



Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am 10.05.2007.  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

**Dekan:** Prof. Dr. B. Maisch

**Referent:** PD. Dr. D. Hörsch

**Korreferent:** Prof. Dr. R. Lill

## Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>A EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NETs)</b>	<b>1</b>
1.1. Serotonin-produzierende neuroendokrine Tumore („Karzinoide“)	3
1.2. Insulinome	4
1.3. Gastrinome	5
<b>2. Molekulare Genese von GEP-NETs</b>	<b>7</b>
2.1. Multiple endokrine Neoplasien (MEN)	8
2.2. Von-Hippel-Lindau (VHL) Syndrom	9
2.3. Neurofibromatose Typ 1 (NF1) und Tuberöse Sklerose	10
<b>3. Der MAPK-Signaltransduktionsweg mit der GTPase Rap1 und der Kinase B-Raf</b>	<b>10</b>
3.1. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	11
3.2. Mechanismen der Signaltransduktion	13
3.3. Raf Isoformen	13
3.4. Rap1 und B-Raf	14
3.5. Mutationen im Ras/B-Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsmodul	15
<b>4. Der Rafkinase-Inhibitor Sorafenib (BAY 43-9006)</b>	<b>16</b>
<b>5. Ziel der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>B MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>1. Versuchsplan</b>	<b>19</b>
<b>2. Materialien</b>	<b>19</b>
2.1. Antikörper	20
2.2. Puffer und Lösungen	21
<b>3. Methoden</b>	<b>23</b>
3.1. Immunhistochemie	23
3.1.1. Die nach Hsu et al. modifizierte ABC-Methode	23
3.1.2. Spiegelschnitte	24
3.1.3. Die immunhistochemische Anfärbung der GEP-NETs	24
3.2. Zellkultur	26
3.3. Gal4-Elk1-abhängiger Luziferaseassay	27
3.4. MTT-Assay	28
3.5. Western-Blot	29

3.5.1. Aufarbeiten der Proteinproben und Quantifizierung	29
3.5.2. Diskontinuierliche SDS- Gelelektrophorese	30
3.5.3. Elektrotransfer	31
3.5.4. Immunodetektion	31
<b>C ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
1. Immunhistochemie	32
2. Luziferaseassay	39
3. MTT-Assay	40
4. Westernblot	42
5. Zusammenfassung der Ergebnisse	44
<b>D DISKUSSION</b>	<b>45</b>
1. Der Terminus „GEP-NETs“ und seine Problematik	45
2. Die Aussagekraft der immunhistochemischen Ergebnisse	46
3. Die Rolle von Rap1 und B-Raf in der molekularen Genese von GEP-NETs	48
4. Der Effekt von Rap1 und B-Raf auf die MAPK-Aktivierung in GEP-NETs	49
5. Der Einfluss von B-Raf-Mutanten auf die Signaltransduktion im B-Raf/MEK/ERK-Modul	49
6. Die Bedeutung des Rafkinase-Inhibitors Sorafenib (BAY 43-9006) in der Therapie von GEP-NETs	51
<b>E ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>53</b>
<b>F LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>55</b>
<b>G ANHANG</b>	<b>61</b>
1. Verzeichnis der Abkürzungen	61
2. Verzeichnis der Abbildungen	63
3. Verzeichnis der Tabellen	63
4. Verzeichnis der akademischen Lehrer	64
5. Publikationen	65
6. Danksagung	66

## A Einleitung

### 1. Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NETs)

GEP-NETs sind seltene Tumore, die aus Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems des Gastrointestinaltraktes oder Pankreas entstehen. Die Bezeichnung neuroendokrin ist auf die phänotypische Verwandtschaft mit neuronalen Zellen bezüglich der Expression von Proteinen wie Synaptophysin, neuronenspezifische Enolase und Chromogranin A zurückzuführen. Gegenwärtig sind mindestens 15 verschiedene endokrine Zelltypen in Pankreas und der Mucosa des Gastrointestinaltraktes bekannt.

Es werden zwei Hauptkategorien der GEP-NETs unterschieden: gut differenzierte und schlecht/wenig differenzierte Tumoren. Die beiden Kategorien unterscheiden sich stark in der Expression von Tumormarkern wie Chromogranin A, in der histologischen Morphologie und in ihrem klinischen Verhalten.

Die GEP-NETs werden in funktionell aktive und inaktive Tumoren unterteilt, wobei die nicht-aktiven bzw. nicht-funktionellen Tumoren wesentlich häufiger sind. Die funktionell aktiven Tumoren können durch die produzierten Polypeptide und Amine eine Vielzahl an klinischen Symptomen hervorrufen. Zu den häufigsten funktionell aktiven GEP-NETs zählen Serotonin-produzierende NETs, Insulinome und Gastrinome. Bei Serotonin-produzierenden NETs stehen Diarrhöen und Koliken im Vordergrund, bei Insulinomen schwere Hypoglykämien und bei Gastrinomen mit Zollinger-Ellison-Syndrom therapierefraktäre peptische Läsionen. Wesentlich seltenere funktionell aktive GEP-NETs sind VIPome, Glukagonome, Somatostatinome sowie die extrem seltenen GRFome (*Growth-hormone-releasing hormone*) und ACTHome (Adrenokortikotropes Hormon). VIPome sezernieren Vasoaktives Intestinales Peptid, welches ein Verner-Morrison-Syndrom mit wässriger Diarrhö, Hypokaliämie und Achlorhydrie auslöst. Glukagonome fallen durch ein migratorisches nekrolytisches Exanthem bei milder diabetischer Stoffwechsellage und Gewichtsverlust auf. Somatostatinome verursachen einen Symptomkomplex aus Cholelithiasis, Diabetes, Steatorrhö und Achlorhydrie (Rindi et al. 2000; Calender 2000; Delle Fave und Corleto 2001; Rindi und Bordi 2003; Rindi und Klöppel 2004).

In dieser Arbeit wurden Serotonin-produzierende NETs, Insulinome und Gastrinome untersucht.

Tabelle 1: Gastrointestinale neuroendokrine Tumorsyndrome

Bezeichnung	Sezernierte biologisch aktive Peptide	Inzidenz <sup>1</sup>	Tumorlokalisation	Malignität (%)	Assoziation mit MEN-1 (%)	Hauptsymptome
<b><u>1. gesicherte spezifische funktionelle Syndrome</u></b>						
<b>Karzinoidtumor</b>						
Karzinoid-Syndrom	Serotonin, evtl. Tachykinine, Motilin, Prostaglandine	0,52	Mitteldarm (75-87%) Vorderdarm (2-33%) Hinterdarm (1-8%) Unbekannt (2-15%)	95-100	selten	Diarrhö, Hitzewallungen, Schmerzen, Asthma, Herz-erkrankungen
<b>Pankreatischer endokriner Tumor</b>						
Zollinger-Ellison Syndrom	Gastrin	0,5-1,5	Duodenum (70%) Pankreas (25%) Andere Orte (5%)	60-90	20-25	Schmerzen, Diarrhö, ösophageale Symptome
Insulinom	Insulin	1-2	Pankreas (>99%)	<10	4-5	Hypoglykämische Symptome
VIPom (Verner-Morrison-Syndrom), WDHA	Vasoaktives intestinales Peptid	0,05-2	Pankreas (90%, Erwachsene) Andere (10%, neural, adrenal, periganglionär)	40-70	6	Diarrhö, Hypokaliämie, Dehydrierung
Glukagonom	Glukagon	0,01-0,1	Pankreas (100%)	50-80	1-20	Exanthem, Glukoseintoleranz, Gewichtsverlust
Somato-statinom	Somatostatin	selten	Pankreas (55%) Duodenum-Jejunum (44%)	>70	45	Diabetes mellitus, Cholelithiasis, Diarrhö
<b><u>2. keine funktionellen Symptome</u></b>						
Ppom/nicht funktionell	keine	1-2	Pankreas (100%)	<60	18-44	Gewichtsverlust, Abdominelle Raumforderung, Schmerzen
Modifiziert nach:(Jensen et al. 2002), Tabelle 93-2						
Vorderdarm: Lunge und Bronchus, Thymus, Magen, Pankreas und proximales Duodenum						
Mitteldarm: distales Duodenum, Jejunum, Ileum, Appendix und Kolon ascendens						
Hinterdarm: Kolon transversum und descendens, Rektum						
MEN-1: multiple endokrine Neoplasien Typ 1; VIPom: Tumor, der vasoaktives intestinales Peptid produziert; WDHA: watery diarrhea, hypokalaemia and achlorhydria syndrome; Ppom: Tumor, der pankreatisches Polypeptid produziert						
Zu <sup>1</sup> : Neu-Erkrankungen/10 <sup>6</sup> Einwohner/Jahr						

## 1.1. Serotonin-produzierende neuroendokrine Tumore („Karzinoide“)

Die WHO-Klassifikation von 2000 teilt die mit dem früher oftmals missverständlichen Begriff „Karzinoid“ beschriebenen Tumoren in drei Gruppen ein (WHO Classification of Tumours 2000):

1a Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor (Synonym: Karzinoid): benignes Verhalten oder fragliche Dignität

1b Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom (Synonym: malignes Karzinoid): niedrigmaligne

2 Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom: hochmaligne

Trotz dieser neuen Klassifikation wird häufig noch eine klinische Einteilung in Tumore von Vorderdarm (Lunge und Bronchus, Thymus, Magen, Pankreas und proximales Duodenum), Mitteldarm (distales Duodenum, Jejunum, Ileum, Appendix und Kolon ascendens) und Hinterdarm (Kolon transversum und descendens, Rektum) benutzt (Oberg 2003; Oberg 2005).

Die Serotonin-produzierenden NETs nehmen ihren Ursprung von den enterochromaffinen (EC) Zellen. Bevorzugte Prädispositionsstellen sind Appendix, Rektum, Bronchus und Lunge sowie unterer Dünndarm. Karzinoide produzieren unterschiedliche Mengen an Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HAT), welches in 2 Schritten abgebaut wird und dann als 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) direkt im Urin nachweisbar ist (Kulke und Mayer 1999).

### *Klinik*

Die Patienten mit jejun-ilealen Karzinoiden präsentieren sich am häufigsten mit intermittierenden krampfartigen Bauchschmerzen, welche auf eine intermittierende intestinale Obstruktion hinweisen. Karzinoidtumoren von Duodenum, Magen und Rektum werden häufig als Zufallsbefunde bei einer Endoskopie gefunden. Die Mehrzahl der appendizitischen endokrinen Tumoren wird zufällig in appendektomierten Exemplaren gefunden, das Karzinoidsyndrom ist bei appendizitischen Karzinoiden extrem selten und fast immer mit Metastasen (v. a. in regionalen Lymphknoten und der Leber) verbunden (WHO Classification of Tumours 2000).

Das Vollbild des so genannten Karzinoid-Syndroms umfasst aufgrund der physiologischen Wirkungsweisen von Serotonin Diarrhöen mit Malabsorption, Hitzewallungen mit Flush (tiefe Rötung von Kopf und Oberkörpers), Stimulation der intestinalen Motilität bis hin zu intraabdominellen Krämpfen, Übelkeit und Erbrechen



sowie bei einem Befall des Bronchialsystems Giemen bzw. Asthma. Hinzu kommen eine fibröse Verdickung von Endokard und Rechtsherzklappen. Dieses Vollbild ist allerdings nur bei ausgedehnter Lebermetastasierung vorhanden, da das Serotonin ansonsten in der Leber verstoffwechselt und inaktiviert wird (Kulke und Mayer 1999).

#### *Diagnose und Therapie*

Nach der Überprüfung von 5-HIAA im Urin (bei Tumorpatienten deutlich erhöht) und Lokalisationsdiagnostik mittels Sonographie (transabdominell, endoskopisch, intraoperativ), CT, MRT und Somatostatinrezeptor-Szintigraphie ist die komplette chirurgische Resektion Therapie der Wahl. Ist eine kurative chirurgische Behandlung nicht möglich, kommen Radiofrequenzablation, Chemoembolisation, Lasertherapie, Somatostatinanaloge und Chemotherapie zum Einsatz (Oberg 2003).

## **1.2. Insulinome**

Insulinome sind mit etwa 40-70% die häufigsten aktiven Tumoren des endokrinen Pankreas und nehmen ihren Ursprung von den insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen (Klöppl 2003). Sie liegen in über 99% der Fälle im Pankreas und sind in der Regel klein (1-2 cm) und benigne. Die Mehrheit der Insulinome entsteht sporadisch und die Patienten sind im Durchschnitt 50 Jahre alt (Pelengaris und Khan 2001). Bei etwa 6% der Patienten ist mit dem Vorliegen multipler Insulinome zu rechnen und weitere 6% entstehen im Rahmen einer Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN1). Maligne Insulinome werden bei ca. 5-10% der Patienten beobachtet, sie sind generell größer als 2 cm und durch ein frühzeitiges Auftreten von Metastasen (v.a. in der Leber) gekennzeichnet (Klöppl 2003).

#### *Klinik*

Das Krankheitsbild ist durch die Hypoglykämie charakterisiert. Die Patienten leiden unter typischen hypoglykämischen Anfällen mit Verwirrung, Kopfschmerzen, Orientierungsstörungen, Sehstörungen sowie Schwitzen und Tremor.

#### *Diagnose und Therapie*

Zum Nachweis dient ein Hungerversuch unter kontrollierten klinischen Bedingungen, wobei bei der Mehrzahl der Patienten die Zeichen der Hypoglykämie bereits in den ersten 24 Stunden auftreten. Beweisend gelten Blutzuckerwerte unter 40mg% bei erhöhten Nüchternseruminsulinwerten sowie erhöhtem C-Peptid. Wie bei den Serotoninproduzierenden NETs ist nach der Lokalisationsdiagnostik mittels Sonographie (transabdominell, endoskopisch, intraoperativ), CT und MRT die komplette chirurgische

Resektion Therapie der Wahl. Ist eine kurative chirurgische Behandlung nicht möglich, kommen Radiofrequenzablation, Chemoembolisation, Lasertherapie und Chemotherapie zum Einsatz. Bei inoperablen Tumoren lässt sich die Insulinsekretion mithilfe von Diazoxid oder des Somatostatinanalogons Octreotid medikamentös hemmen.

### **1.3. Gastrinome**

Gastrinome gehen von den G-Zellen aus und sind vorwiegend in Duodenum und Pankreas bzw. im so genannten „Gastrinom- Dreieck“ (Begrenzungen: Einmündung des Ductus cysticus in den Ductus hepaticus communis kranial, Flexura duodeni inferior kaudal und Übergang von Pankreashals in –kopf dorsal) lokalisiert. Mehr als 50% treten multipel auf, ca. 60-90% sind maligne mit Metastasen in regionalen Lymphknoten und Leber und haben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in die Umgebung infiltriert. Duodenale Gastrinome kommen entweder sporadisch oder assoziiert mit einer MEN1 vor. Die MEN1 assoziierten Gastrinome treten im Gegensatz zu den sporadischen Gastrinomen gewöhnlich multipel und fast nur im Duodenum auf (Donow et al. 1991).

#### *Klinik*

Die typische klinische Manifestation ist das Zollinger-Ellison-Syndrom (ZES), welches aus der Trias Pankreastumor, peptisches Ulkus des oberen Gastrointestinaltraktes und Hypersekretion des Magens besteht. Die Hypergastrinämie, die von den autonomen Neoplasmen ausgeht, führt zu einer Stimulierung der Parietalzellen des Magens mit Wachstum der Magenmukosa, Parietalzellhyperplasie und exzessiver Salzsäureproduktion. In 90-95% bestehen rezidivierende Ulzera im Bulbus duodeni. So ist die häufigste klinische Manifestation auch das Auftreten peptischer Läsionen, etwa 0,1% aller Ulkuspatienten haben ein ZES. Die zweithäufigste klinische Manifestation ist eine Diarrhö in 30% der Fälle. Durch die Salzsäureüberproduktion kommt es zur Schleimautreizung und Motilitätssteigerung des Dünndarms mit Diarrhöen (Klöppel 2003).

#### *Diagnose und Therapie*

Als Nachweis dienen ein erhöhter basaler Gastrinspiegel ( $>15$  mEq/l bei Patienten ohne Ulkuschirurgie), eine erhöhte Nüchternhypergastrinämie von  $> 100$ pg/ml sowie ein weiterer Anstieg von Gastrin um über 100% im Provokationstest mit Sekretin (Norton 2005). Lokalisationsdiagnostik und Therapie entsprechen dem Vorgehen bei Serotonin-

produzierenden NETs und Insulinomen. Zur Linderung der Symptome bei funktionell aktiven und nicht operablen Tumoren dienen vor allem Protonenpumpeninhibitoren.

## 2. Molekulare Genese von GEP-NETs

Die Mehrheit der GEP-NETs treten als nicht-familiäre, also sporadische Tumore auf; sie können aber auch als Teil eines komplexen familiären Syndroms auftreten (Leotlela et al. 2003). Hierzu gehören als bekannteste die Multiple Endokrine Neoplasien Typ 1 (MEN1) sowie drei Phakomatosen: das von-Hippel-Lindau-Syndrom, die Neurofibromatose Typ 1 (Morbus Recklinghausen) und die Tuberosöse Sklerose (Morbus Bourneville-Pringle) (Calender 2000).

