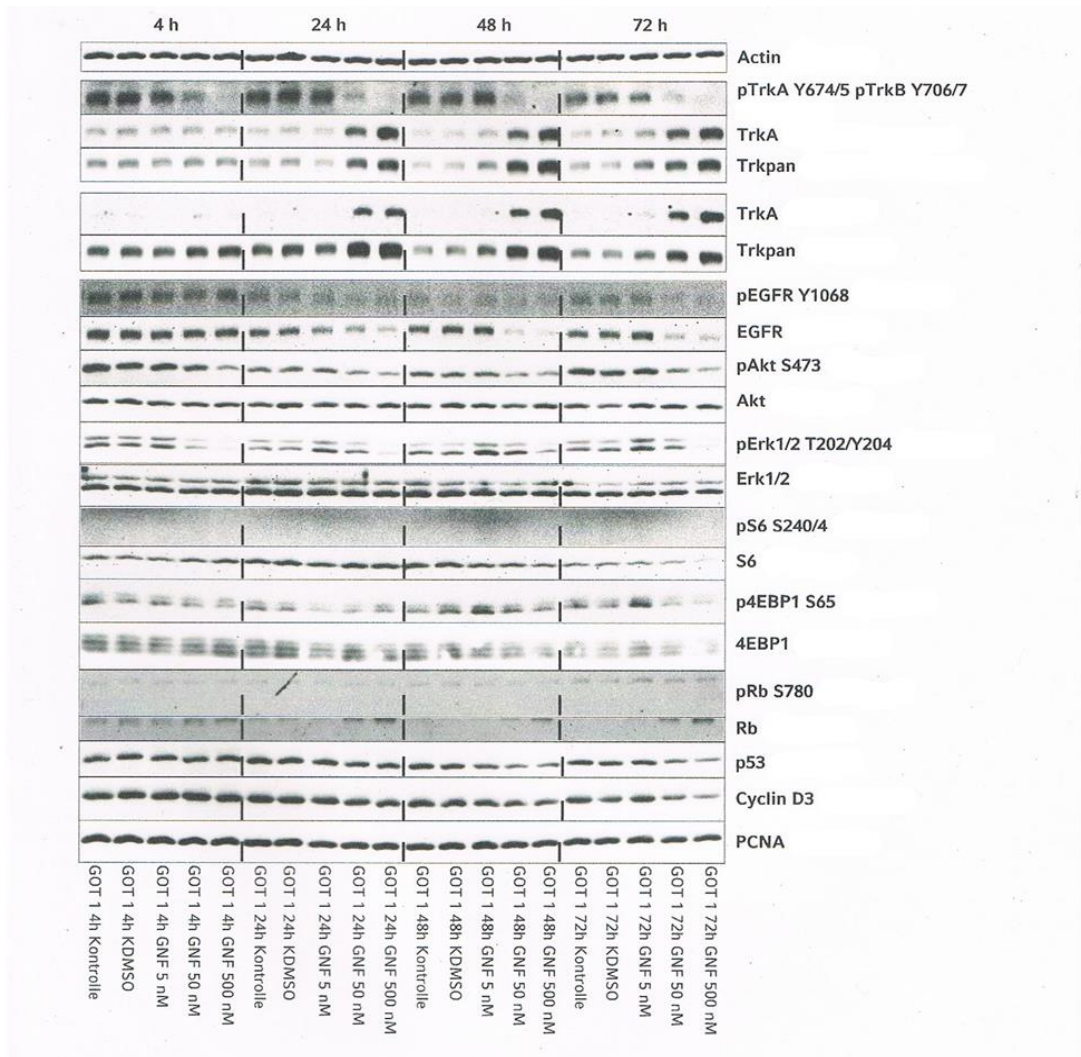
Ergänzende Abbildung 3: Proliferation von BON1-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit GNF-5837; \* $p < 0,05$



Ergänzende Abbildung 4: Proliferation von BON1-Zellen nach 144 Stunden Inkubation mit GNF-5837