Sporadische GEP-NETs weisen weder Veränderungen der Onkogene *src*, *ras*, *myc*, *fos*, *jun* noch der Tumorsuppressorgene *p53* und *retinoblastoma susceptibility gene* auf (Rindi et al. 2000; Delle Fave und Corleto 2001). Die Wachstumsfaktoren TGF (transforming growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) und IGF-I (insulin-like growth factor I) sind zwar in die autokrine Stimulation von Tumorzellen involviert, aber auch für diese Gruppe konnte kein Zusammenhang mit der Pathogenese von GEP-NETs hergestellt werden (Delle Fave G. und Corleto 2001). Die häufigsten chromosomalen Abberationen in pankreatischen endokrinen Tumoren sind Gewinne an Chromosom 7 und 20 sowie Verluste an Chromosom 2, 6q, 21q und Y. In gastrointestinalen Karzinoiden sind die häufigsten chromosomalen Abberationen Gewinne an Chromosom 17 und 19 und ein Verlust an Chromosom 18 (Zikusoka et al. 2005). Vorderdarm NETs zeigen häufig Deletionen und Mutationen des MEN1-Gens während Mitteldarm NETs wie Karzinoide selten im Rahmen einer MEN-1 auftreten und dagegen häufiger Verluste der Chromosomen 18, 11q und 16q zeigen. Hinterdarm NETs exprimieren häufig TGF $\alpha$  und den EGF Rezeptor. In Lungen-NETs ist der Verlust von Chromosom 3p die häufigste Veränderung und der Verlust von 5q21 und *p53* Mutationen sind mit aggressiveren Tumoren und einer schlechteren Überlebensrate assoziiert (Leotlela et al. 2003). Eine Variante des Hitzeschockproteins 70 (Hsp70) wurde in NETs identifiziert, aber nicht in normalen Pankreasinseln. CDX-2 ist ein für intestinales Epithel typisches homeodomain Protein. Homeodomain Proteine spielen eine wichtige Rolle in der regionalen Zuordnung von Geweben, der Organogenese und der Zelldifferenzierung. Von CDX-2 wurden im Vergleich zu extraintestinalen NETs hohe Levels in intestinalen NETs nachgewiesen (Oberge 2005a). Eine Überexpression von Cyclin D1 wurde in 43% der PETs gefunden, es zeigte sich jedoch keine Korrelation mit einem spezifischen Tumortyp (Rindi und Bordi 2003).

Alle beschriebenen Untersuchungen zeigen mögliche Tumorentstehungsmodelle für die sporadischen GEP-NETs auf, es konnten aber noch keine Veränderungen in Onkogenen

oder Tumorsuppressorgen postuliert werden. Die molekulare Pathogenese von sporadischen GEP-NETs ist also bisher weitgehend ungeklärt.

Tabelle 2: Genetische Syndrome, die mit einer erhöhten Inzidenz neuroendokriner Tumoren (NET) assoziiert sind

Syndrom	Lokalisation der Genmutation und des Genproduktes	Entität NET/Häufigkeit
MEN1	11q13 (kodiert Menin)	<b>80-100%</b> entwickeln PET (nicht funktionell > Gastrinom > Insulinom)
Von-Hippel-Lindau-Syndrom	3p25	<b>12-17%</b> entwickeln PET (fast immer nicht funktionell)
Neurofibromatose Typ 1	17q11.2 (kodiert Neurofibromin)	Duodenale Somatostatinome (meist nicht funktionell), selten Insulinome, Gastrinome
Tuberöse Sklerose	9q34 (TSC1, kodiert Hamartin) 16p13 (TSC2, kodiert Tuberin)	Entwickeln selten PET (nicht funktionelle und funktionelle [Insulinom, Gastrinom])

Modifiziert nach: (Jensen et al. 2002), Tabelle 93-5

PET= pankreatische endokrine Tumoren

## 2.1. Multiple endokrine Neoplasien (MEN)

Die **MEN1** (Wermer-Syndrom) ist durch das gemeinsame Auftreten endokriner Zellproliferation (Hyperplasie oder Adenom) der Nebenschilddrüsen, des Pankreas/Duodenum und der Hypophyse charakterisiert. Bei 60% der Patienten tritt das Syndrom familiär auf (Mignon 2000). Ungefähr ein Drittel aller der pankreatischen NETs ist mit MEN1 assoziiert. Dieses sind vor allem Gastrinome und nicht-funktionelle Tumore und seltener Insulinome (Rindi et al. 2000). Die im Rahmen einer MEN1 auftretenden pankreatischen Gastrinome auf sind allerdings wesentlich seltener als duodenale Gastrinome (Donow et al. 1991).

Die MEN1 wird autosomal-dominant vererbt. Das MEN1-Gen liegt auf Chromosom 11q13 und kodiert das Tumorsuppressorprotein Menin (Rindi und Bordi 2003). Menin

interagiert mit einer Reihe von Proteinen, die in die Transkriptionskontrolle (die AP1 Transkriptionsfaktoren JunD und cJun sowie Proteine der Nuklear Faktoren (NF)-kappaB Familie) und die Kontrolle der genomischen Stabilität eingreifen (Leotlela et al. 2003).

Bei den Patienten mit MEN1 ist eine vererbte Keimzellmutation des MEN1-Gens mit Funktionsverlust des somatischen Allels assoziiert. Dem zugrunde liegt entweder eine chromosomale Deletion (*loss of heterozygosity* =LOH) oder eine Punktmutation (Rindi und Bordi 2003). Darüber hinaus wurde LOH von Chromosom 11q13 auch bei ungefähr 60% von sporadischen Vorderdarm- NETs und pankreatischen Inselzelltumoren (Gastrinome, Insulinome, VIPome und Glukagonome) gefunden (Leotlela et al. 2003).

Die **MEN2** wird noch einmal unterteilt in MEN2A (Sipple Syndrom) und MEN2B (Gorlin Syndrom). Beiden gemeinsam sind medulläre Schilddrüsenkarzinome (MTC) und Phäochromozytome. Zum MEN2A-Komplex gehört zusätzlich primärer Hyperparathyreoidismus, zum MEN2B-Komplex Schleimhautneurinome, Skelettanomalien (marfanoider Habitus) und intestinale Ganglioneuromatose (Calender 2000). Die MEN2 wird autosomal dominant vererbt. Das RET-Protoonkogen auf Chromosom 10q11-2 kodiert für einen transmembranären Tyrosinkinase (TK) Rezeptor. Der Rezeptor wird durch Missense-Mutationen aktiviert, die entweder die extrazelluläre Dimerisationsdomäne oder intrazelluläre TK-Katalysatorregionen betreffen. In beiden Fällen wird der Rezeptor ohne Einfluss seiner natürlichen Liganden aktiviert. Die MEN2B Punktmutation verändert die Substratspezifität der RET-TK Domäne zugunsten intrazellulärer Substrate und induziert auf diese Weise einen abnormalen Signaltransduktionsweg (Calender 2000). Bisher ist keine Assoziation zwischen GEP-NETs und MEN2 bekannt.

## 2.2. Von-Hippel-Lindau (VHL) Syndrom

Auch dieses Syndrom wird autosomal- dominant vererbt und ist durch das gemeinsame Auftreten von Nierenzellkarzinom, retinalem und/oder zerebellärem Hämangioblastom, Phäochromozytom und zystischen und/oder endokrinen Pankreastumoren gekennzeichnet. Das VHL-Gen auf Chromosom 3p35-26 kodiert für ein Protein, das mit der Elongin Proteinfamilie interagiert, welche als Regulatoren für die transkriptionelle Elongation agieren. Die GEP-NETs im Rahmen eines VHL zeigen typische neuroendokrine Charakteristika, die meisten sind multipel und nichtfunktionell und 30-

40% zeigen eine fokale Reaktion mit pankreatischem Polypeptid, Somatostatin, Glukagon und/oder Insulin (Calender 2000).

### 2.3. Neurofibromatose Typ 1 (NF1) und Tuberöse Sklerose

Die **Neurofibromatose Typ 1 (Morbus Recklinghausen)** wird autosomal-dominant vererbt und ist charakterisiert durch kutane Neurofibrome, Pigmentanomalien der Haut (Café-au-lait-Flecken und Lentigines), Pseudoarthrose der Tibia und Lisch-Knötchen (Irishamartome). Das NF1 Gen auf Chromosom 17q kodiert für das Protein Neurofibromin (Lynch und Gutmann 2002).

Die **Tuberöse Hirnsklerose (Morbus Bourneville-Pringle)** wird ebenfalls autosomal dominant vererbt und ist durch Krampfanfälle, mentale Retardierung, renale Dysfunktion und Hautveränderungen charakterisiert. Sie wird durch Mutationen in den Tumorsuppressorgenen TSC1 (9q, kodiert für Hamartin) und TSC2 (16q, kodiert für Tuberin) ausgelöst (van Sleightenhorst et al. 1997).

Bei Patienten mit GEP-NETs im Rahmen einer NF1 oder TSC wurden multiple Tumoren in Pankreas und/oder Duodenum mit psammomkörperartigen histologischen Merkmalen und einem häufigen immunhistochemischen Nachweis von Somatostatin und/oder Insulin gefunden. Sowohl Neurofibromin als auch Hamartin und Tuberin modulieren die intrazelluläre Signaltransduktion über G-Protein-vermittelte Aktivierung. Neurofibromin agiert als ein negativer Regulator von Ras-GTPasen indem es den GTP-Ras-Komplex stört. Tuberin ist ein GTPase-aktivierendes Protein, welches mit Rab-5 interagiert, einem endosomalen Rap-1 verwandten kleinen G-Protein. Hamartin zeigt zwar keine Homologie zu Tuberin, könnte mit Tuberin aber durch coiled-coil Domänen interagieren (Calender 2000).

### 3. Der MAPK-Signaltransduktionsweg mit der GTPase Rap1 und der Kinase B-Raf

Signaltransduktionsnetzwerke erlauben der Zelle, Veränderungen in der extrazellulären Umgebung wahrzunehmen und mit einer adäquaten Antwort zu reagieren. Hierfür wird häufig eine Kaskade von sequentiell phosphorylierten und auf diese Weise aktivierten Proteinkinase genutzt. Zur Phosphorylierung dienen hauptsächlich die alkoholischen

Gruppen der Aminosäuren Serin und Threonin sowie die phenolische Gruppe von Tyrosin. Dementsprechend spricht man von Serin/Threonin (Ser/Thr)-Kinasen oder Tyrosin (Tyr)-Kinasen. Eine dritte Gruppe wiederum, die sowohl Ser/Thr- als auch Tyr-Reste phosphorylieren kann, wird dualspezifische Kinasen genannt (Dhanasekaran und Premkumar 1998).

### 3.1. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Zu den wohl am besten untersuchten Signaltransduktionskaskaden gehören die Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)-Kaskaden, die eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum, Differenzierung, Stressantwort, Entwicklung und Apoptose spielen (Schaeffer und Weber 1999).

Der evolutionär stark konservierte MAPK-Signaltransduktionsweg besteht im Wesentlichen aus einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor und drei aufeinander folgenden Kinasen (siehe Abb.1): die MAPKKK (eine MAPK Kinase Kinase), die eine MAPKK (MAPK Kinase) phosphoryliert und somit aktiviert, welche wiederum die MAPK phosphoryliert und aktiviert. Die MAPKKK und MAPK sind Ser/Thr- Kinasen, die MAPKK ist eine dualspezifische Kinase (Kolch 2000).

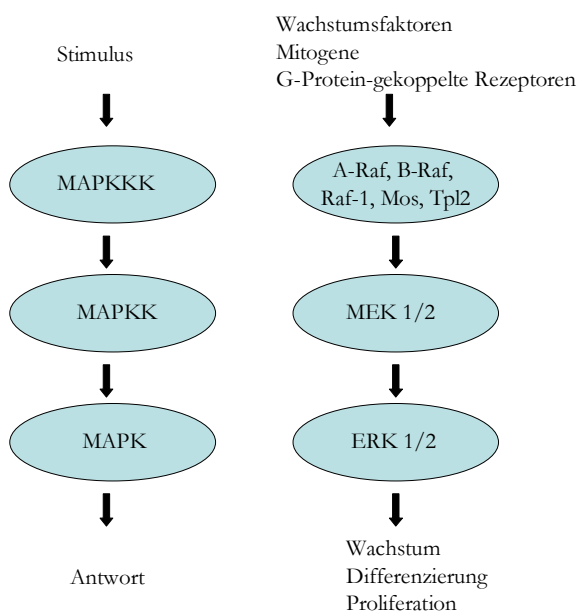


Abbildung 1: Schema der Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kaskade. Abkürzungen und Erläuterung siehe Text.



Zurzeit werden fünf MAPK- Module unterschieden. Die extrazellulär-signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2)-Kaskade reguliert vor allem Zellwachstum und Differenzierung. Die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) -cJun N-terminale Kinase (JNK)-Kaskade und p38-MAPK Kaskade agieren hauptsächlich bei Stressantworten wie Inflammation und Apoptose. Weitere Module sind die ERK3- und ERK5-Kaskaden (Schaeffer 1999). Von diesen fünf Modulen ist das mit den MAPKs ERK1 und ERK 2 (Synonym: p44 und p42 MAPK) das am besten untersuchte. Hier agiert Ras als G-Protein, Raf als MAPKKK, MEK 1/2 (MAPK/ERK Kinase 1/2. Synonym: MKK1/2) als MAPKK und ERK1/2 als MAPK (siehe Abb. 2).

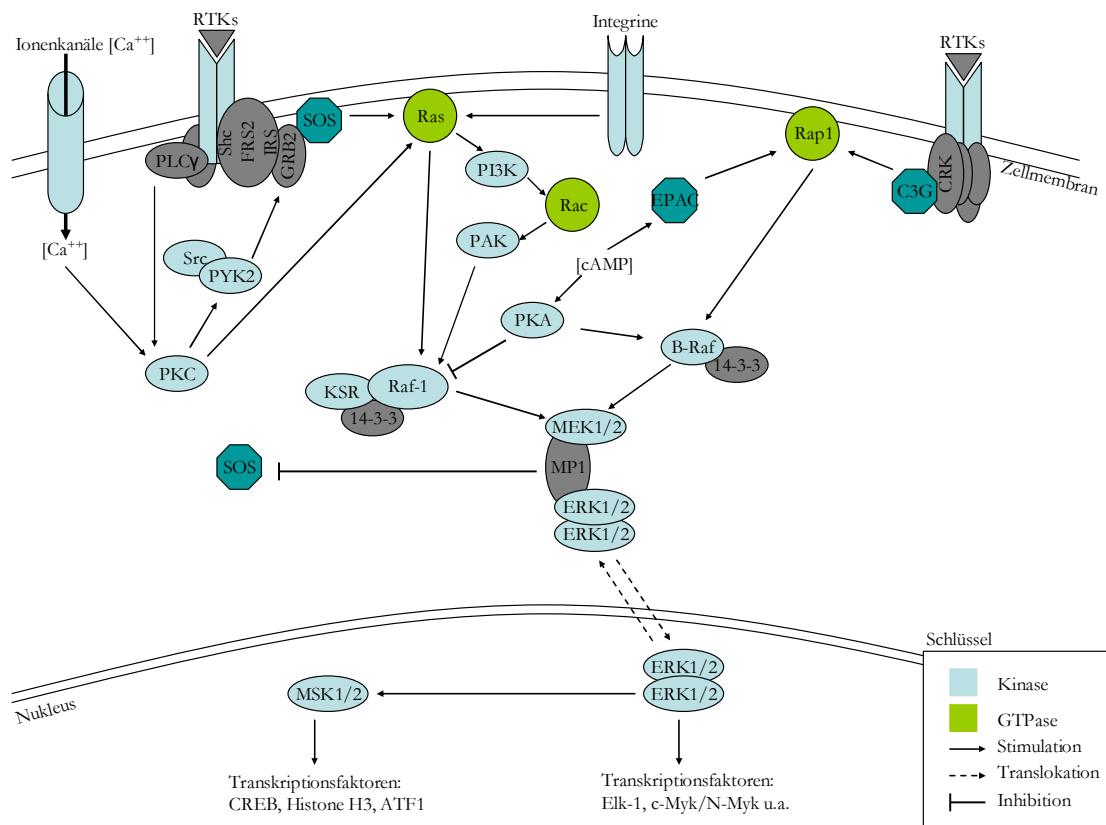


Abbildung 2: Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Proliferation. Abkürzungen: RTK: Rezeptor Tyrosin Kinase, CRK: *CT10 sarcoma oncogene cellular homolog*, C3G: *Guanine nucleotide–releasing factor 2*, Rap1: *Ras proximate 1*, EPAC: *Exchange protein activated by cAMP*, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, PLCγ: Phospholipase C Gamma, KSR: Kinase Suppressor von Ras, MEK: MAPK/ERK Kinase, MP1: MEK Partner 1, ERK: extrazellulär signalregulierte Kinase, SOS: *Son of sevenless*. PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PYK2: Prolinreiche Tyrosinkinase 2, GRB2: *Growth factor receptor–bound protein 2*, Shc: *SH2-containing collagen-related proteins*. Erläuterungen siehe Text.

### 3.2. Mechanismen der Signaltransduktion

Eine Vielzahl an Hormonen, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren und auch tumorfördernden Substanzen nutzt das ERK1/2-Modul zur Signalweiterleitung. Die meisten dieser Stimuli docken an einen membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptor an und aktivieren Ras (*rat sarcoma*)-GTPasen oder G-Proteine der Rho-Familie (*ras homolog*) durch den Austausch von GDP gegen GTP. GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) erleichtern die Lösung von GDP und die Bindung von GTP an Ras, GAPs (*GTPase activating proteins*) induzieren die Hydrolyse des GTP.

Die Bindung eines Liganden an einen Tyrosinkinase-Rezeptor induziert eine Autophosphorylierung des Rezeptors. Von dem Adapterprotein Grb2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) werden entweder Tyrosinphosphat-Andockstellen am Rezeptor selbst oder an den Liganden erkannt. Grb2 bindet daraufhin den Ras Austauschfaktor SOS (*Sons of sevenless*) an den Rezeptor. SOS induziert den Austausch von GDP gegen GTP in Ras, das dadurch aktivierte Ras bindet an Raf und transloziert es an die Plasmamembran, wo es phosphoryliert und aktiviert wird. Aktiviertes Raf phosphoryliert die dualspezifischen Proteinkinasen MEK1 und MEK2, die die MAPKs ERK1 und ERK2 aktivieren. Essentiell für diese Aktivierung ist die dualspezifische Phosphorylierung von Thr-183 und Tyr-185 von ERK1/2. Dadurch bleibt die MAPK ERK1/2 so lange inaktiv, bis sie an beiden Stellen spezifisch durch MEK phosphoryliert wird. Die aktivierten ERKs translozieren in den Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so ihre Aktivität regulieren. Obwohl auch andere Kinasen wie MEKK1 (MEK Kinase 1), mos oder Tpl-2 die gleichen Serine phosphorylieren können, sind die dominierenden MEK Aktivatoren in den meisten Zelltypen Raf Kinasen (Cobb 1999; Kolch 2000).

### 3.3. Raf Isoformen

Es werden drei Raf Isoformen unterschieden: Raf1 (Synonym: cRaf), A-Raf und B-Raf. Raf1 ist weit verbreitet. A-Raf kommt hauptsächlich in urogenitalem Gewebe vor und B-Raf in neuronalen Geweben, Hoden und hämatopoetischen Zellen. Neuere Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass die Expression von A-Raf und B-Raf in niedrigen Konzentrationen wesentlich weiter verbreitet ist.

B-Raf ist der Hauptregulator des MEK/ERK-Signaltransduktionsweges, während Raf1 und A-Raf ERK-unabhängige Apoptoseprotektion in unterschiedlichen Geweben

gewährleisten B-Raf zeigt eine höhere Affinität für MEK1 und MEK2 als Raf1 und phosphoryliert MEKs effizienter (Peyssonnaud und Eychene 2001; O'Neill und Kolch 2004).

Alle drei Isoformen verfügen über eine Ras-bindende Domäne (RBD) sowie eine cysteinreiche Domäne (CRD) am N-Terminus und können dort mit Ras-GTPasen interagieren. Die Bindung an Ras aktiviert Raf1 nicht direkt, sondern scheint es aus dem Zytosol an die Membran zu translozieren, wo dann eine Aktivierung erfolgt. Für die Translokation ist die RBD alleine ausreichend, die CRD wird für eine effiziente Aktivierung benötigt. Über die Regulation von A-Raf ist nur wenig bekannt, es scheint aber in ähnlicher Weise wie Raf1, also ebenfalls indirekt, aktiviert zu werden.

B-Raf hingegen wird direkt durch eine Bindung an Ras aktiviert, da B-Raf essentielle Kinasesignale umgehen kann. B-Raf besitzt ein „phosphomimetisches“ Aspartat an der equivalenten Position zu Tyrosin-341 in Raf1 und unterstützt die Phosphorylierung des Serin-338 Gegenstückes. Zusätzlich verfügt B-Raf über eine wesentlich höhere spezifische Aktivität für MEK als Raf-1. Das könnte auch erklären, warum B-Raf einen Verlust von Raf1 oder A-Raf in Knockoutzellen vollständig kompensieren kann, was die Regulation von ERK anbelangt (Kolch 2000; O'Neill und Kolch 2004).

### **3.4. Rap1 und B-Raf**

Zusätzlich zu dem bereits beschriebenen Weg kann B-Raf von der kleinen GTPase Rap1 aktiviert werden. Rap1 ist die Abkürzung für *Ras-associated protein 1* und in der Tat weisen Ras und Rap1 in ihrer Zusammensetzung eine Homologie von über 50% auf.

Rap1 wird durch Rezeptortyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Zytokinrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle aktiviert. Die zuerst identifizierte Rap GEF war C3G (*Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor*, SH3 steht für *Srv homology region 3 domain*). Die Aktivierung von Rap1 durch cAMP erfolgt in vielen Zellen allerdings nicht durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelt, sondern durch den GEF Epac1 (*exchange protein directly activated by cAMP*). Rap1 findet sich hauptsächlich an intrazellulären Membranen in der perinukleären Region, an endo- und exozytotischen Vesikeln und an der Plasmamembran. In Neutrophilen und Zellen der Glandula Parotis ist Rap1 mit sekretorischen Granula assoziiert. Während der Sekretion wird Rap1 an die Plasmamembran transloziert. Rap1 könnte also entweder in die Signaltransduktion für die Formation der Sekretgranula oder in die Regulation der Exozytose involviert sein. Der

Rap1- GEF Epac2 (Synonym: cAMP- GEFII) ist in die cAMP- regulierte Exozytose und dort vor allem in die  $Ca^{2+}$ -abhängige Sekretion von Wachstumshormon involviert. (Bos et al. 2001).

Rap1 wurde ursprünglich als ein Suppressor von Ras beschrieben, da es in vielen Zelltypen als Ras-Antagonist durch Inhibierung der MAPKKK Raf1 wirkt. Dies geschieht durch eine starke Bindung von Rap1 an die Raf1 CRD, wodurch die Interaktion mit Ras verhindert wird. Ein bisher vermutetes, aber noch nicht ausreichend bewiesenes Modell postuliert, dass Rap1 über cAMP und die PKA Raf1 direkt phosphoryliert und inhibiert. Die Verbindung zwischen Rap1-Aktivierung, direkter Raf1-Inaktivierung und der folgenden Inhibition von Ras- vermittelter ERK- Aktivierung ist noch nicht fest etabliert. B-Raf hingegen wird durch Rap1 aktiviert. Die Rap1 Aktivierung erfolgt entweder PKA-abhängig durch cAMP oder durch Epac. Die PKA kann außerdem, abhängig vom 14-3-3-Level, B-Raf direkt phosphorylieren und inhibieren oder aktivieren. 14-3-3-Proteine sind phospho-Serin-spezifische Adapterproteine und weitere Regulatoren des Rap1/B-Raf/ERK-Moduls. Durch Interaktion mit den Kinasen und Kinasekomplexen können sie diese binden und ihre subzellulären Lokalisationen bestimmen.

Einerseits phosphoryliert und inhibiert die cAMP- abhängige Proteinkinase A (PKA) Raf1, andererseits aktiviert cAMP Rap1 und somit konsekutiv auch B-Raf entweder durch cAMP-abhängige Austauschfaktoren oder über eine cAMP-aktivierte PKA. Die Aktivierung von B-Raf kann also die PKA- vermittelte Raf1 Unterdrückung umgehen. Dadurch kann die Expression von B-Raf cAMP vom Inhibitor zum Aktivator des ERK-Signaltransduktionsweges verwandeln. (Kolch 2000; Bos et al. 2001; O'Neill und Kolch 2004).

### **3.5. Mutationen im Ras/B-Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsmodul**

Ca. 15% aller humanen Karzinome weisen aktivierende Ras-Mutationen auf (Davies et al. 2002) und es wurden mehr als 30 Mutationen des B-Raf Gens identifiziert, die mit humanem Krebs assoziiert sind. Die meisten Mutationen von B-Raf betreffen zwei Regionen: Die Glycin- reiche P-Schleife sowie das Aktivierungssegment. Ein Austausch von Glutamin gegen Valin an Position 599 im Aktivierungssegment zeigt sich in 90% der B-Raf Mutationen in humanem Krebs. Die V599E Mutante von B-Raf besitzt alle wichtigen Eigenschaften eines konventionellen Onkogens. So ist die Kinaseaktivität dieses

mutierten Proteins deutlich erhöht und es stimuliert ERK Ras-unabhängig in vivo (Wan et al. 2004).

B-Raf- Mutationen treten in 66% aller Malignen Melanome (Brose et al. 2002) und mittel bis sehr häufig in kolorektalen Karzinomen (Rajagopalan et al. 2002), Ovarialkarzinomen (Singer et al. 2003) und papillären Schilddrüsenkarzinomen (Brose et al. 2002; Cohen et al. 2003) auf. In cholangiozellulären Karzinomen (CCC) wurde eine fehlerhafte Aktivierung des MAKP-Moduls in ca. 62% der Fälle entdeckt, die entweder durch Ras oder B-Raf-Mutation zu Stande kommt. Aktivierende B-Raf- Mutationen zeigten sich in ca. 22% der CCC (Tannapfel et al. 2003). In einer Studie über B-Raf-V599E-Mutationen in GEP-NETs zeigte sich, dass sie nur in 3% der untersuchten Fälle auftreten und somit bei der Tumorgenese von GEP-NETs eine untergeordnete Rolle spielen (Tannapfel et al. 2005). In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) scheinen B-Raf-Mutationen zwar eine Rolle zu spielen, weisen jedoch nicht die typische V599E-Substitution auf (Brose et al. 2002). Es zeigte sich, dass B-Raf und Ras-Mutationen in den gleichen Tumortypen auftreten. Dies lässt die Vermutung zu, dass die beiden Gene denselben onkogenen Signaltransduktionsweg nutzen und Ras B-Raf in diesen Tumoren aktiviert (Wan et al. 2004).

Untersuchungen der Kinasedomänen von <sup>WT</sup>B-Raf und onkogenem <sup>V599E</sup>B-Raf im Komplex mit dem Raf-Inhibitor BAY 43-9006 zeigten, dass das Aktivierungssegment durch Verbindung mit der P-Schleife in einer inaktiven Konformation gehalten wird. Da die meisten Mutationen in diesen beiden Regionen auftreten, könnte eine Unterbrechung dieser Verbindung B-Raf aktivieren. Weitere Untersuchungen ergaben, dass jene Mutanten mit hoher Aktivität MEK direkt phosphorylieren, diejenigen mit eingeschränkter Aktivität MEK jedoch indirekt durch Aktivierung von Raf-1 stimulieren (Wan et al. 2004).

#### **4. Der Rafkinase-Inhibitor Sorafenib (BAY 43-9006)**

Sorafenib (BAY 43-9006) ist ein oral verabreichbarer bi-Aryl-Harnstoff, der die Raf-Kinasen inhibiert. Der chemische Name lautet *4-{4-[3-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-ureido]-phenoxy}-pyridine-2-carboxylic acid methylamide-4- methylbenzenesulfonate*. In Versuchen mit Kolon-, Pankreas-, Lungen- und Ovarialtumoren zeigte sich eine signifikante Aktivität, das Tumorwachstum wurde bei einer Verabreichung von Sorafenib über 14 Tage deutlich unterdrückt und die Suppression hielt unter Gabe an (Lyons et al. 2001).

Sorafenib ist ein potenter Inhibitor von Raf-1, zusätzliche Untersuchungen wiesen außerdem eine Aktivitätsunterdrückung sowohl von <sup>WT</sup>B-Raf als auch von <sup>V599E</sup>B-Raf *in vitro* nach. Sorafenib zeigte außerdem signifikante Aktivität gegen einige Tyrosinkinasen, die bei der Neovaskularisation und Tumorprogression eine Rolle spielen. Dazu gehören die VEGFR-2 und -3 (*vascular growth factor receptors*), der PDGFR- $\beta$  (*platelet-derived growth factor receptor  $\beta$* ), FLT-3 und c-Kit. Mittels zellulärer Modelle wurde nachgewiesen, dass Sorafenib in Kolonkarzinom-, Pankreaskarzinom- und Mammakarzinomzelllinien, die k-Ras-, Wildtyp B-Raf- oder B-Raf-Mutanten enthalten, den MAP-Kinasen-Signaltransduktionskomplex inhibiert. Nicht-kleinzellige Lungenkrebszelllinien mit k-Ras-Expression hingegen zeigten keine Sensitivität des MAPK-Moduls für Sorafenib (Wilhelm et al. 2004).

Wan et al zeigten, dass Sorafenib mit einer inaktiven Konformation von B-Raf interagiert. <sup>V599E</sup>B-Raf reagiert darüber hinaus weniger sensitiv auf BAY43-9006 als <sup>WT</sup>B-Raf (Wan et al. 2004).

## 5. Ziel der Arbeit

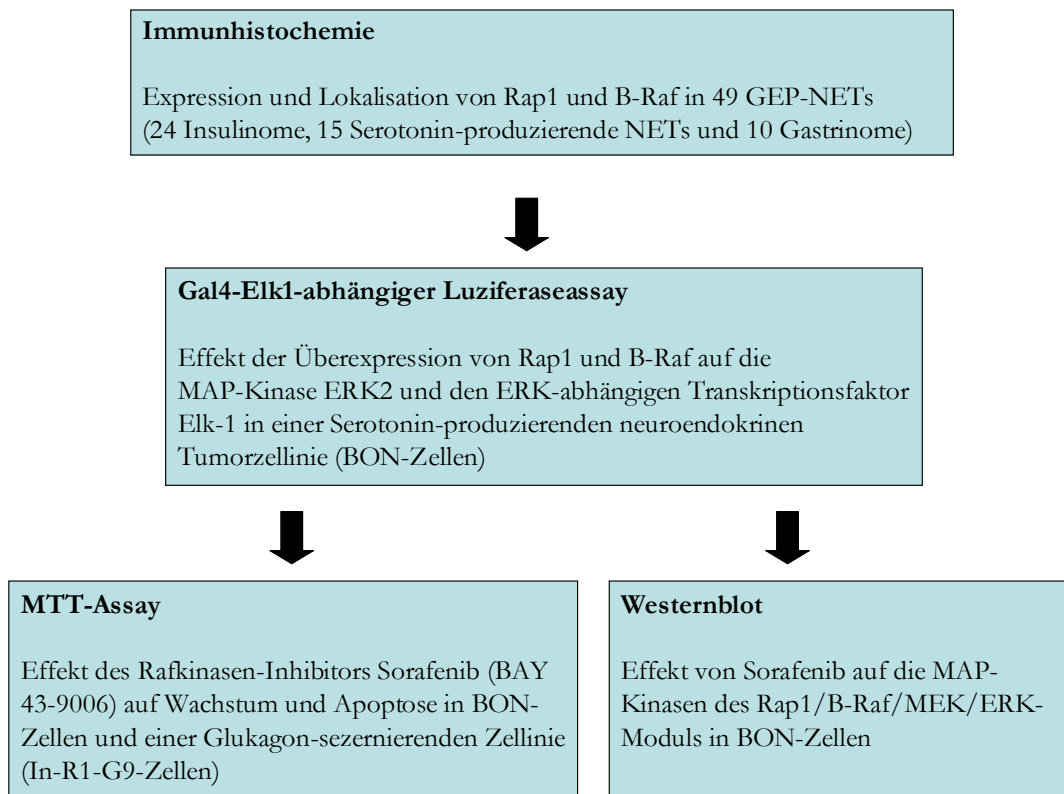
GEP-NETs sind eine heterogene Gruppe von meist langsam wachsenden Tumoren mit einer bisher weitgehend unbekanntem molekularen Pathogenese. Die Serin-Threonin Kinase B-Raf wurde als Onkogen in endokrinen Karzinomen identifiziert. Das kleine G-Protein Rap1 vermittelt Signaltransduktion in endokrinen Zellen über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen durch Aktivierung von B-Raf. Um die Rolle von Rap1 und B-Raf in der molekularen Pathogenese von GEP-NETs zu ermitteln, untersuchten wir zuerst immunhistochemisch die Expression von Rap1 und B-Raf in 49 GEP-NETs. Anhand der Schnitte erfolgte eine vergleichende Beurteilung der Intensität und Lokalisation. Da sich eine deutliche Überexpression von Rap1 und B-Raf in der Mehrzahl der GEP-NETs zeigte, untersuchten wir als nächstes mittels eines Luziferaseassays die Wirkung der Überexpression von Rap1 und B-Raf auf die MAP-Kinase ERK2 und den ERK-abhängigen Transkriptionsfaktor Elk-1 in einer neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Zelllinie.

Die Mehrzahl der GEP-NETs ist wenig chemosensitiv, was eine Klärung der Pathogenese mit Identifizierung von möglichen Angriffspunkten für eine konservative Behandlung umso wichtiger werden lässt (Delle Fave und Corleto 2001; Lubomierski et al. 2001; Oberg 2003). Deshalb untersuchten wir die Wirkung des vor kurzem entwickelten

Rafkinasen-Inhibitors Sorafenib (BAY 43-9006) auf Wachstum, Apoptose und MAPK-Aktivierung in neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Zelllinien. Hierbei interessierte uns, ab welcher Konzentration Sorafenib das Wachstum der Zellen hemmt und Apoptose induziert und wie genau die Signaltransduktion im B-Raf/MEK/ERK-Modul durch Sorafenib beeinflusst wird.

## B Material und Methoden

### 1. Versuchsplan



### 2. Materialien

Soweit nicht anders bezeichnet, wurden die Laborchemikalien von den Firmen Cell Signaling (Danvers, MA, USA), DADE Behring (Deerfield, IL, USA), Division Chroma (Münster), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel- de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Serva (Heidelberg), Sigma (St. Louis, MO, USA) und Upstate biotechnology (Charlottesville, VA, USA) im Reinheitsgrad „pro analysi“ bezogen.