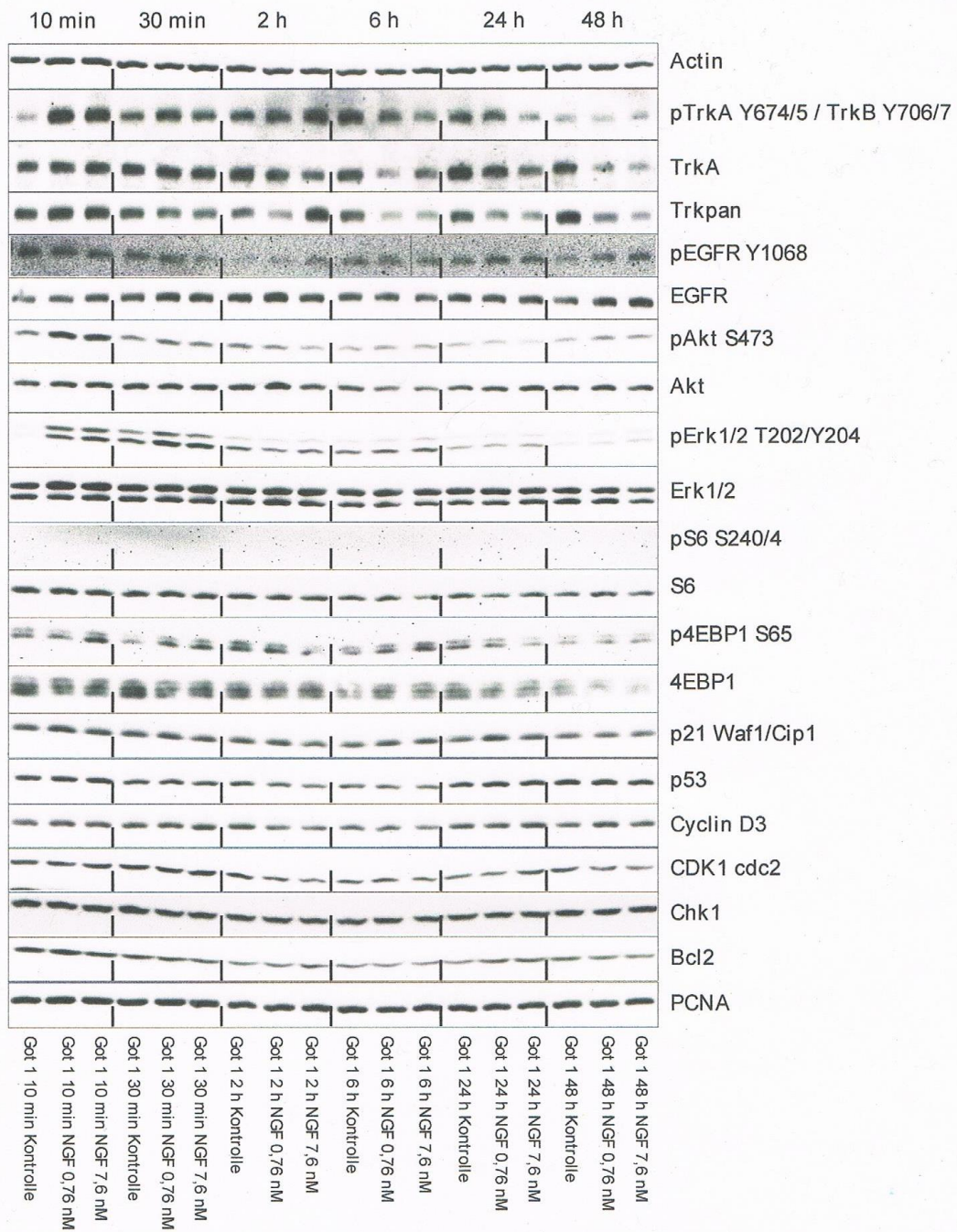
### **8.1.2. Western Blot-Analyse**

Die ergänzende Abbildung 5 zeigt vollständig alle im Western Blot untersuchten Proteine in GOT1-Zellen nach 4 bis 72 Stunden Inkubation mit GNF-5837 in ansteigenden Konzentrationen (5nM, 50nM und 500nM). Zu allen Untersuchungszeitpunkten sind der Rückgang der Phosphorylierung von TrkA/TrkB und der gleichzeitige Anstieg des TrkA-Rezeptors zu sehen. Dieser kann als Reaktion auf die Blockierung durch GNF-5837 interpretiert werden. Deutlich erkennbar ist auch der Abfall einiger Proteine, die Teil von Trk-vermittelten Signalwegen sind, wie EGFR, pAkt S473, pErk und p4EBP1.



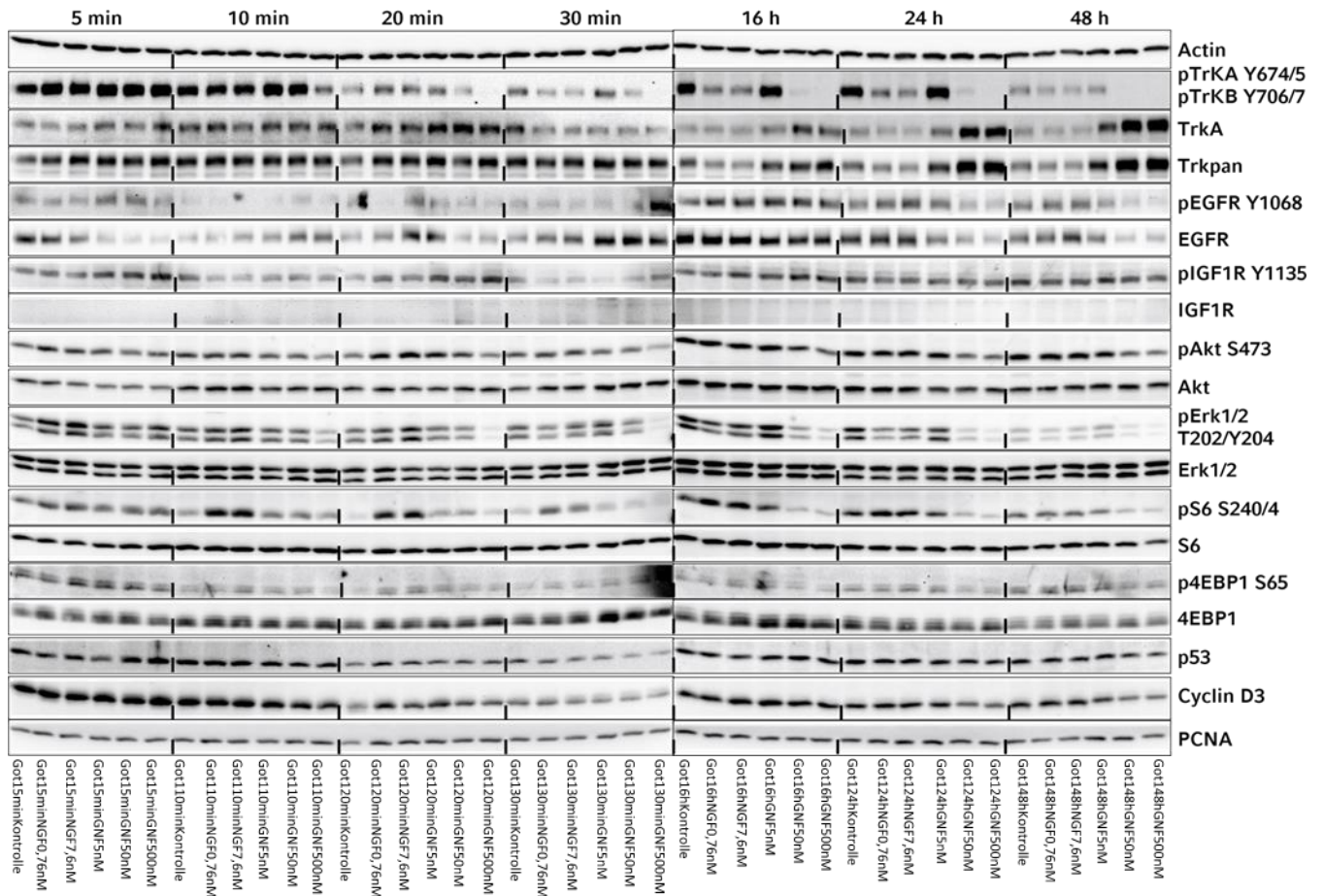
Ergänzende Abbildung 5: Western Blot-Analyse von GOT1-Zellen nach 4 bis 72 Stunden Inkubation mit GNF-5837 (5nM, 50nM und 500nM).

Zum Grundlagenbeweis wurde in der Western Blot-Analyse gezeigt, dass bei Inkubation von GOT1-Zellen mit NGF (0,76nM und 7,6nM) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (10 Minuten bis 48 Stunden) diese Signalwege und die beteiligten Proteine durch Stimulation des TrkA-Rezeptors ansteigen. Dies ist in der ergänzenden Abbildung 6 gezeigt.