Die Materialien für den Westernblot wurden von Bio-Rad (Hercules, CA, USA) bezogen, die Materialien für die Zellkultur von Gibco (Karlsruhe). Diese waren entweder sterile



Einmal-Artikel oder wurden durch Hitze im Labor sterilisiert. Wildtyp Rap1- und B-Raf-Expressionsplasmide wurden großzügigerweise von A. Wittinghofer und U. Rapp zur Verfügung gestellt.

Mit Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission wurden 49 GEP-NETs untersucht, darunter 24 Insulinome, 15 Serotonin- produzierende NETs und 10 Gastrinome. Die Diagnosen wurden aufgrund der klassischen klinischen Symptome, der histologischen Untersuchung und der immunhistochemischen Analysen (Anfärbung nach Grimelius, Immunhistochemie mit Chromogranin A, neuronenspezifischer Enolase, Synaptophysin, Serotonin, Gastrin, Somatostatin, Vasoaktives Intestinales Peptid, Glukagon, Insulin und pankreatisches Polypeptid) gestellt. Die Tumorproben stammen aus chirurgischen Tumor(teil-)resektionen zwischen 1983 und 2002 in der Abteilung für Allgemeinchirurgie der Philipps-Universität in Marburg. Nach der Resektion wurden die Tumore/Tumorproben routinemäßig in 4%-Formalin oder Bouin's Lösung (eine Mischung aus Formalin und Pikrinsäure) fixiert, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Für die immunhistochemische Anfärbung der Präparate wurden die Vectastain ABC-Kits für rabbit (Kaninchen) und goat (Ziege) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) benutzt.

Die Zelllinien BON (eine humane Karzinoidtumor- Zelllinie) (Parekh et al. 1994) und In-R1-G9 (eine Glukagon-sezernierende Zelllinie, die durch Klonierung von Insulinom-Zellen gewonnen wurde) (Takaki et al. 1986) wurden untersucht.

## 2.1. Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper für die Westernblots. Entsprechend der Primärantikörper wurden als Sekundärantikörper anti-rabbit und anti-mouse verwendet.

Primärantikörper	Verdünnung	Entität	Hersteller
pMEK 1/2	1:1000	Rabbit	Cell Signaling
MEK 1	1:1000	Rabbit	
pERK 1/2	1:500	Mouse	
ERK 2	1:1000	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
pPKB	1:1000	Rabbit	New England Biolabs
PKB	1:1000	Rabbit	(Beverly, MA, USA)

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper bei der immunhistochemischen Anfärbung der GEP-NETS.

Primärantikörper	Verdünnung	Antikörperklonalität und - entität	Hersteller
Serotonin	1:10.000	Polyclonal rabbit	INCSTAR (Saluggia, Italien)
AIS (Insulin)	1:500	Polyclonal rabbit	DAKO (Dänemark)
AGS (Gastrin)	1:1000	Polyclonal rabbit	
Glukagon	1:2000	Polyclonal rabbit	
Somatostatin	1:4000	Polyclonal rabbit	
Pankreat. Polypeptid	1:2000	Polyclonal rabbit	
B-raf	1:400	Polyclonal goat	Upstate Biotechnology
Rap 1 sc-65	1:200	Polyclonal rabbit	Santa Cruz Biotechnology
C3G (C19)	1:200	Polyclonal rabbit	
IRS-2 (A19)	1:200	Polyclonal rabbit	
cAMP-GEF 2 (M18)	1:200	Polyclonal goat	

## 2.2. Puffer und Lösungen

### Zitratpuffer pH 6

2,1 g Zitronensäuremonohydrat + 1l Aqua bidest., mit Natronlauge auf pH 6 titrieren

### PBS (*eng. phosphate buffered saline*, Phosphatpuffer) pH 7,4

136,8 mM NaCl, 2,5 mM Kaliumchlorid, 0,8 mM dibasisches Natriumphosphat, 1,47 mM monobasisches Kaliumphosphat, 0,9 mM Kalziumchlorid, 0,5 mM Magnesiumchloridhexahydrat ad 1l Aqua dest.

### TBS (*eng. TRIS buffered saline*, TRIS [Tris (hydroxymethyl)-amino-Methan] Puffer) pH 7,6

18,165g TRIS + 26,20g Natriumchlorid + 12,5 ml Salzsäure ad 3l Aqua bidest, mit Salzsäure auf pH 7,6 titrieren

### Laemmli-Puffer 5x

625 mM TRIS pH6,8, 10%SDS, 25% Glycerol, 0,015% Bromphenolblau und 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol in 100ml Aqua dest.

### TBS-T-Puffer 10x

50mM TRIS-HCl pH 7,4 , 150 mM NaCl , 0,1% Tween 20 in Aqua dest.

### SDS-Laufpuffer pH 8,3

250 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

**Transferpuffer**

10% Towbinpuffer + 20% Methanol in Aqua dest.

**Trenngelpuffer pH 8,8**

1,5M TRIS, 0,4% SDS ad 100 ml Aqua dest.

**Sammelgelpuffer 6,8**

0,5M TRIS, 0,4% SDS ad 100ml Aqua dest.

**Lysepuffer**

1% Triton X-100, 10% Glycerol, 50 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure) pH 7,4, 100 mM Natriumpyrophosphat, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 5 mM Natriumvanadat, 10 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1,5 mg/ml Benzamidine, 34 µb/ml PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

**BSA (bovines Serumalbumin) -Lösung**

20 ml PBS + 100 mg BSA Fraktion V

**DAB (eng. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate)-Lösung**

200 mg DAB + 200 ml TBS + 100µl 30% Wasserstoffperoxid

**5x Laemmli pH 6,8**

625 mM TRIS, 10% SDS (eng. *sodium dodecylsulfate*, Natriumdodecylsulfat), 25% Glycerol, 0,015% Bromphenolblau, 5% 2-Mercaptoethanol in 100ml Aqua dest.

**Milchlösung**

5g Milchpulver in 100ml TBS-T-Puffer

**Trenngel 8%**

4 ml Trenngelpuffer, 3,6 ml Glycerol, 4,3 ml Polyacrylamid, 50 µl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat), 25 µl TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin), 7,7 ml Aqua dest.

**Sammelgel**

2,5ml Sammelgelpuffer, 1,6ml Polyacrylamid, 60 µl 10% APS, 30 µl TEMED, 5,9 ml Aqua dest.

### 3. Methoden

#### 3.1. Immunhistochemie

##### 3.1.1. Die nach Hsu et al. modifizierte ABC-Methode

Es gibt mehrere Immunperoxidase-Färbemethoden, von denen allerdings die Avidin-Biotin-Methoden im Vergleich die höchste Sensitivität und Spezifität aufweisen (Hsu et al. 1981). Weitere Vorteile sind eine hohe Verdünnung der primären und sekundären Antikörper, wodurch zusätzlich eine unspezifische Hintergrundanfärbung vermindert wird. Die hier verwendete ABC (*eng. avidin-biotin-complex*) Methode nach Hsu et al. beinhaltet drei Schritte: einen Primärantikörper, einen biotinylierten Sekundärantikörper und einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Hsu und Raine 1981)(siehe Abb. 3).

Die Primärantikörper sind entweder polyklonal aus dem Kaninchen oder der Ziege oder monoklonal aus der Maus. Zur Antikörpergewinnung wird ein Antigen dem entsprechenden Tier injiziert und die vom Tier gegen das Antigen produzierten Antikörper entnommen.

Die Sekundärantikörper richten sich gegen das F<sub>c</sub>-Fragment von Immunglobulinen der Tierspezies, in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde.

Bei der ABC-Methode bindet als erstes der Primärantikörper mit seinem F<sub>ab</sub>-Anteil spezifisch an das darzustellende Gewebsantigen. Im zweiten Schritt bindet nun ein Sekundärantikörper an das F<sub>c</sub>-Fragment des Erstantikörpers. Der Sekundärantikörper ist mit Biotin (=Vitamin H) konjugiert und an dieses bindet im dritten Schritt ein peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Avidin ist ein im Hühnereiweiß enthaltenes Glykoprotein) mit einer sehr hohen Affinität ( $10^{15}M^{-1}$ ) für Biotin. Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin, wobei die drei freien Stellen die Bindung von Biotin-Peroxidase-Komplexen ermöglichen. Die Peroxidase (hier: Meerrettich-Peroxidase) wird anschließend mit einem Substrat, in diesem Fall dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB), sichtbar gemacht. Auf diese Art und Weise werden die darzustellenden Gewebsantigene braun angefärbt.

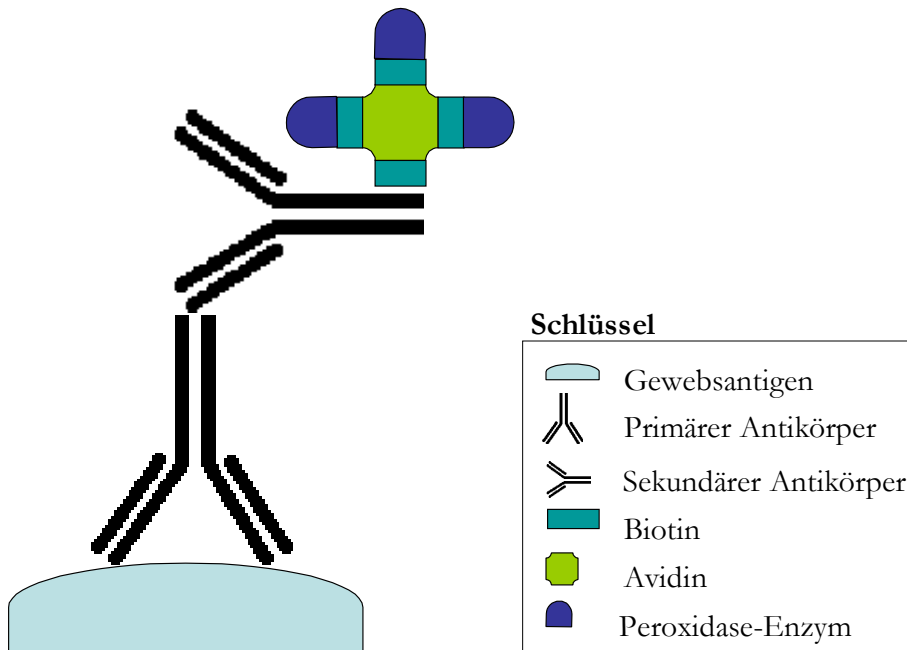


Abbildung 3: Die immunhistochemische ABC-Methode. Erläuterungen siehe Text.

### 3.1.2. Spiegelschnitte

3µm dicke Präparate von normalem humanem Pankreas wurden abwechselnd mit der Vorderseite und mit der Rückseite auf die Objektträger aufgetragen. Dadurch erhielt man zwei Schnitte, in denen im Optimalfall die gleichen Zellen spiegelbildlich enthalten sind. Durch die Anfärbung des einen Schnittes mit Rap1 und des zweiten Schnittes mit Insulin ließen sich die Präparate anschließend hinsichtlich gleicher oder unterschiedlich angefarbter Zellen vergleichen. Es wurden Spiegelschnitte mit Rap1 für das erste Präparat und Insulin, Glukagon, Serotonin, Somatostatin, pankreatisches Polypeptid, IRS-2 und C3G für das zweite Präparat angefarbt

### 3.1.3. Die immunhistochemische Anfärbung der GEP-NETs

Nach dem Schneiden in 3µm-dicke Schnitte wurden die Präparate in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe bis 96%-Ethanol in jeweils fünfminütigen Schritten rehydriert.

Vor allem Hämoproteine (Hämoglobin in Erythrozyten; Myoglobin in Myozyten, Zytochrome in Granulozyten und Monozyten und Katalasen in Leber und Niere) besitzen eine sogenannte „endogene“ Peroxidaseaktivität, die durch die Substrat-Chromogenreaktion zu einer unspezifischen Anfärbung führen würde. Um diese endogene Peroxidase irreversibel zu hemmen, werden die Präparate 30 Minuten lang mittels 6,6 ml 30%-Wasserstoffperoxid in 200 ml Methanol für 30 Minuten vorbehandelt. Bei der Fixation mit formalinhaltigen Lösungen entstehen übermäßige Aldehydvernetzungen, die die Gewebsantigene maskieren und deren Nachweis verhindern. Zur Antigendemaskierung bzw. zur Lösung der Aldehydvernetzungen werden die Präparate nach mehrmaligem Spülen in Aqua bidest. im Zitratpuffer 20 Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht.

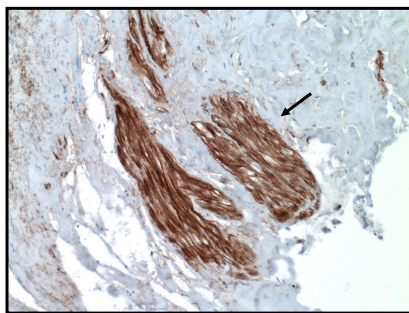
Durch hydrophobe Interaktionen zwischen dem Primärantikörper und den Bindegewebsanteilen der Präparate wie Kollagene und Proteoglykane kann es zur unspezifischen Anlagerung und somit Anfärbung kommen. Um diese Reaktion zu vermeiden, wird vor dem Primärantikörper eine blockierende Proteinlösung, die von derselben Tierspezies wie der Sekundärantikörper stammt, aufgetragen. Dieses Normalserum ist bereits im Vectastain-ABC-Kit enthalten. Nach mehrmaligem Spülen in PBS wurden die Präparate zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundanfärbung mit Normalserum 2% in PBS für 20 Minuten inkubiert.

Direkt danach wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung mit BSA-Lösung aufgetragen und über Nacht bei +4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen in PBS wurden die Präparate mit biotinyliertem Zweitantikörper (Vectastain ABC-Kit) 0,5% in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurden die Präparate mit AB-Komplex (Vectastain ABC-Kit) 1% in PBS 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen in PBS und anschließend in TBS wurden die Präparate 10 Minuten in Dunkelheit mit DAB-Lösung inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen in Aqua bidest. wurden die Präparate 15 Sekunden mit Hämalau sauer nach Mayer gegen gefärbt und anschließend im Leitungswasserbad gebläut.

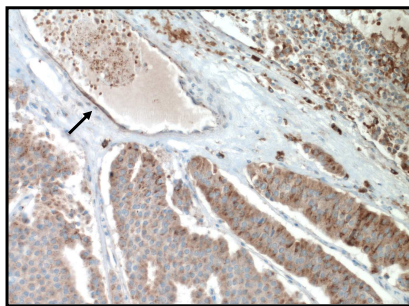
Nach dem Dehydrieren in der aufsteigenden Alkoholreihe von 70-99% Ethanol wurden die Präparate mit Depex eingedeckt und nach dem Trocknen unter einem Olympus BH-2 Mikroskop begutachtet. Da sowohl Endothelzellen als auch Myozyten auf allen angefärbten Schnitten vorhanden waren, wurde für den internen standardisierten Vergleich der Präparate untereinander die Anfärbung von Endothelzellen durch Rap1 in einer Skala von 1 bis 3 (schwache/mäßige/starke Expression) als mäßig gewertet. Die Anfärbung von Myozyten durch B-Raf wurde als stark gewertet (siehe Abbildung 4).

Entsprechend des festgelegten Standards wurde dann die Expression von Rap1 oder B-Raf im neuroendokrinen Tumor mit Endothelzellen oder Myozyten verglichen und bewertet.

Die Präparate wurden mit einem Olympus AX 70 Mikroskop und einer RT Slider Kamera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA) fotografiert. Als Software zum Fotografieren diente die SPOT RT Software v 3.4 (Diagnostic Instruments Inc.) und zum Bearbeiten Power Point (Windows).



**B-Raf in Myozyten**



**Rap1 in Endothel**

Abbildung 4: Festgelegte interne Standards für die semiquantitative Auswertung der mit Rap1- und B-Raf-Antikörpern immunhistochemisch angefärbten GEP-NETs. Weitere Erläuterungen siehe Text.

### **3.2. Zellkultur**

Die BON Zellen wurden in DMEM/HAM's F-12(1x) Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 0,8% Gentamicin bei gesättigtem Wasserdampf, 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Die In-R1-G9 Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum und 0,5% Gentamicin bei gesättigtem Wasserdampf, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Wenn nicht anders beschrieben wurden alle Zelllinien unter diesen Bedingungen kultiviert und inkubiert.

### 3.3. Gal4-Elk1-abhängiger Luziferaseassay

Um Eigenschaft und Regulation eines klonierten Gens zu untersuchen, kann dieses Gen in verschiedene Zelltypen eingebracht (transfiziert) werden. Durch Überexpression kann sein Einfluss auf regulatorische Elemente bestimmt werden. Bei der Liposomen-vermittelten Transfektion entstehen DNA-enhaltende Liposomen, die mit der Zellmembran verschmelzen. Idealerweise sollten die Zellen am Tag der Zellyse nahezu konfluent sein, da die Fähigkeit der Zelle, DNA aufzunehmen, mit der dem Medium exponierten Oberfläche korreliert. Um die Promoteraktivität eines Gens zu bestimmen, werden häufig transiente Versuchssysteme mit chimären Genen (Reporter gene) benutzt. Das chimäre Gen besteht gewöhnlich aus den regulatorischen Sequenzen (Promoter), deren Aktivität man untersuchen möchte, und einem Reporter gen, zum Beispiel Luziferase. Die relative Menge des Reporterproteins, das unter den verschiedenen Bedingungen gebildet wird, reflektiert dabei die Promotoraktivität. Auf diese Weise ermöglichen Reporter gene eine indirekte Analyse der Promoteraktivität. Die Luziferase des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* wandelt das Substrat Luziferin in Gegenwart von molekularem O<sub>2</sub>, ATP und Mg<sup>2+</sup> in Oxyluziferin und CO<sub>2</sub> um. Bei dieser Reaktion wird Licht in einer Wellenlänge von 562nm emittiert, das in einem Luminometer gemessen werden kann. Die Menge der Lichtquanten ist dabei der Enzymaktivität und damit der Enzymmenge direkt proportional.