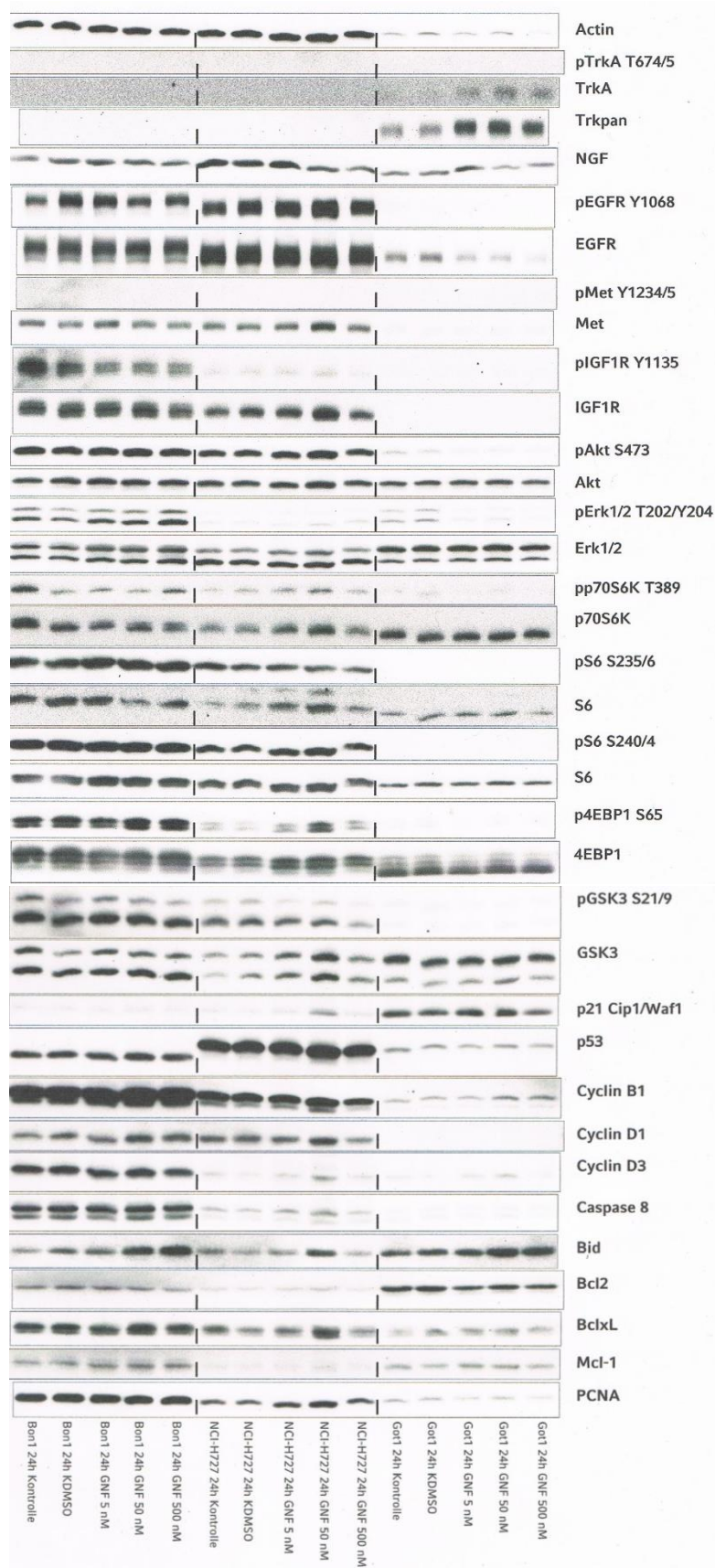
Ergänzende Abbildung 6: Western Blot-Analyse von GOT1-Zellen nach 10 Minuten bis 48 Stunden Inkubation mit NGF (0,76nM und 7,6nM).

Die Ergänzende Abbildung 7 zeigt noch einmal Western-Blot-Versuche nach Inkubation der GOT1-Zelllinie mit GNF-5837 in 3 ansteigenden Konzentrationen von 5nM, 50nM und 500nM nach 7 verschiedenen Inkubationszeiten von 5 Minuten bis 48 Stunden.



Ergänzende Abbildung 7: Western Blot-Analyse von GOT1-Zellen nach Inkubation für 5 Minuten bis 48 Stunden mit GNF-5837 (5nM/50nM/500nM)

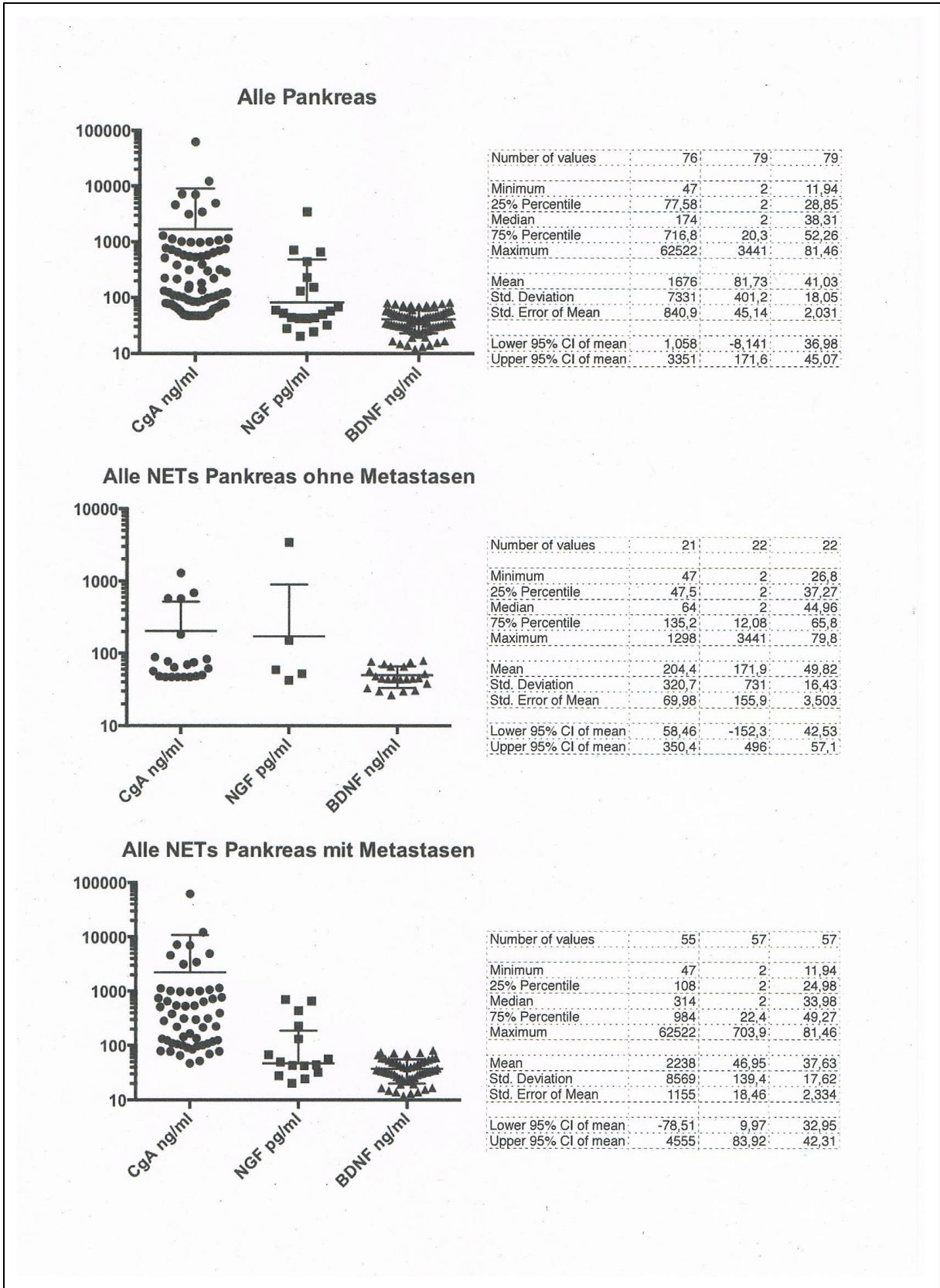
In der ergänzenden Abbildung 8 sind die Western Blot-Ergebnisse der untersuchten Zelllinien Bon1, NCI-H727 und GOT1 nebeneinander nach Inkubation für 24 Stunden mit GNF-5837 in steigender Konzentration (5nM, 50nM, 500nM) dargestellt. Aufgrund des Fehlens des Trk-Rezeptors bei Bon1- und NCI-H727-Zellen zeigt sich bei diesen kein Einfluss von GNF-5837 auf entsprechende Signalkaskaden.



Ergänzende Abbildung 8: Western Blot-Analyse von Bon1, NCI-H727 und GOT1 nach 24h Inkubation mit GN5837 in steigender Konzentration (5nM, 50nM, 500nM)

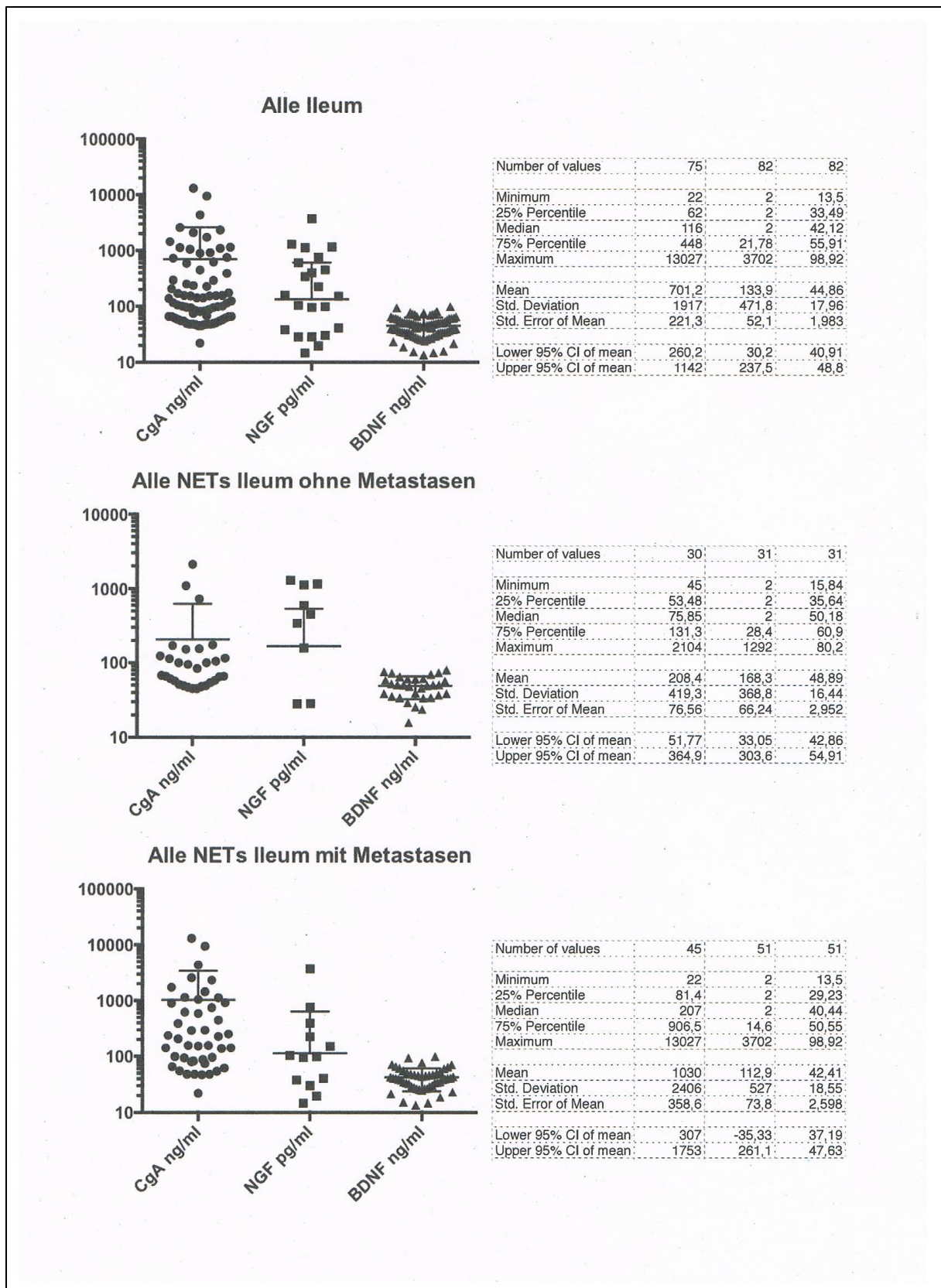
### **8.1.3. CgA-, NGF- und BDNF-Serumspiegel bei NET-Patienten mit und ohne Metastasen**

In den folgenden ergänzenden Abbildungen 9 und 10 sind die Ergebnisse der Serumanalysen von Patienten mit NET des Pankreas und Ileum separat dargestellt. Auf der rechten Seite wird die statistische Auswertung der Serumlevel von CgA, NGF und BDNF in drei Spalten in dieser Reihenfolge von links nach rechts gezeigt. Links davon befindet sich die dazugehörige graphische Darstellung.



Ergänzende Abbildung 9: Analyse von Serumproben von Patienten mit NET des Pankreas mit Bestimmung von CgA, NGF und BDNF.





Ergänzende Abbildung 10: Analyse von Serumproben von Patienten mit NET des Ileum mit Bestimmung von CgA, NGF und BDNF.