Um den Effekt einer Überexpression von Wildtyp Rap1 und B-Raf auf den MAPK-Signaltransduktionskomplex in GEP-NETs zu untersuchen, wurden die BON-Zellen in 6-Loch-Platten in normalem Medium für ca. 48 Stunden kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 60-80% erreichten. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit dem (Gal4)<sub>5</sub>-EB1-TATA-Luziferase-Reporter gen (pFR-Luc) und Elk-1 (pFA-2-Elk1, kodiert die Gal4-Elk-1 Transaktivierungsdomäne) Transaktivator domänen (alle Stratagene, La Jolla, CA, USA) durch Liposomen-vermittelte Transfektion (Invitrogen, Groningen, Niederlande) für 8 Stunden in Medium ohne Serum transfiziert. Zusätzlich wurden ein Kontrollplasmid, Wildtyp Rap1, Wildtyp B-Raf, Wildtyp Rap-1 + Wildtyp B-Raf, konstitutiv aktiviertes Rap1 G12V und B-Raf BxB (die aktivierte B-Raf COOH-Kinasedomäne) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in normalem Medium mit 5% FCS kultiviert. Die Zellen wurden mittels je 100 µl Luziferaseassay-Puffer (Stratagene) lysiert, sonifiziert, zentrifugiert und 20µl des Überstandes wurden für den Assay eingesetzt. Die Messung erfolgte in einem Luminometer (Lumat LB 9501; Berthold) mit einer automatischen Substratinjektion von 100µl Luziferin. Die emittierten Lichtquanten



wurden von dem Gerät registriert und als RLU (relative light units) wiedergegeben. Die Meßzeit betrug 10s. Die ermittelte Luziferaseaktivität (RLU/well) war ein Maß für die Aktivierung der Signalwege nach extrazellulärer Stimulation.

Die  $\beta$ -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse des Substrats o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG). Das Produkt o-Nitrophenol dieser Reaktion kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm nachgewiesen werden.

Die Luziferaseaktivität wurde genormt durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidas-Aktivität (Invitrogen) nach Kotransfektion eines Expressionsvektors mit dem  $\beta$ -Galaktosidasegen (pcDNA 3.1lacZ, Invitrogen) unter Kontrolle mit dem Zytomegalieviruspromoter. Schließlich wurden die Luziferase-Werte durch die  $\beta$ -Galaktosidase-Werte dividiert, um die relative Luziferaseaktivität zu erhalten.

### 3.4. MTT-Assay

Der MTT-(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) Assay wurde erstmals von Mosmann 1983 beschrieben. Er basiert auf der Fähigkeit einer mitochondrialen Dehydrogenase, die Tetrazolium-Ringe des gelben MTT zu spalten. Dadurch entsteht das kristalline, dunkelblau bis violette Formazan, welches kaum durch Zellmembranen penetriert und sich so in lebenden Zellen anreichert. Die Anzahl an lebenden Zellen in einer Kultur ist direkt proportional zur Menge des produzierten Formazans. Werden die Zellen und somit die Formazankristalle gelöst, kann die Farbe quantitativ photometrisch bestimmt werden. So lässt sich der prozentuale Anteil von lebenden Zellen in einer Zellkultur bestimmen (Mosmann 1983).

Um den Effekt von verschiedenen Konzentrationen von BAY 43-9006 auf Wachstum und Apoptose von GEP-NETs zu untersuchen, wurden BON und In-R1-G9 Zellen in 6-Loch Platten in Medium ohne FCS und Gentamicin kultiviert bis zur 60-80% Konfluenz der Zellen. Dann wurden die Zellen für 24 Stunden mit BAY 43-9006 in den absteigenden Konzentrationen 10 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 100nM, 50nM, 10nM, 5nM und 1nM in DMSO (Dimethylsulfoxid) inkubiert. Es wurden jeweils 4 Kontrollen und alle Versuche als Doppelbestimmung durchgeführt (Versuchsaufbau siehe Abbildung 5).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 100 $\mu$ l MTT-Lösung (5mg MTT/ml PBS) zu jedem Loch dazugegeben und nach weiteren 2 Stunden Inkubation wurde der Überstand abgesaugt.

Dann wurden 500µl DMSO in jedes Loch gegeben und nach 15-20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur jeweils 100µl in eine 96-Lochplatte pipettiert und in einem Mikrotiterplattenphotometer von Dynatec Laboratories bei 570 nm photometrisch bestimmt.

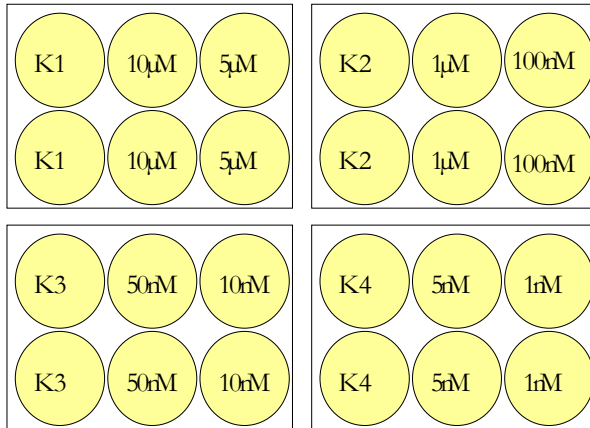


Abbildung 5: Versuchsaufbau MTT-Assay. 6-Lochplatten mit BON- oder In-R1-G9-Zellen. K1-4: Kontrollen mit DMSO. !0µM-1nM: Konzentrationsangaben für BAY 43-9006 gelöst in DMSO.

### 3.5. Western-Blot

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine aus Gesamt-Zell-Protein oder Gewebelysaten nachgewiesen werden. Nach der größenabhängigen Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld werden sie auf eine Membran elektrotransferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase etc.) gekoppelt ist, detektiert.

#### 3.5.1. Aufarbeiten der Proteinproben und Quantifizierung

Die 6-Lochplatten wurden pro Loch mit 100 µl eiskaltem Lysepuffer versetzt und die Zellen wurden ausgekratzt. Das Lysat wurde in 2ml-Eppendorfgefäße überführt, für 15 sec. sonifiziert und das unlösbare Material wurde durch Zentrifugieren mit 15.000 U/Min.

für 5 Minuten in einer Mikrofuge entfernt. Mittels eines Protein-Assays von Bio-Rad wurde die Proteinbestimmung durchgeführt.

### 3.5.2. Diskontinuierliche SDS- Gelelektrophorese

Zur größenabhängigen Auftrennung der Proteine wurde eine SDS-PAGE (*eng. sodium dodecylsulfate- polyacrylamide gel electrophoresis*) verwendet. Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Als Elektrolyt für die Proteine wurde ein SDS-haltiges Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt, da hiermit eine sehr gute Trennung der einzelnen Proteine voneinander erzielt werden kann. SDS ist ein anionisches Detergens, welches die Eigenladungen von Proteinen überdeckt. Pro Gramm Protein binden ungefähr 1,4 g SDS, so dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen und die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig ist. Dieses System wurde ursprünglich von U. K. Laemmli entwickelt (Laemmli 1970).

Zusammen mit 5x Laemmli-Puffer 20% in 100µl Aqua dest. mit 1 µg/µl Protein wurden die Proben 5 Min. gekocht. Der Laemmli-Puffer enthält SDS im Überschuss, dieses bricht Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle auf. Außerdem wurden dem 5x Laemmli die reduzierende Thiolverbindung 2-Mercaptoethanol zur Spaltung von Disulfidbrücken sowie Bromphenolblau als Farbstoffkontrolle für den Standort der Proteine im Gel zugesetzt. Am Ende dieser Präparation weisen die mit SDS beladenden Proteine eine ellipsoide Form auf, durch den starken Denaturierungseffekt können allerdings keine Proteine mit Quartärstruktur bestimmt werden. Zwischen zwei Glasplatten mit Spacern wurde als erstes Stoppgel, dann Trenngel und anschließend Sammelgel gegossen sowie Kämme für die späteren Probenaschen eingefügt. Die Gele wurden in Laufkammern mit Laufpuffer eingespannt und die Kammern mit einem Größenmarker und jeweils 50 µg Protein beladen. Die angelegte Spannung von 120V und 160V bewirkt eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel. Hierbei bestimmt die Größe der Proteine ihre Laufgeschwindigkeit, kleine Proteine wandern schneller durch das Gel als größere.

### 3.5.3. Elektrotransfer

Anschließend wurden die Proteine in einer Transferkammer mit Transferpuffer vom Polyacrylamid-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld über 12h bei 20V eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. An der Membranoberfläche bleiben die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur.

### 3.5.4. Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran müssen zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich sonst die Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würden. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgte mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein aus Milchpulver. Hierzu wurden die Membranen zuerst 1h bei RT in Milchlösung geschüttelt und anschließend mit den Primärantikörpern in entsprechender Konzentration in Milchlösung über 4h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen anschließend mit den HRP (*eng. horse radish peroxidase*)-konjugierten Sekundärantikörpern 1h bei RT inkubiert und wieder mehrmals mit TBS-T gewaschen. Mit Hilfe eines Enhanced Chemoluminescence Analysis Kit (ECL-Kit Amersham Bioscience, Freiburg) und eines Röntgenfilms (Kodak) wurden die immunoreaktiven Proteine nun in der Dunkelkammer sichtbar gemacht. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol (bzw. je nach Hersteller Derivate dessen) in seine oxidierte Form, bei der mit Hilfe von chemischen Verstärkern eine Lumineszenz detektiert werden kann. Hierbei ist die Intensität des emittierten Lichtes proportional zur Proteinmenge. Durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die mit ECL-Kit behandelte Nitrocellulosemembran kommt es zur Schwärzung des Röntgenfilms. Die Filme wurden eingescannt und mit der Gelscan 3D Software (BioSciTec, Marburg) wurde die Schwärzungsintensität der Banden untereinander quantifiziert.

## C Ergebnisse

### 1. Immunhistochemie

Als Positivkontrollen zum Nachweis einer korrekten Durchführung und Anfärbung wurden Präparate von normalem humanem Pankreas mitgeführt, von denen eine positive Reaktion mit den entsprechenden Antikörpern bekannt war. Die Positivkontrollen zeigten stets die typische Anfärbung. Als Negativkontrollen zum Ausschluss unspezifischer Anfärbungen wurden stets Präparate ohne Anwendung des Primärantikörpers mitgeführt, alle anderen Schritte wurden analog durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine charakteristische Reaktion und unspezifische Anfärbung durch die übrigen Reagenzien wurde ausgeschlossen.

Zuerst untersuchten wir die Expression von Rap1 und B-Raf in normalem humanem Pankreas. Hierzu wurden 3µm-dicke Schnitte immunhistochemisch angefärbt und mikroskopisch analysiert. Es zeigte sich, dass Rap1 in exo- und in endokrinen Zellen des Pankreas exprimiert wird (Abb. 6 A, C, E). Auch bei der Analyse der Spiegelschnitte wurde festgestellt, dass sich im exokrinen Pankreas eine homogene mäßige Anfärbung zeigte wohingegen einzelne Zellen in Pankreasinseln stark angefärbt wurden. Im Bereich der Pankreasinseln ist Rap1 stark in einigen Betazellen (Abb. 6A, B; Pfeile) und nicht-Betazellen exprimiert (Abb.6A, B, Pfeilköpfe). Um nun weitere Hinweise auf die Entität dieser vereinzelt stark angefärbten Inselzellen zu erhalten, wurden Spiegelschnitte von normalem humanem Pankreas angefertigt und immunhistochemisch angefärbt. Bei diesem Vergleich der Inseln von Rap1 einerseits und Insulin, Glukagon, Serotonin, Somatostatin, pankreatisches Polypeptid, IRS-2 und C3G andererseits zeigte sich, dass eine starke Rap1-Expression deutlich mit der Somatostatinexpression von Deltazellen korrespondiert (Abb. 6C + D, Pfeile). Dies legt nahe, dass Rap1 vor allem in Deltazellen des endokrinen Pankreas exprimiert wird. Zwar zeigen auch die Spiegelschnitte von Rap1 und Insulin vereinzelte korrespondierende Inselzellen, dies ist jedoch weniger spezifisch als der Vergleich mit Somatostatin (Abb. 6A + B). Immunhistochemische Anfärbungen von intestinalem Gewebe mit Rap1 zeigten außerdem, dass Rap1 mäßig in Endothelzellen von Gefäßen (Abb. 6H, Pfeile) und stark in den apikalen Membranen von Enterozyten im gesamten Darmtrakt exprimiert wird (Abb. 6G, Pfeile). Im Vergleich zu dieser weit verbreiteten Expression von Rap1 in verschiedenen Geweben zeigte B-Raf eine

wesentlich spezifischere Verteilung. Man erkennt eine homogene Anfärbung von normalen humanen Pankreasinseln mit vereinzelt stärker angefärbten endokrinen Zellen (6F), wohingegen das exokrine Pankreas nur sehr schwach angefärbt wurde. In glatten Muskelzellen (Abb.6I) und in enteroendokrinen Zellen des Darms war B-Raf stark exprimiert (Abb. 6J, Pfeile).

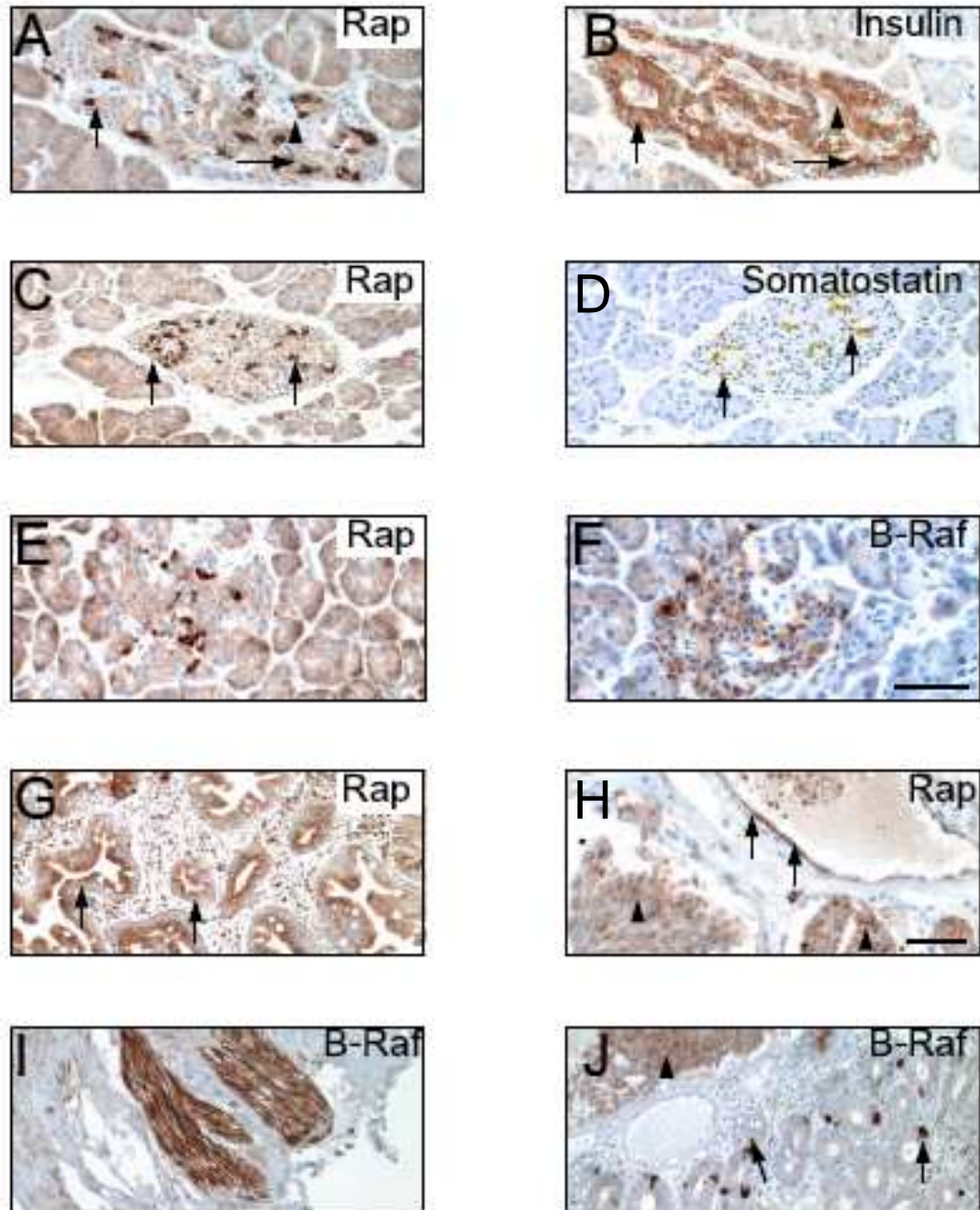


Abbildung 6: Normale Mikroanatomie der Rap1- und B-Raf Expression in Pankreasinseln (A-F), Kolonmukosa (G), Gefäßwänden (H, I) und duodенaler Mukosa (J). Die Paraffinschnitte wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Rap1 (A, C, E, G, H), Insulin (B), Somatostatin (D) und B-Raf (F, I) angefärbt. Die Bilder A/B und C/D sind Spiegelschnitte von humanem Pankreas. Die Maßstäbe entsprechen 50 µm.