## **8.2. Abkürzungsverzeichnis**

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CgA	Chromogranin A
CT	Computertomographie
DAG	Diacylglycerol
EGF	epidermal growth factor
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
F-DOPA	Fluorodopa
GEP	gastro-entero-pankreatisch
GHRH	growth-hormone releasing hormone
HPF	high power field; Hauptgesichtsfeld
IFN	Interferon
In	Indium
IP3	Inositoltriphosphat
MEN1	multiple endokrine Neoplasie 1
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
NEC	neuroendokrines Karzinom
NEN	neuroendokrine Neoplasmen
NET	neuroendokriner Tumor
NGF	nerve growth factor
NS	nicht signifikant
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
NTRK	
NT3/4	Neurotrophin 3/4
PDGF	platelet derived growth factor
PET	Positronenemissionstomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomografie
SSA	Somatostatin-Analoga
TMA	Tissue Microarray
TRK	Tropomyosin-related-Kinase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
WDHH	wässrige Diarrhö, Hypokaliämie, Hypochlorhydrie
WHO	World Health Organization

## 9. Literaturverzeichnis

1. Warner, R.R., *Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances*. Gastroenterology, 2005. **128**(6): p. 1668-84.
2. Ilett, E.E., et al., *Neuroendocrine Carcinomas of the Gastroenteropancreatic System: A Comprehensive Review*. Diagnostics (Basel), 2015. **5**(2): p. 119-76.
3. Rinke A., A.R., *Aktuelle Therapie neuroendokriner Tumoren*. Arzneimitteltherapie 2014;32:2–13., 2014.
4. Capella, C., et al., *Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut*. Virchows Arch, 1995. **425**(6): p. 547-60.
5. Kloppel, G., *Oberndorfer and his successors: from carcinoid to neuroendocrine carcinoma*. Endocr Pathol, 2007. **18**(3): p. 141-4.
6. Kloppel, G., *Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms*. Endocr Relat Cancer, 2011. **18 Suppl 1**: p. S1-16.
7. Volante, M., et al., *The pathological diagnosis of neuroendocrine tumors: common questions and tentative answers*. Virchows Arch, 2011. **458**(4): p. 393-402.
8. Modlin, I.M., M.D. Shapiro, and M. Kidd, *Siegfried Oberndorfer: origins and perspectives of carcinoid tumors*. Hum Pathol, 2004. **35**(12): p. 1440-51.
9. Tsoucalas, G., M. Karamanou, and G. Androutsos, *The eminent German pathologist Siegfried Oberndorfer (1876-1944) and his landmark work on carcinoid tumors*. Ann Gastroenterol, 2011. **24**(2): p. 98-100.
10. Eggenberger, J.C., *Carcinoid and other neuroendocrine tumors of the colon and rectum*. Clin Colon Rectal Surg, 2011. **24**(3): p. 129-34.
11. Sandvik, O.M., et al., *Epidemiology and classification of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms using current coding criteria*. Br J Surg, 2016. **103**(3): p. 226-32.
12. Kaifi, J.T., et al., *The Diagnosis and Treatment of Bronchopulmonary Carcinoid*. Dtsch Arztebl Int, 2015. **112**(27-28): p. 479-85.
13. Dasari, A., et al., *Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States*. JAMA Oncol, 2017. **3**(10): p. 1335-1342.
14. Kloppel, G., *[Neuroendocrine neoplasms : Two families with distinct features unified in one classification (German version)]*. Pathologe, 2019. **40**(3): p. 211-219.
15. Williams, E.D. and M. Sandler, *The classification of carcinoid tumors*. Lancet, 1963. **1**(7275): p. 238-9.
16. Yamaguchi, T., et al., *Clinical validation of the gastrointestinal NET grading system: Ki67 index criteria of the WHO 2010 classification is appropriate to predict metastasis or recurrence*. Diagn Pathol, 2013. **8**: p. 65.
17. Foltyn, W., et al., *The value of the Ki-67 proliferation marker as a prognostic factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*. Endokrynol Pol, 2012. **63**(5): p. 362-6.
18. Lloyd RV, O.R., Klöppel G, Rosai J, *WHO Classification of Tumours of endocrine organs (4th edition)*. 2017.
19. Board, W.E., *WHO Classification of Tumours: Digestive System Tumours, 5th Edition*. 2019.
20. L.H. Sobin, M.K.G., Ch, Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours, seventh edition*. Seventh edition ed. 2009 UK: John Wiley & Sons, Ltd.
21. Travis WD, B.E., Burke AP, Marx A, Nicholson AG, *WHO: Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Fourth edition ed. 2015: WHO Publications Center.
22. Rindi, G., et al., *A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal*. Mod Pathol, 2018. **31**(12): p. 1770-1786.
23. Modlin, I.M., K.D. Lye, and M. Kidd, *A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors*. Cancer, 2003. **97**(4): p. 934-59.

24. Leoncini, E., et al., *Risk factors for neuroendocrine neoplasms: a systematic review and meta-analysis*. Ann Oncol, 2016. **27**(1): p. 68-81.
25. Yao, J.C., et al., *One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States*. J Clin Oncol, 2008. **26**(18): p. 3063-72.
26. Fraenkel, M., et al., *Incidence of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: a systematic review of the literature*. Endocr Relat Cancer, 2014. **21**(3): p. R153-63.
27. Schott, M., et al., *Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien*. Dtsch Arztebl International, 2011. **108**(18): p. 305-12.
28. Gustafsson, B.I., et al., *Carcinoid heart disease*. Int J Cardiol, 2008. **129**(3): p. 318-24.
29. Shrager, J.B., et al., *Bronchopulmonary carcinoid tumors associated with Cushing's syndrome: a more aggressive variant of typical carcinoid*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1997. **114**(3): p. 367-75.
30. Athanassiadi, K., et al., *Acromegaly caused by ectopic growth hormone-releasing hormone secretion by a carcinoid bronchial tumor: a rare entity*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **128**(4): p. 631-2.
31. Fottner, C., M. Ferrata, and M.M. Weber, *Hormone secreting gastro-entero-pancreatic neuroendocrine neoplasias (GEP-NEN): When to consider, how to diagnose?* Rev Endocr Metab Disord, 2017. **18**(4): p. 393-410.
32. Mafficini, A. and A. Scarpa, *Genetics and Epigenetics of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms*. Endocr Rev, 2019. **40**(2): p. 506-536.
33. Modlin, I.M., et al., *Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*. Lancet Oncol, 2008. **9**(1): p. 61-72.
34. Koo, J. and D. Dhall, *Problems with the diagnosis of metastatic neuroendocrine neoplasms. Which diagnostic criteria should we use to determine tumor origin and help guide therapy?* Semin Diagn Pathol, 2015. **32**(6): p. 456-68.
35. Seregini, E., et al., *Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours*. Ann Oncol, 2001. **12 Suppl 2**: p. S69-72.
36. Carney, D.N., et al., *Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer*. Lancet, 1982. **1**(8272): p. 583-5.
37. Baudin' E., G.A., Ducreux M., Ropers J., Comoy E., Sabourin J.C., Bidart J.M., Cailleux A.F., Bonaccil R., Ruffi P. and Schlumbergerl M., *Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours*. British Journal of Cancer(1998) **78**(8). 1102-1107, 1998.
38. Liu, E., et al., *Assessment of NETest Clinical Utility in a U.S. Registry-Based Study*. Oncologist, 2019. **24**(6): p. 783-790.
39. Malczewska, A., et al., *Blood mRNA Measurement (NETest) for Neuroendocrine Tumor Diagnosis of Image-Negative Liver Metastatic Disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2019. **104**(3): p. 867-872.
40. Malczewska, A., et al., *NETest Liquid Biopsy Is Diagnostic of Lung Neuroendocrine Tumors and Identifies Progressive Disease*. Neuroendocrinology, 2019. **108**(3): p. 219-231.
41. Malczewska, A., et al., *NETest liquid biopsy is diagnostic of small intestine and pancreatic neuroendocrine tumors and correlates with imaging*. Endocr Connect, 2019.
42. Gut, P., et al., *Chromogranin A - unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls*. Arch Med Sci, 2016. **12**(1): p. 1-9.
43. Huttner, W.B., H.H. Gerdes, and P. Rosa, *The granin (chromogranin/secretogranin) family*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(1): p. 27-30.
44. Fargali, S., et al., *The granin VGF promotes genesis of secretory vesicles, and regulates circulating catecholamine levels and blood pressure*. Faseb j, 2014. **28**(5): p. 2120-33.
45. Bartolomucci, A., et al., *The extended granin family: structure, function, and biomedical implications*. Endocr Rev, 2011. **32**(6): p. 755-97.
46. Modlin, I.M., et al., *Chromogranin A--biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(9): p. 2427-43.

47. Burghuber O.C., M., \* Worofka B., MD, Scherthaner G., MD,\* Vetter N., MD, Neumann M., MD, Dudczak R., MD, Kuzmits R., MD", *Serum Neuron-Specific Enolase Is a Useful Tumor Marker for Small Cell Lung Cancer*. *Cancer* 65:1386-1390,1990, 1990.
48. Redecker, P. and D. Grube, [*Synaptophysin in the nervous system and endocrine cells*]. *Acta Histochem Suppl*, 1992. **42**: p. 33-8.
49. Winter, K.S., et al., [*Pulmonary carcinoids and carcinoids of the small intestine*]. *Radiologe*, 2019. **59**(11): p. 968-974.
50. Rubenthaler, J., et al., [*Neuroendocrine tumors of the stomach, duodenum and pancreas : Value of (hybrid) radiological diagnostics*]. *Radiologe*, 2019. **59**(11): p. 961-967.
51. Bodei, L., et al., *The status of neuroendocrine tumor imaging: from darkness to light?* *Neuroendocrinology*, 2015. **101**(1): p. 1-17.
52. [*Practice guideline neuroendocrine tumors - AWMF-Reg. 021-27*]. *Z Gastroenterol*, 2018. **56**(6): p. 583-681.
53. Auernhammer, C.J., et al., *Advanced neuroendocrine tumours of the small intestine and pancreas: clinical developments, controversies, and future strategies*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018. **6**(5): p. 404-415.
54. Jin, X.F., et al., *Supportive therapy in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: Often forgotten but important*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2018. **19**(2): p. 145-158.
55. Auernhammer, C.J. and B. Goke, *Therapeutic strategies for advanced neuroendocrine carcinomas of jejunum/ileum and pancreatic origin*. *Gut*, 2011. **60**(7): p. 1009-21.
56. Scherubl, H., et al., *Management of early gastrointestinal neuroendocrine neoplasms*. *World J Gastrointest Endosc*, 2011. **3**(7): p. 133-9.
57. Hicks, R.J., et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasia: Peptide Receptor Radionuclide Therapy with Radiolabeled Somatostatin Analogues*. *Neuroendocrinology*, 2017. **105**(3): p. 295-309.
58. Demirkan, B.H.M. and B. Eriksson, *Systemic treatment of neuroendocrine tumors with hepatic metastases*. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 2012. **23**(5): p. 427-437.
59. Auernhammer, C.J., et al., [*Medicinal therapy of metastasized neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system.*]. *Internist (Berl)*, 2012.
60. Faiss, S., et al., *Prospective, randomized, multicenter trial on the antiproliferative effect of lanreotide, interferon alfa, and their combination for therapy of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors--the International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(14): p. 2689-96.
61. Neychev, V., et al., *Mutation-targeted therapy with sunitinib or everolimus in patients with advanced low-grade or intermediate-grade neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract and pancreas with or without cytoreductive surgery: protocol for a phase II clinical trial*. *BMJ Open*, 2015. **5**(5): p. e008248.
62. Yao, J.C., et al., *Everolimus in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: the clinical experience*. *Cancer Res*, 2013. **73**(5): p. 1449-53.
63. Kulke, M.H., et al., *Telotristat etiprate, a novel serotonin synthesis inhibitor, in patients with carcinoid syndrome and diarrhea not adequately controlled by octreotide*. *Endocr Relat Cancer*, 2014. **21**(5): p. 705-14.
64. Pavel, M., et al., *Telotristat etiprate for carcinoid syndrome: a single-arm, multicenter trial*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(4): p. 1511-9.
65. Wang, T., D. Yu, and M.L. Lamb, *Trk kinase inhibitors as new treatments for cancer and pain*. *Expert Opin Ther Pat*, 2009. **19**(3): p. 305-19.
66. Barbacid, M., et al., *The trk family of tyrosine protein kinase receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1072**(2-3): p. 115-27.
67. Martin-Zanca, D., S.H. Hughes, and M. Barbacid, *A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences*. *Nature*, 1986. **319**(6056): p. 743-8.

68. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Trk receptors: roles in neuronal signal transduction*. *Annu Rev Biochem*, 2003. **72**: p. 609-42.
69. Albaugh, P., et al., *Discovery of GNF-5837, a Selective TRK Inhibitor with Efficacy in Rodent Cancer Tumor Models*. *ACS Med Chem Lett*, 2012. **3**(2): p. 140-5.
70. Cocco, E., M. Scaltriti, and A. Drilon, *NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018. **15**(12): p. 731-747.
71. Kheder, E.S. and D.S. Hong, *Emerging Targeted Therapy for Tumors with NTRK Fusion Proteins*. *Clin Cancer Res*, 2018. **24**(23): p. 5807-5814.
72. Markl, B., K. Hirschbuhl, and C. Dhillon, *NTRK-Fusions - A new kid on the block*. *Pathol Res Pract*, 2019. **215**(10): p. 152572.
73. Federman, N. and R. McDermott, *Larotrectinib, a highly selective tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitor for the treatment of TRK fusion cancer*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2019. **12**(10): p. 931-939.
74. Drilon, A., et al., *Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(8): p. 731-739.
75. Deinhardt, K. and M.V. Chao, *Trk receptors*. *Handb Exp Pharmacol*, 2014. **220**: p. 103-19.
76. Denkins, Y., et al., *Brain metastases in melanoma: roles of neurotrophins*. *Neuro Oncol*, 2004. **6**(2): p. 154-65.
77. Friedman, W.J., Greene, L. A., *Neurotrophin Signaling via Trks and p75*. *Experimental Cell Research* 253, 131–142 (1999), 1999.
78. Lee, R., et al., *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins*. *Science*, 2001. **294**(5548): p. 1945-8.
79. Bertrand, T., et al., *The crystal structures of TrkA and TrkB suggest key regions for achieving selective inhibition*. *J Mol Biol*, 2012. **423**(3): p. 439-53.
80. Yoshino, T., et al., *JSCO-ESMO-ASCO-JSMO-TOS: international expert consensus recommendations for tumour-agnostic treatments in patients with solid tumours with microsatellite instability or NTRK fusions*. *Ann Oncol*, 2020.
81. Chu, P., et al., *Systematic review of neurotrophic tropomyosin-related kinase inhibition as a tumor-agnostic management strategy*. *Future Oncol*, 2020. **16**(4): p. 61-74.
82. EMA, *Vitrakvi, Larotrectinib; Authorisation details*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vitrakvi#authorisation-details-section>, 2019.
83. FDA, U.S., *FDA approves larotrectinib for solid tumors with NTRK gene fusions*; <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-larotrectinib-solid-tumors-ntrk-gene-fusions-0>, 2018.
84. Doebele, R.C., et al., *Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials*. *Lancet Oncol*, 2020. **21**(2): p. 271-282.
85. FDA, U.S., *FDA approves entrectinib for NTRK solid tumors and ROS-1 NSCLC* <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-entrectinib-ntrk-solid-tumors-and-ros-1-nsclc>, 2019.
86. Sigal, D.S., et al., *Comprehensive genomic profiling identifies novel NTRK fusions in neuroendocrine tumors*. *Oncotarget*, 2018. **9**(88): p. 35809-35812.
87. Boora, G.K., et al., *Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines*. *Cancer Genet*, 2015. **208**(7-8): p. 374-81.
88. Hofving, T., et al., *The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines*. *Endocr Relat Cancer*, 2018. **25**(4): p. X1-X2.
89. Evers, B.M., et al., *Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth*. *Gastroenterology*, 1991. **101**(2): p. 303-11.
90. Grozinsky-Glasberg, S., I. Shimon, and H. Rubinfeld, *The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors*. *Neuroendocrinology*, 2012. **96**(3): p. 173-87.

91. Kolby, L., et al., *A transplantable human carcinoid as model for somatostatin receptor-mediated and amine transporter-mediated radionuclide uptake*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(2): p. 745-55.
92. Knosel, T., et al., *Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer*. *Neoplasia*, 2005. **7**(8): p. 741-7.
93. Knosel, T., et al., *Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using multiplex analysis of tissue microarrays*. *Cell Oncol*, 2006. **28**(4): p. 167-75.
94. Aristizabal Prada, E.T., et al., *Tropomyosin receptor kinase: a novel target in screened neuroendocrine tumors*. *Endocr Relat Cancer*, 2018. **25**(5): p. 547-560.
95. Aristizabal Prada, E.T. and C.J. Auernhammer, *Targeted therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: preclinical strategies and future targets*. *Endocr Connect*, 2018. **7**(1): p. R1-R25.
96. Frilling, A., et al., *Recommendations for management of patients with neuroendocrine liver metastases*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(1): p. e8-21.
97. Shargh, V.H., H. Hondermarck, and M. Liang, *Albumin hybrid nanoparticles loaded with tyrosine kinase A inhibitor GNF-5837 for targeted inhibition of breast cancer cell growth and invasion*. *Int J Pharm*, 2016. **515**(1-2): p. 527-534.
98. Seo, J.H., et al., *Anti-cancer effect of HS-345, a new tropomyosin-related kinase A inhibitor, on human pancreatic cancer*. *Cancer Lett*, 2013. **338**(2): p. 271-81.
99. Dolle, L., et al., *Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(36): p. 5592-601.
100. Lagadec, C., et al., *TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells*. *Oncogene*, 2009. **28**(18): p. 1960-70.
101. Padiaditakis, I., et al., *Selective and differential interactions of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, with TrkA receptors, regulating neuronal survival and differentiation*. *Neuropharmacology*, 2016. **111**: p. 266-282.
102. Sortino, M.A., et al., *Mitogenic effect of nerve growth factor (NGF) in LNCaP prostate adenocarcinoma cells: role of the high- and low-affinity NGF receptors*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(1): p. 124-36.
103. Harel, L., B. Costa, and M. Fainzilber, *On the death Trk*. *Dev Neurobiol*, 2010. **70**(5): p. 298-303.
104. Brodeur, G.M., et al., *Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(10): p. 3244-50.
105. Gulino, A., A. Arcella, and F. Giangaspero, *Pathological and molecular heterogeneity of medulloblastoma*. *Curr Opin Oncol*, 2008. **20**(6): p. 668-75.
106. Tauszig-Delamasure, S., et al., *The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(33): p. 13361-6.
107. Nikolettou, V., et al., *Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not*. *Nature*, 2010. **467**(7311): p. 59-63.
108. Goldschneider, D. and P. Mehlen, *Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy*. *Oncogene*, 2010. **29**(13): p. 1865-82.
109. Mehlen, P., C. Delloye-Bourgeois, and A. Chedotal, *Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets?* *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(3): p. 188-97.
110. Luberg, K., et al., *Novel transcripts reveal a complex structure of the human TRKA gene and imply the presence of multiple protein isoforms*. *BMC Neurosci*, 2015. **16**: p. 78.
111. Tacconelli, A., et al., *Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma*. *Future Oncol*, 2005. **1**(5): p. 689-98.
112. Farina, A.R., et al., *The neuroblastoma tumour-suppressor TrkAI and its oncogenic alternative TrkAIII splice variant exhibit geldanamycin-sensitive interactions with Hsp90 in human neuroblastoma cells*. *Oncogene*, 2009. **28**(46): p. 4075-94.
113. Maliartchouk, S., et al., *Genuine monovalent ligands of TrkA nerve growth factor receptors reveal a novel pharmacological mechanism of action*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(14): p. 9946-56.