Als nächstes untersuchten wird die Expression des kürzlich identifizierten Onkogens B-Raf und seiner upstream-GTPase Rap1 in neuroendokrinen Tumoren des Magen-Darm-Traktes. Hierzu färbten wir 24 Insulinome (Abb. 7), 15 Serotonin-produzierende NETs und 10 Gastrinome immunhistochemisch an (Abb. 8). Durch den Vergleich der Intensität der Rap1-Anfärbung mit Endothelzellen und der B-Raf-Anfärbung mit Myozyten konnte die Expression semi-quantitativ ausgewertet werden (siehe Abb. 4 und Tabelle 5).

Tabelle 5: Semi-qualitative Bewertung von Rap1 und B-Raf in GEP-NETs. Die Expression von Rap1 und B-Raf wurde als schwach (+), mäßig (++) und stark (+++) im visuellen Vergleich zur Anfärbung von Endothelzellen (= mäßige Rap1-Expression) oder Myozyten (= starke B-Raf-Expression) gewertet.

	Rap1			B-Raf		
	+	++	+++	+	++	+++
Stärke der Expression						
Insulinome N=24	8/24	16/24	0/24	2/24	17/24	5/24
Serotonin- produzierende NETs N=15	9/15	4/15	2/15	3/15	7/15	5/15
Gastrinome N=10	0/10	4/10	6/10	1/10	8/10	1/10

Die Mehrzahl der Insulinome wies mäßige Expression von Rap1 und B-Raf auf (Tab. 5). Abb. 7B, F und H zeigen die typische immunhistochemische Anfärbung von Insulinomen durch Insulin-Antikörper. Exemplarisch zeigen Abb. 7A mäßige, Abb. 7C und D schwache Expression von Rap1. Abb. 7E zeigt starke, 7G mäßige und 7I+J zeigen schwache Expression von B-Raf. Anhand der Serienschritte 7A/B, E/F und G/H erkennt man, dass sowohl Rap1 als auch B-Raf in der Mehrzahl der Insulinome deutlich überexprimiert wird.



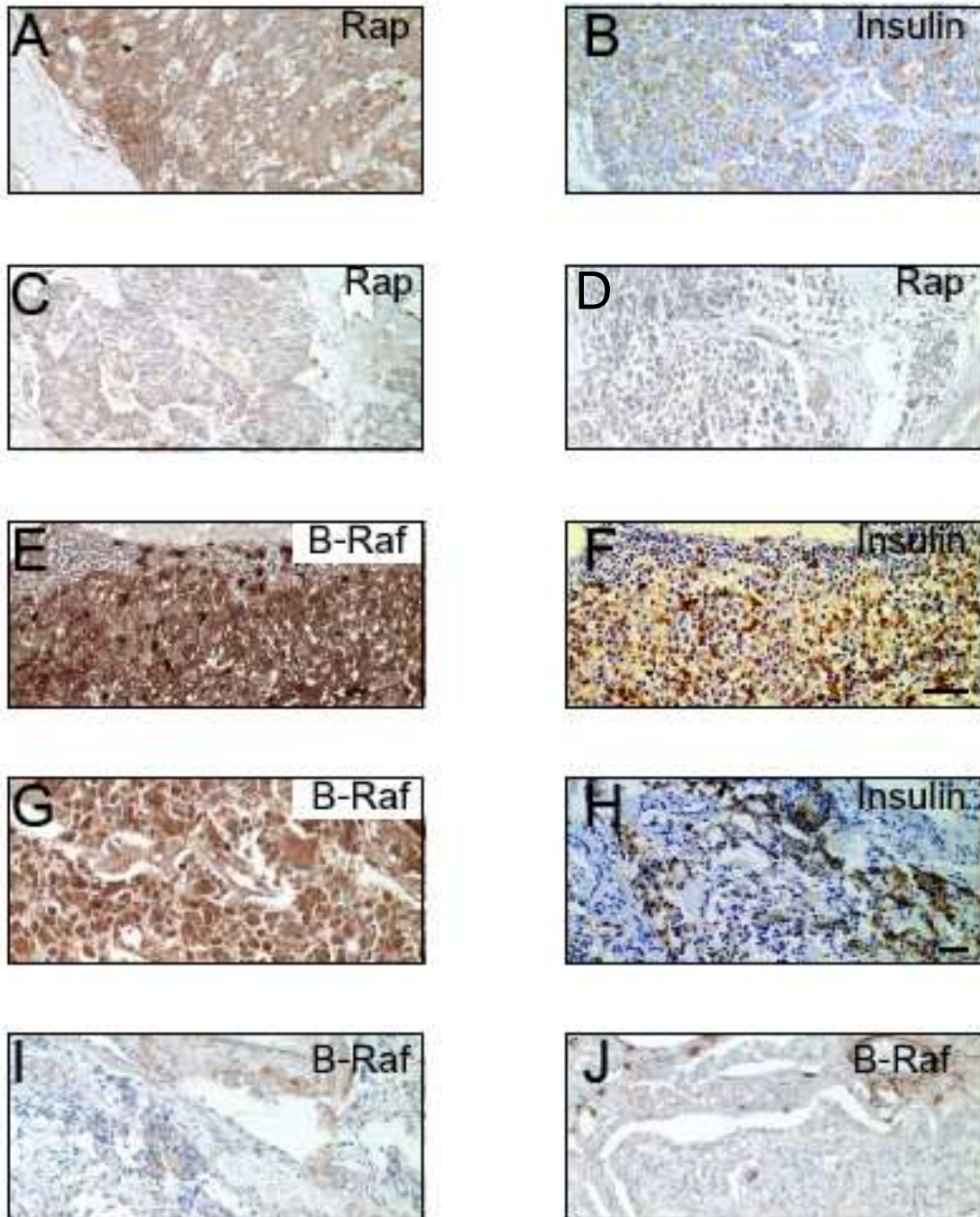


Abbildung 7: Die Expression von Rap1 (A-D) und B-Raf (E-J) in Insulinomen. Die Paraffinschnitte der Insulinome wurden mit Antikörpern gegen Rap1 (A, C, D), B-Raf (E, G, I, J) und Insulin (B, F, H) gefärbt. Die Bilder A/B, E/F und G/H sind Serienschritte. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Bei der semiquantitativen Auswertung der Serotonin-produzierenden NETs fiel auf, dass die Mehrzahl der Tumoren Rap1 nur schwach, B-Raf hingegen mäßig exprimiert. In den untersuchten Gastrinomen verhält sich die Expression umgekehrt, Rap1 ist in der Mehrzahl der Schnitte stark exprimiert, B-Raf mäßig (Tab. 5). Die Abb. 8A/B, C/D, E/F und G/H sind Serienschnitte aus GEP-NETs. Abb. 8B und D zeigen die immunhistochemische Anfärbung von zwei Serotonin-produzierenden NETs mit Serotonin-Antikörpern. Abb. 8B zeigt einen Tumor mit wesentlich schwächerer Expression von Serotonin als in Tumor 8D. Abb. 8A zeigt einen Serotonin-produzierenden Tumor mit mäßiger Rap1-Expression, Abb. 8C zeigt starke B-Raf-Expression. Abb. 8F und H zeigen die immunhistochemische Anfärbung von Gastrinomen mit Gastrinantikörpern. Abb. 8E zeigt ein Gastrinom mit mäßiger Rap1-Expression, Abb. 8G zeigt starke B-Raf-Expression.

Die untersuchten GEP-NETs zeigten keine homogene Anfärbung der Tumore durch Rap1 oder B-Raf. Einige ließen sich nur sehr schwach gegen Rap1 (Abb. 7C, D) und B-Raf (Abb. 7I, J) anfärben, andere wiederum zeigten innerhalb des Tumorgewebes deutliche Unterschiede (Abb. 8A,C). Rap1 zeigt eine wesentlich weiter verbreiterte Expression als B-Raf, aber auch B-Raf ist weniger spezifisch als zum Beispiel Chromogranin A. Es konnte deutlich gemacht werden, dass sowohl Rap1 als auch B-Raf eine eindeutige Überexpression in der Mehrzahl der GEP-NETs aufweisen im Vergleich zu den meisten umliegenden Geweben. Nachdem wir dies festgestellt hatten, untersuchten wir als nächstes die Auswirkungen dieser Überexpression auf die Downstream-MAP-Kinase ERK2 und den ERK-abhängigen Transkriptionsfaktor Elk-1 in einer Karzinoidzelllinie (Signaltransduktionskaskade siehe Abb. 2).

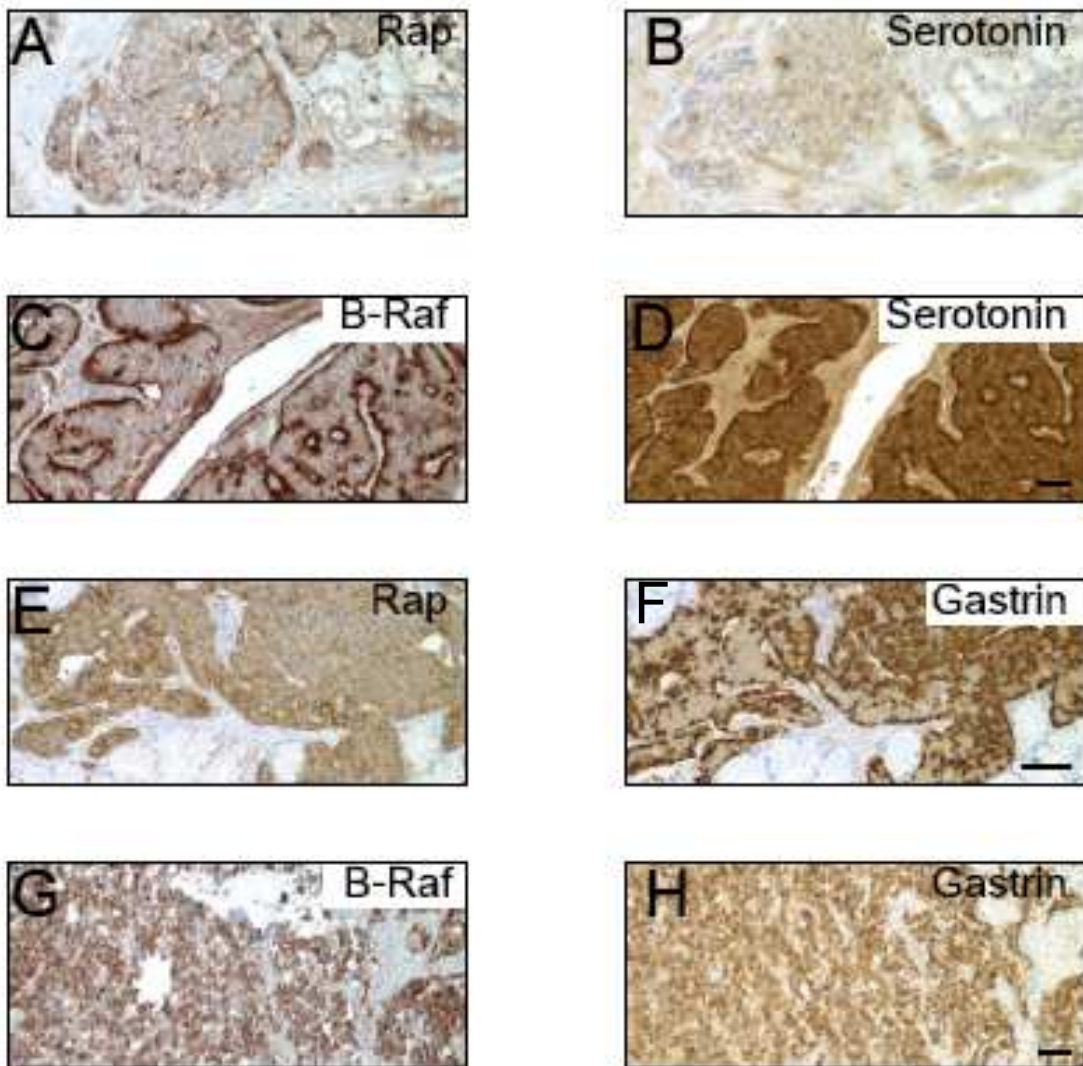


Abbildung 8: Die Expression von Rap1 und B-Raf in Serotonin-produzierenden NETs und Gastrinomen. Die Paraffinschnitte von Serotonin-produzierenden NETs (A-D) und Gastrinomen (E-H) wurden mit Antikörpern gegen Rap1 (A, E), Serotonin (B, D), B-Raf (C, G) und Gastrin (F, H) inkubiert. A/B, C/D, E/F und G/H sind Serienschritte, sie zeigen starke bis sehr starke Expression von Rap1 und B-Raf. Die Maßstäbe entsprechen 50  $\mu\text{m}$ .

## 2. Luziferaseassay

Für die Auswirkung einer Überexpression von Wildtyp Rap1 und B-Raf auf die Aktivierung der MAPK-Signaltransduktionskaskade in GEP-NETs untersuchten wir BON-Zellen als Modell für Serotonin-produzierende NETs. Es zeigte sich, dass die Überexpression von Wildtyp Rap1 eine starke Elk1-Aktivierung induzierte, die Überexpression von Wildtyp B-Raf zeigte wesentlich schwächere Effekte. Eine Überexpression von Wildtyp Rap1 und Wildtyp B-Raf zeigte keinen additiven Effekt, die Elk-1-Aktivierung war sogar schwächer als unter Überexpression von Rap1 alleine. B-Raf BxB, eine Mutante mit einer aktivierten COOH-Kinasedomäne, zeigte eine deutliche Elk-1-Aktivierung, die im Vergleich zur Aktivierung durch Wildtyp B-Raf etwa doppelt so stark war. Die Elk-1-Aktivierung durch konstitutiv aktiviertes Rap1 G12V war wesentlich schwächer als durch Wildtyp Rap1 (siehe Abb. 9).

Nachdem wir also nachgewiesen hatten, dass zumindest die Überexpression von Wildtyp Rap1 und B-Raf BxB in BON-Zellen eine starke Elk-1-Aktivierung induzierte, interessierte uns als nächstes die Wirkung des B-Raf-Inhibitors BAY 43-9006 auf Wachstum und Apoptose von GEP-NETs.

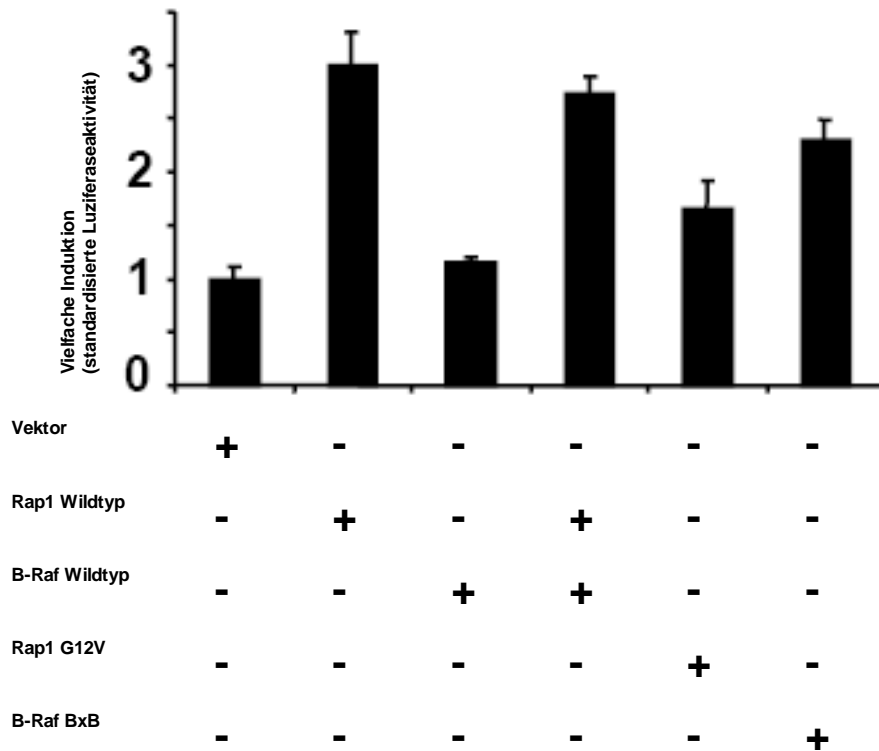


Abbildung 9: Gal4-Elk1 abhängiger Luziferaseassay. Untersucht wurde der Effekt einer Überexpression von Wildtyp Rap1 und B-Raf in einer Karzinoidzelllinie (BON). Die Zellen wurden mit Gal4-Elk1 -abhängigen Reporterplasmiden und Luziferasevektoren als Reporterplasmide sowie mit einem Kontrollplasmid oder verschiedenen Kombinationen von Expressionsvektoren für Wildtyp Rap1 und B-Raf sowie Rap1 G12V und B-Raf BxB transfiziert. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von 4-5 voneinander unabhängigen Experimenten.

### 3. MTT-Assay

Wir untersuchten den Effekt von unterschiedlichen Konzentrationen von BAY 43-9006 (gelöst in DMSO) auf Wachstum und Apoptose in In-R1-G9- und BON-Zellen als Modelle für GEP-NETs. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit BAY 43-9006 inkubiert und anschließend wurde per MTT-Assay der Anteil an lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO bestimmt.

Das Wachstum der BON-Zellen wurde durch 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Lösungen von BAY 43-9006 inhibiert bei einer  $IC_{50}$  zwischen diesen Konzentrationen. Eine 1  $\mu$ M Lösung zeigte keinen Effekt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die In-R1-G9-Zellen reagierten etwas sensitiver, auch ihr Wachstum wurde durch 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Lösungen von BAY 43-9006 inhibiert. Im Vergleich zu den BON-Zellen zeigten sich bei den In-R1-G9-Zellen nach den 24 Stunden allerdings wesentlich weniger lebende Zellen bei 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M

Lösungen von BAY 43-9006 bei einer  $IC_{50}$  zwischen 1 und 5  $\mu\text{M}$ . Auch bei den In-R1-G9-Zellen erzielten geringere Konzentrationen als 1  $\mu\text{M}$  keinen Effekt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (siehe Abb. 10).

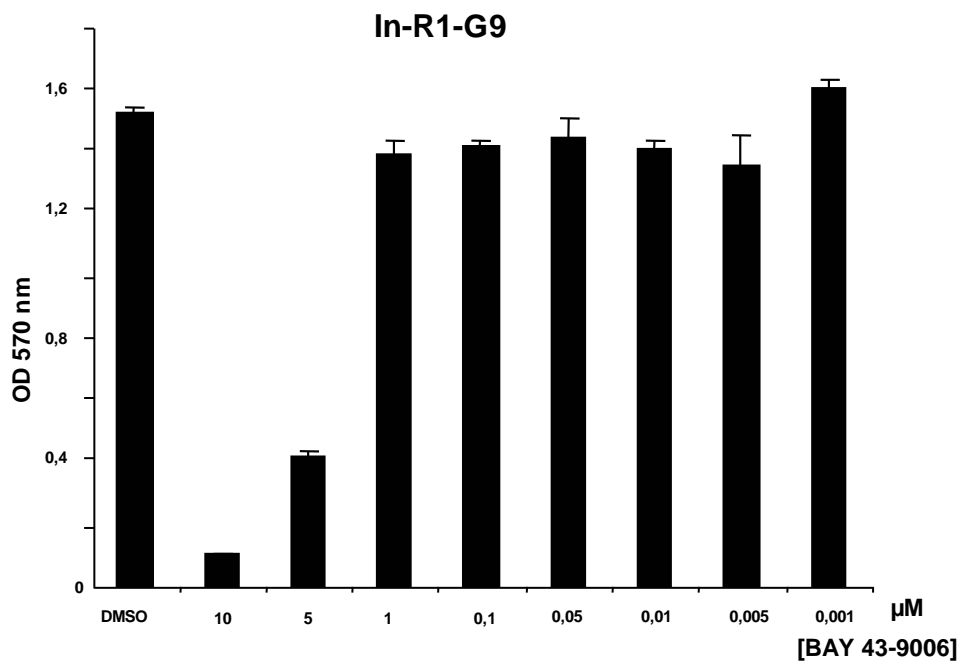
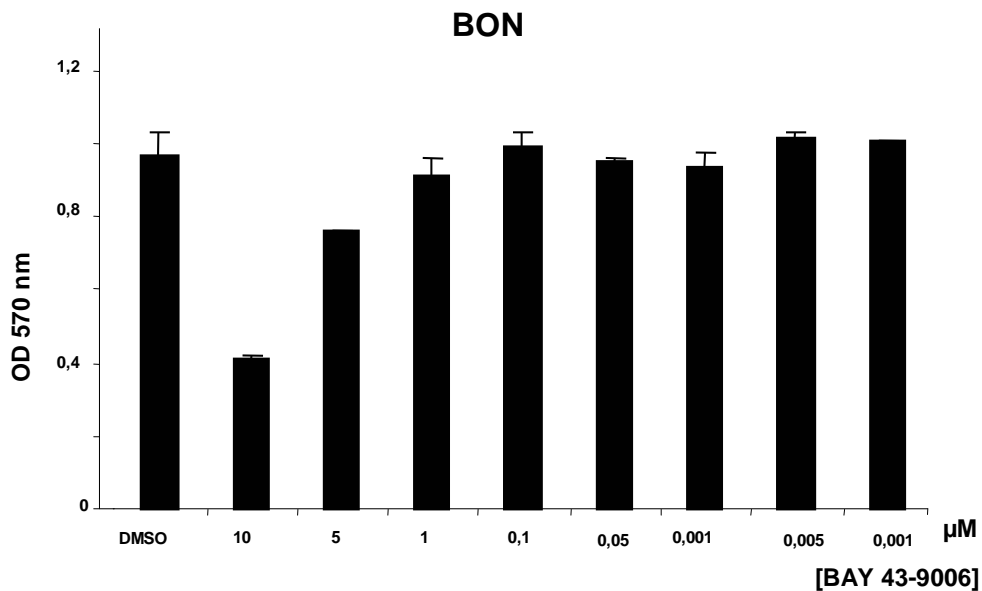


Abbildung 10: Inhibition und Proliferation der neuroendokrinen Tumorzelllinien BON und In-R1-G9 durch BAY 43-9006. Der Anteil an lebenden Zellen wurde per MTT-Assay bei 570 nm photometrisch bestimmt. Erläuterungen siehe Text.

#### 4. Westernblot

Nachdem die MTT-Assays eine Wachstumsinhibition von neuroendokrinen Tumorzelllinien bei 10 und 5  $\mu\text{M}$  Konzentrationen von BAY 43-9006 gezeigt hatten, untersuchten wir den Effekt von BAY 43-9006 auf die MAPK-vermittelte Signaltransduktion in neuroendokrinen Tumorzellen. Zusätzlich untersuchten wir außerdem den Effekt von BAY 43-9006 auf die intrazelluläre Signaltransduktion durch PI3K/PKB. Die BON-Zellen wurden mit DMSO oder ansteigenden Konzentrationen von BAY 43-9006 über 12 Stunden inkubiert und die Zellysate wurden westerntransferiert. Anschließend wurde die Aktivierung von MEK1/2 (Abb. 11A), pERK1/2 (11B) und PKB (11C) durch Phosphorylierungs-spezifische Antikörper detektiert.

Die MEK1/2- und ERK1/2-Phosphorylierung wurde durch BAY 43-9006 in den Konzentrationen 10 $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 1 $\mu\text{M}$  inhibiert (Abb. 11A, B). BAY 43-9006 hatte außerdem einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphorylierung von PKB in BON-Zellen in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  - 10nM (Abb. 11C). Dies könnte darauf hinweisen, dass BAY 43-9006 in neuroendokrinen Zellen nicht nur die MAPK-Signaltransduktionskaskade inhibiert, sondern auch die PKB-Aktivierung hemmt.

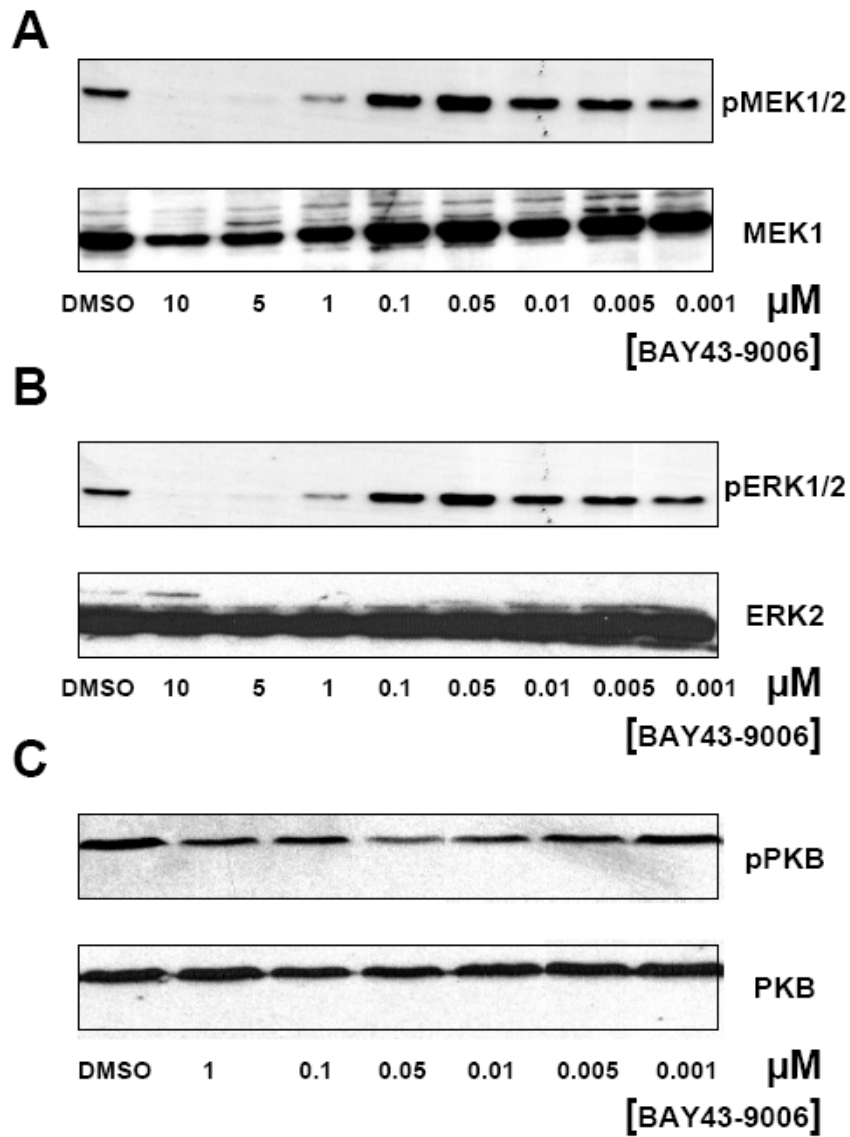


Abbildung 11: Der Effekt von BAY 43-9006 auf MAPK-Signaltransduktion in BON-Zellen. Die Zellen wurden mit DMSO oder ansteigenden Konzentrationen von BAY 43-9006 inkubiert. Die Aktivierung von MEK1/2 (A), pERK1/2 (B) und PKB (C) wurde mit spezifischen Antikörpern detektiert. Dies sind repräsentative Beispiele von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Weitere Erläuterungen siehe Text.



## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass Rap1 und B-Raf in der Mehrzahl der untersuchten GEP-NETs im Vergleich zu den umgebenden Geweben überexprimiert sind. Hierbei stellten wir fest, dass B-Raf-Antikörper neuroendokrine Tumore wesentlich selektiver anfärben als Rap1-Antikörper. Außerdem fanden wir heraus, dass die untersuchten Tumore keine homogene Anfärbung zeigten, sondern ein sehr unterschiedliches Muster. So waren einige stark angefärbt, andere schwach und auch innerhalb eines Tumors zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression. Interessanterweise scheint die Rap1-Expression in Pankreasinseln am ehesten mit der Expression von Somatostatin zu korrespondieren.
2. Mittels Luziferaseassay fanden wir heraus, dass vor allem <sup>WT</sup>Rap1 und B-Raf BxB eine starke Elk-1-Aktivierung in BON-Zellen induzieren und somit die Signaltransduktion über Rap1/B-Raf/MEK/ERK aktivieren. <sup>WT</sup>B-Raf zeigte nur eine sehr schwache Elk-1-Aktivierung und die gemeinsame Überexpression von <sup>WT</sup>Rap1 und <sup>WT</sup>B-Raf hatten keinen additiven Effekt.
3. Bei den MTT-Assays reagierten sowohl die BON- als auch die In-R1-G9-Zellen auf Sorafenib (BAY 43-9006). Beide Zelllinien wiesen bei Sorafenib-Konzentrationen von 10 und 5  $\mu\text{M}$  einen verminderten Gehalt an lebenden Zellen auf, wobei bei den In-R1-G9-Zellen der Effekt etwas ausgeprägter war. In beiden Zelllinien inhibiert Sorafenib in den Konzentrationen 10 und 5  $\mu\text{M}$  das Wachstum.
4. Durch Westernblots konnten wir schließlich nachweisen, dass die Phosphorylierung und somit Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 durch Sorafenib in den Konzentrationen 10, 5 und 1  $\mu\text{M}$  inhibiert wird. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass auch die Phosphorylierung von PKB und dadurch die Signaltransduktion über das PI3K/PKB-Modul durch Sorafenib in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  - 10 nM inhibiert wird.

## D Diskussion

GEP-NETs sind eine heterogene Gruppe von meist langsam wachsenden Tumoren mit einer bisher weitgehend unbekanntem molekularen Pathogenese. Die Mehrheit der GEP-NETs ist wenig chemosensitiv, was eine Klärung der Pathogenese mit Identifizierung von möglichen Angriffspunkten einer konservativen Behandlung umso wichtiger werden lässt (Delle Fave und Corleto 2001; Lubomierski et al. 2001; Oberg 2003).

### 1. Der Terminus „GEP-NETs“ und seine Problematik

Ein Hauptproblem bei der Erforschung der molekularen Genese von GEP-NETs ist ihre Seltenheit. Die genaue Inzidenz der Karzinoide und PET variiert abhängig davon, ob man nur die symptomatischen oder alle Tumore betrachtet. Die Inzidenz klinisch signifikanter Karzinoide beträgt 7-13 Fälle/1.000.000 Einwohner jährlich. Bei Autopsieberichten treten allerdings 21 bis 84 maligne Karzinoide/1.000.000 Einwohner jährlich auf. Insulinome, Gastrinome und nicht funktionelle PET haben eine Inzidenz von 0,5 bis zwei Fällen/1.000.000 Einwohner pro Jahr (vgl. Tabelle 1) (Jensen et al. 2002). Die geringe Anzahl an Tumoren macht es schwierig, ausreichend dokumentiertes, klassifiziertes und gut präpariertes Material zur Charakterisierung und molekularen Diagnostik zu sammeln. Auch in der WHO-Klassifikation von 2000 werden die neuroendokrinen Tumore ihrem Ursprungsort zugeordnet, so dass man zwar die Inzidenz von neuroendokrinen Tumoren des Magens oder der Appendix erfahren kann, nicht aber die Inzidenz von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren insgesamt (WHO Classification of Tumours 2000).

Die Zusammenfassung von pankreatischen neuroendokrinen Tumoren und enteralen neuroendokrinen Tumoren („Karzinoide“) zu einer gemeinsamen Gruppe mit dem Terminus „GEP-NETs“ suggeriert Homogenität, obwohl diese Gruppe gerade in der molekularen Pathogenese alles andere als homogen ist. So zeigten Zikusoka et al. in einem Vergleich der häufigsten chromosomalen Abberationen von PETs und enteralen NETs, dass keine Überschneidungen stattfanden. Die häufigsten chromosomalen Abberationen in PETs sind Gewinne an Chromosom 7 und 20 sowie Verluste an Chromosom 2, 6q, 21q und Y. In gastrointestinalen Karzinoiden sind die häufigsten chromosomalen Abberationen Gewinne an Chromosom 17 und 19 und ein Verlust an Chromosom 18. Bei den genetischen Syndromen mit einer erhöhten Inzidenz von NETs wie der MEN1

sind die Tumore vor allem im Pankreas lokalisiert und nur sehr selten enteral. Zikusoka et al. stellten weiterhin chromosomale Unterschiede zwischen primären PETs und deren Metastasen sowie zwischen aktiven und inaktiven PETs fest. So bleibt auch hier zu fragen, ob nicht selbst innerhalb der Gruppe der PETs Unterschiede in der molekularen Genese auftreten (Zikusoka et al. 2005).

Derzeit sind mindestens 15 verschiedene Typen von endokrinen Zellen bekannt sind, aber nur weniger als die Hälfte der bekannten Hormone wird in GEP-NETs exprimiert (Rindi et al. 2000)(siehe Tabelle 6). Allein diese Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen und produzierten Hormonen macht es wahrscheinlich, dass die Tumore in der molekularen Genese unterschiedliche Pathomechanismen aufweisen. Dies legt nahe, dass neuroendokrine Tumore mit unterschiedlicher Ursprungslokalisierung genetisch voneinander unabhängige Tumore sind.