114. Freund-Michel, V. and N. Frossard, *Overexpression of functional TrkA receptors after internalisation in human airway smooth muscle cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(10): p. 1964-71.
115. Tagliabue, E., et al., *Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(8): p. 5388-94.
116. Zitzmann, K., et al., *The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells*. *Neuroendocrinology*, 2007. **85**(1): p. 54-60.
117. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
118. Briest, F. and P. Grabowski, *PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: the complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms*. *Theranostics*, 2014. **4**(4): p. 336-65.
119. Zitzmann, K., et al., *The novel Raf inhibitor Raf265 decreases Bcl-2 levels and confers TRAIL-sensitivity to neuroendocrine tumour cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2011. **18**(2): p. 277-85.
120. Iida, S., et al., *Synergistic anti-tumor effects of RAD001 with MEK inhibitors in neuroendocrine tumors: a potential mechanism of therapeutic limitation of mTOR inhibitor*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **350**(1): p. 99-106.
121. Valentino, J.D., et al., *Cotargeting the PI3K and RAS pathways for the treatment of neuroendocrine tumors*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(5): p. 1212-22.
122. Van Gompel, J.J., et al., *ZM336372, a Raf-1 activator, suppresses growth and neuroendocrine hormone levels in carcinoid tumor cells*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(6): p. 910-7.
123. Demir, I.E., et al., *Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1866**(1): p. 37-50.
124. Jang, S.W., et al., *Gambogic amide, a selective agonist for TrkA receptor that possesses robust neurotrophic activity, prevents neuronal cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(41): p. 16329-34.
125. Sofroniew, M.V., C.L. Howe, and W.C. Mobley, *Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 1217-81.
126. Lange, C.A. and D. Yee, *Killing the second messenger: targeting loss of cell cycle control in endocrine-resistant breast cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2011. **18**(4): p. C19-24.
127. Gao, N., et al., *Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **310**(4): p. 1124-32.
128. Ivanov, S.V., et al., *TrkC signaling is activated in adenoid cystic carcinoma and requires NT-3 to stimulate invasive behavior*. *Oncogene*, 2013. **32**(32): p. 3698-710.
129. Moussa, R.S., et al., *Transcriptional regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21(CIP1/WAF1), by the chelator, Dp44mT*. *Biochim Biophys Acta*, 2018. **1862**(3): p. 761-774.
130. Abbas, T. and A. Dutta, *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(6): p. 400-14.
131. Gartel, A.L. and A.L. Tyner, *The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(8): p. 639-49.
132. Pavel, M.E., et al., *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): p. 2005-2012.
133. Yao, J.C., et al., *Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study*. *Lancet*, 2016. **387**(10022): p. 968-77.
134. Yao, J.C., et al., *Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study*. *Lancet*, 2016. **387**(10022): p. 968-977.
135. Zatelli, M.C., et al., *Predictive factors of response to mTOR inhibitors in neuroendocrine tumours*. *Endocr Relat Cancer*, 2016. **23**(3): p. R173-83.
136. Wagle, N., et al., *Response and acquired resistance to everolimus in anaplastic thyroid cancer*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(15): p. 1426-33.

137. He, K., et al., *BRAFV600E-dependent Mcl-1 stabilization leads to everolimus resistance in colon cancer cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(30): p. 47699-47710.
138. Vandamme, T., et al., *Long-term acquired everolimus resistance in pancreatic neuroendocrine tumours can be overcome with novel PI3K-AKT-mTOR inhibitors*. *Br J Cancer*, 2016. **114**(6): p. 650-8.
139. Capozzi, M., et al., *Everolimus and pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): Activity, resistance and how to overcome it*. *Int J Surg*, 2015. **21 Suppl 1**: p. S89-94.
140. Zitzmann, K., et al., *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): p. 100-9.
141. Rhein, M., et al., *Leukemias induced by altered TRK-signaling are sensitive to mTOR inhibitors in preclinical models*. *Ann Hematol*, 2011. **90**(3): p. 283-92.
142. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. *Science*, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
143. Fisher, R.P., *Getting to S: CDK functions and targets on the path to cell-cycle commitment*. *F1000Res*, 2016. **5**: p. 2374.
144. Lai, P.B., et al., *Cell cycle arrest and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells exposed to eicosapentaenoic acid in vitro*. *Br J Cancer*, 1996. **74**(9): p. 1375-83.
145. Heinen, T.E., et al., *Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(23): p. 34860-80.
146. Guo, D., et al., *More expressions of BDNF and TrkB in multiple hepatocellular carcinoma and anti-BDNF or K252a induced apoptosis, suppressed invasion of HepG2 and HCCLM3 cells*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011. **30**: p. 97.
147. Pierucci, D., et al., *NGF-withdrawal induces apoptosis in pancreatic beta cells in vitro*. *Diabetologia*, 2001. **44**(10): p. 1281-95.
148. Barnabe-Heider, F. and F.D. Miller, *Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways*. *J Neurosci*, 2003. **23**(12): p. 5149-60.
149. Kruttgen, A., I. Schneider, and J. Weis, *The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias*. *Brain Pathol*, 2006. **16**(4): p. 304-10.
150. Sigal, D., et al., *Activity of Entrectinib in a Patient With the First Reported NTRK Fusion in Neuroendocrine Cancer*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017. **15**(11): p. 1317-1322.
151. *Entrectinib Effective across NTRK Fusion-Positive Cancers*. *Cancer Discov*, 2019. **9**(1): p. OF4.
152. Al-Salama, Z.T. and S.J. Keam, *Entrectinib: First Global Approval*. *Drugs*, 2019. **79**(13): p. 1477-1483.

## **10. Danksagung**

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. med. Christoph Auerhammer, Arbeitsgruppe „Neuroendokrine Tumoren“ der Medizinischen Klinik 4 Campus Großhadern, LMU Klinikum für das Überlassen des Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Univ.- Prof. Dr. med. Thomas Knösel, Institut für Pathologie der LMU München, für die Anleitung bei der Auswahl der Gewebeproben und die Durchführung des TMA.

Julian Maurer und Gerald Spöttl für die hervorragende Einarbeitung und die Hilfestellung für den experimentellen Abschnitt sowie die technische Unterstützung und die vielen schönen Stunden im Labor.

Elke Tatjana Aristizabal Prada für ihre Motivation und außergewöhnlichen Einsatz.

Dr. med. Martin Sailer für die Unterstützung beim Verfassen einer wissenschaftlichen Arbeit sowie seine große Geduld und Ermutigungen.

Meinen Eltern für die Finanzierung meines Studiums.