Tabelle 6: Zelltypen, Hauptprodukte und Syndrome von GEP-NETs. Modifiziert nach: (Rindi et al. 2000), Tabelle 2

Zelltyp	Hauptprodukt	Syndrom
A	Glukagon	-
B	Insulin	-
D	Somatostatin	-
EC	Serotonin	Karzinoidsyndrom
ECL	Histamin	-
G	Gastrin	Zollinger-Ellison-Syndrom
PP	Pankreatisches Polypeptid	-

## 2. Die Aussagekraft der immunhistochemischen Ergebnisse

In meiner Arbeit wurden 24 Insulinome, 10 Gastrinome und 15 Serotonin-produzierende NETs untersucht. Da die Tumorproben aus einer Sammlung von neuroendokrinen Tumoren von 1983 bis 2002 stammen, war es vor allem bei den älteren Paraffinblöcken sehr schwierig, weitere Informationen zu erhalten. Dazu gehören die klinischen Symptome der Patienten, die Ursprungslokalisierung des Tumors sowie das TNM-Stadium, Mitose- und Proliferationsindizes. Soweit bekannt, stammen alle Insulinome bis auf zwei aus dem Pankreas. Von diesen beiden stammt die Probe des einen aus einer

Lebermetastase, die des anderen aus einer Lymphknotenmetastase. Die Serotonin-produzierenden NETs stammen aus sämtlichen gastrointestinalen Organen einschließlich Lebermetastasen sowie aus der Lunge. Die Gastrinome stammen entweder aus dem Pankreas oder Duodenum. Obwohl die Insulinome nach der von Zikusoka et al. beschriebenen Einteilung von den Serotonin-produzierenden NETs und Gastrinomen keine gemeinsamen molekularen Pathomechanismen in der Tumorgenese aufweisen, weisen die pankreatischen NETs und die enteralen NETs zumindest in der Expression von Rap1 und B-Raf keine Unterschiede auf. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass Antikörper gegen Rap1 und B-Raf neuroendokrines Gewebe zu unspezifisch anfärben, um hier Unterschiede herausarbeiten zu können. Um diese These zu überprüfen, könnte die Expression von Rap1 und B-Raf in anderen endokrinen Tumoren wie etwa Schilddrüsenkarzinomen immunhistochemisch untersucht werden.

Auf der Suche nach therapeutischen Angriffspunkten der GEP-NETs untersuchten wir den Beitrag des kleinen G-Proteins Rap1 und seiner Downstreamkinase B-Raf in GEP-NETs und neuroendokrinen Tumorzelllinien. Diese Experimente zeigten eine hochselektive Expression von B-Raf in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Zellen, aus denen die GEP-NETs entstehen. Die GTPase Rap1 wurde als Hauptaktivator von B-Raf und deren Downstreamkinasen identifiziert (Bos et al. 2001). Deshalb untersuchten wir die Expression von Rap1 und B-Raf in GEP-NETs und ihre Rolle als Effektoren des MAPK-Signaltransduktionskomplexes in neuroendokrinen Tumorzelllinien. Im Vergleich zu den festgelegten internen Standards zeigten Rap1 und B-Raf in der Mehrzahl der GEP-NETs eine deutliche Überexpression. Bei der mikroskopischen Auswertung fiel außerdem auf, dass durch die Anfärbung mit Antikörpern gegen Rap1 und B-Raf der Tumor bis auf wenige Ausnahmen klar vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden konnte. Interessanterweise scheint die B-Raf-Expression ein guter Marker für neuroendokrine Gewebe zu sein, wenn auch weniger spezifisch als Chromogranin A (Solcia et al. 2000). Um diese ersten viel versprechenden und richtungsweisenden Ergebnisse zu bestätigen, sollten meiner Meinung nach allerdings immunhistochemische Untersuchungen in wesentlich größerer Fallzahl erfolgen. Wenn möglich, sollten die klinischen Daten der untersuchten Proben bekannt sein, damit eine Korrelation zwischen der Tumorprimärlokalisierung, dem Differenzierungsgrad des Tumors einerseits und der Rap1- und B-Raf-Expression und -Lokalisation im Tumorgewebe andererseits möglich ist.

### 3. Die Rolle von Rap1 und B-Raf in der molekularen Genese von GEP-NETs

Ca. 15% aller humanen Karzinome weisen aktivierende Ras-Mutationen auf. Zudem wurden mehr als 30 Mutationen des B-Raf Gens identifiziert, die mit humanem Krebs assoziiert sind (Davies et al. 2002). <sup>V599E</sup>B-Raf besitzt alle wichtigen Eigenschaften eines Onkogens. So ist die Kinaseaktivität dieses mutierten Proteins deutlich erhöht und es stimuliert ERK Ras-unabhängig in vivo (Wan et al. 2004). Mutationen von B-Raf wurden in malignen Melanomen (Brose et al. 2002), kolorektalen Karzinomen (Rajagopalan et al. 2002), Ovarialkarzinomen (Singer et al. 2003), cholangiozellulären Karzinomen (Tannapfel et al. 2003) und papillären Schilddrüsenkarzinomen (Brose et al. 2002; Cohen et al. 2003) nachgewiesen. Wegen des Nachweises von B-Raf-Mutationen in neuroendokrinen Tumoren wie dem Schilddrüsenkarzinom untersuchten wir die Expression von B-Raf in GEP-NETs. Wir wiesen immunhistochemisch nach, dass B-Raf in der Mehrzahl der untersuchten GEP-NETs deutlich überexprimiert ist und B-Raf-Antikörper außerdem spezifisch neuroendokrines Tumorgewebe und enteroendokrine Zellen (Abbildung 6j) anfärbten. Allerdings zeigten Tannapfel et al. in einer Studie über <sup>V559E</sup>B-Raf in GEP-NETs, dass diese Mutation nur in 3% der untersuchten Fälle auftritt und somit bei der Tumorgenese von GEP-NETs eine untergeordnete Rolle spielt (Tannapfel et al. 2005). Folglich spielt B-Raf zwar bei der Signaltransduktion verschiedenster Stimuli zur Regulation von Wachstum, Differenzierung und Apoptose in GEP-NETs eine wichtige Rolle, allerdings scheint das Onkogen <sup>V599E</sup>B-Raf keinen Beitrag zur molekularen Pathogenese von GEP-NETs zu leisten.

Es zeigte sich, dass B-Raf und Ras-Mutationen in den gleichen Tumortypen auftreten. Dies lässt die Vermutung zu, dass die beiden Gene denselben onkogenen Signaltransduktionsweg nutzen und Ras B-Raf in diesen Tumoren aktiviert (Wan et al. 2004). Eine Möglichkeit wäre folglich, dass aktivierende Ras-Mutationen bei der molekularen Genese von GEP-NETs eine Rolle spielen, und zwar indem diese aktivierenden Ras-Mutanten B-Raf aktiviert. Dies würde auch erklären, wieso wir eine deutliche und auf die neuroendokrinen Tumoren begrenzte Überexpression von B-Raf nachwiesen. Obwohl mehr als 90% der pankreatischen nicht-endokrinen Karzinome K-Ras Mutationen aufweisen, wurden Mutationen von K-Ras in GEP-NETs nur sporadisch beobachtet und scheinen bei der Pathogenese dieser Tumore keine Rolle zu spielen (Delle Fave und Corleto 2001).

#### 4. Der Effekt von Rap1 und B-Raf auf die MAPK-Aktivierung in GEP-NETs

Rap1 wurde ursprünglich wegen seiner Fähigkeit, die Rafkinase zu inhibieren, als Inhibitor von Ras-transformierten Tumorzellen identifiziert. Später wurde gezeigt, dass Rap1 auch die MAPK-Signaltransduktion über die Aktivierung von B-Raf in neuronalen und endokrinen Zellen aktivieren kann (Hagemann und Rapp 1999; Bos et al. 2001). In neuroendokrinen Zelllinien aktivierten <sup>WT</sup>Rap1 und <sup>WT</sup>B-Raf die MAPK-Signaltransduktion und inhibierten sie nicht, wie anfänglich beobachtet. Die MAPK-Aktivierung ist hierbei anhängig von der neuroendokrinen Zelllinie und der stochiometrischen Relation zwischen der Rap1- und der B-Raf-Expression. Die unterschiedliche Expression von Rap1 und B-Raf in den Tumorproben (Abb. 7C, D, I, J und 8A, C) und somit die variablen Grade von Rap1 und B-Raf könnten auf eine unterschiedliche Differenzierung der MAPK-Signaltransduktion in den Tumorproben oder Zellen hinweisen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass hohe Spiegel von Rap1 und B-Raf in neuroendokrinen Zellen zur MAPK-Aktivierung führen. Die niedrige Inzidenz von aktivierenden B-Raf-Mutationen in GEP-NETs (Tannapfel et al. 2005) führt also zu der Vermutung, dass eher Mutationen von Rap1 als von B-Raf eine Rolle in der Pathogenese der GEP-NETs spielen. Aktivierende Rap1-Mutationen könnten in drei Hauptkategorien auftreten: Entweder aktivierende Mutationen von Rap1 selbst, inaktivierende Mutationen von Rap-GAPs oder aktivierende Mutationen von Rap-GEFs. Das Rap-GAP (*Rap1 GTPase-activating protein*) SPA-1 (*signal-induced proliferation-associated gene-1*) scheint als Tumorsuppressor zu fungieren, da SPA-1-defiziente Mäuse verschiedene myeloische Defekte wie z.B. CML entwickeln (Ishida et al. 2003). Das Gen DOCK4 gehört zur CDM-Genfamilie, die für GTPase-Regulatoren kodieren, und aktiviert Rap1 spezifisch. Mutationen von DOCK4 wurden z.B. in Prostata- und Ovarialkarzinomen identifiziert (Yajnik et al. 2003; Ishida et al. 2003).

#### 5. Der Einfluss von B-Raf-Mutanten auf die Signaltransduktion im B-Raf/MEK/ERK-Modul

Aktivierte B-Raf-Mutanten können MEK direkt phosphorylieren und aktivieren. Sie können MEK zwar auch indirekt über die Aktivierung von Raf-1 aktivieren, benötigen diesen indirekten Signaltransduktionsweg jedoch nicht. Jene B-Raf-Mutanten mit einer eingeschränkten Aktivität können MEK nicht suffizient direkt stimulieren, dafür aber Raf1 und somit indirekt MEK. Ihre Signaltransduktion zu ERK ist also Raf-1 abhängig

(siehe Abb. 12) (Wan et al. 2004). Auch Davies et al. beschrieben, dass  $V^{599E}$ B-Raf Zellen von molekularen Aktivatoren entbinden kann. Die regulatorischen phosphorylierenden Positionen im Aktivierungssegment von B-Raf (Thr598 und Ser601) flankieren Val599. Im onkogenen  $V^{599E}$ B-Raf könnte das Glutamin folglich eine phosphomimetische Funktion aufweisen. Durch diese „Phosphorylierungsmimikry“ benötigen die  $V^{599E}$ Mutanten einen Ras-abhängigen Schritt nicht mehr und entbinden sich so vom Ras-abhängigen Proliferationssignal (Davies et al. 2002).

Mittels Luziferaseassay fanden wir heraus, dass vor allem  $WT$ Rap1 und B-Raf BxB eine starke Elk-1-Aktivierung in BON-Zellen induzieren und somit die Signaltransduktion über Rap1/B-Raf/MEK/ERK aktivieren.  $WT$ B-Raf zeigte nur eine sehr schwache Elk-1-Aktivierung und die gemeinsame Überexpression von  $WT$ Rap1 und  $WT$ B-Raf hatten keinen additiven Effekt. Die wesentlich stärkere Induktion der Elk-1-Aktivierung von B-Raf BxB im Vergleich zu  $WT$ B-Raf könnte auf ähnliche molekulare Mechanismen wie in dem von Wan et al. beschriebenen Modell zurückzuführen sein.

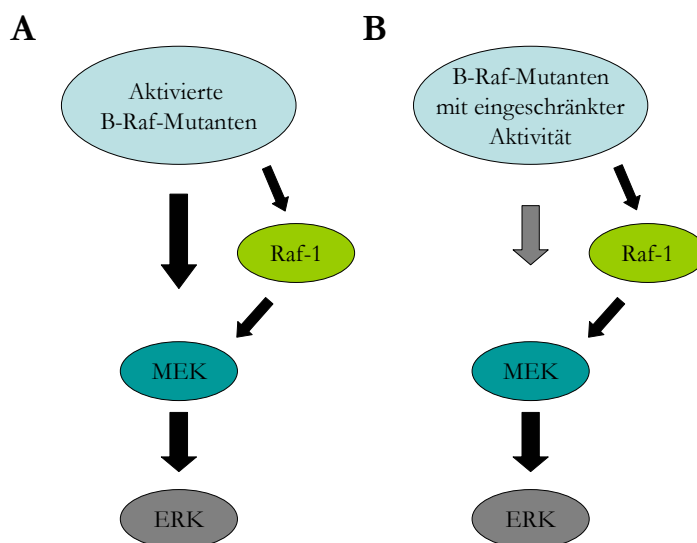


Abbildung 12: Die differente Signaltransduktion zu ERK durch unterschiedliche B-Raf-Mutanten. A: Aktivierte Mutanten von B-Raf können MEK direkt phosphorylieren und somit aktivieren. Obwohl sie MEK auch indirekt über eine Aktivierung von Raf-1 aktivieren könnten, ist dieser Weg nicht obligat. B: Jene B-Raf-Mutanten mit eingeschränkter Aktivität können keine effiziente Aktivierung von MEK bewirken und aktivieren stattdessen Raf-1, welches dann MEK aktiviert. Ihre Fähigkeit, Signaltransduktion an ERK weiterzuleiten, ist also von Raf-1 abhängig. Abkürzungen: MEK: MAPK/Erk Kinase, ERK: Extrazellulär signalregulierte Kinase. Modifiziert nach (Wan et al. 2004), Abb. 7

## 6. Die Bedeutung des Rafkinase-Inhibitors Sorafenib (BAY 43-9006) in der Therapie von GEP-NETs

Da wir zeigen konnten, dass hohe Expression von Rap1 und B-Raf oder aktivierende Mutationen von Rap1 und B-Raf MAPK-Signaltransduktion in neuroendokrinen Tumorzelllinien aktivieren, wurden diese Zellen anschließend mit Sorafenib (BAY 43-9006) behandelt. Sorafenib ist ein potenter Raf-1-Inhibitor und supprimiert sowohl <sup>WT</sup>B-Raf als auch <sup>V559E</sup>B-Raf in vitro (Wilhelm et al. 2004). Nach Wan et al. interagiert Sorafenib mit einer inaktiven Konformation von B-Raf. Aktivierende onkogene Mutanten von B-Raf könnten also weniger sensitiv auf Sorafenib reagieren als <sup>WT</sup>B-Raf, mit der möglichen Entwicklung einer induzierten Sorafenib-resistenten Mutation der Kinase. Kinetische Studien von BAYER haben gezeigt, dass <sup>V559E</sup>B-Raf zweifach weniger sensitiv auf Sorafenib reagiert als <sup>WT</sup>B-Raf (Wan et al. 2004).

Wir untersuchten Proliferation und Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kinase MEK1 sowie der MAP-Kinasen ERK1/2 und PKB in neuroendokrinen Tumorzelllinien. Obwohl nur relativ hohe Konzentrationen von BAY 43-9006 die Proliferation der Zellen inhibieren und Apoptose induzieren konnten, wurde die Phosphorylierung der Downstreamkinasen bereits durch etwas niedrigere Konzentrationen induziert. Da GEP-NETs generell niedrige Proliferationsraten aufweisen und durch das Vermeiden von Apoptose wachsen könnten, könnte die Induktion von Apoptose durch Raf-Kinase-Inhibition therapeutisch erfolgversprechender als die Wachstumsinhibition sein.

Rafkinase-Inhibitoren sind also eine vielversprechende Option in der konservativen Behandlung von GEP-NETs. Dies trifft vor allem für diejenigen Patienten zu, deren Tumor und/oder dessen Metastasen nicht kurativ chirurgisch reseziert werden können. Als Inhibitor von Rafkinasen, VEGFR und PDGFR kann Sorafenib (BAY 43-9006) über mehrere Angriffspunkte in die Tumorphiliferation und -angiogenese eingreifen. Eine multimodale Therapie mit konventionellen zytotoxischen Pharmaka und zytostatisch wirkenden Inhibitoren des ERK-Signaltransduktionskomplexes verspricht exzellente Erfolge bei der Entwicklung neuer chemotherapeutischer Strategien (Kohno und Pouyssegur 2006). So könnten Rafkinaseinhibitoren zusätzlich zu der bereits etablierten konservativen Therapie von GEP-NETs eingesetzt werden. Es wurden bereits vier Phase-I-Studien veröffentlicht, in denen Sorafenib ein tolerables Nebenwirkungsprofil mit Diarrhö als häufigster Nebenwirkung bei einer maximal tolerierten Dosis von 400 mg zweimal täglich aufwies. Sorafenib zeigte bei tolerablen Nebenwirkungen in Phase-II-Studien signifikante Wirksamkeit gegen metastasierte Nierenzellkarzinome bei



immunotherapeutisch vorbehandelten Patienten sowie gegen hepatozelluläre Karzinome und Sarkome. Basierend auf Phase-II-Resultaten von Patienten mit Nierenzellkarzinomen wurde eine plazebokontrollierte Phase-III-Studie mit 905 randomisierten Patienten durchgeführt und ergab, dass Sorafenib das progressionsfreie Überleben signifikant verlängert (Strumberg 2005; Larkin und Eisen 2006; Rini 2006).

In einer Phase-I-Studie zur Dosisbestimmung wurden die Sicherheit, Pharmakokinetik und Effizienz von Sorafenib plus Doxorubicin untersucht. Sorafenib 400mg zweimal täglich plus Doxorubicin 60 mg/m<sup>2</sup> wurde gut toleriert und es zeigte sich keine signifikant erhöhte Toxizität. Auch dieses Ergebnis ist viel versprechend, sollte aber aufgrund der niedrigen Patientenzahlen (N=34) weiter untersucht werden (Richly *et al.* 2006).

Da wir lediglich 49 GEP-NETs immunhistochemisch untersucht haben und die Wirksamkeit von Sorafenib im Bereich der Grundlagenforschung an neuroendokrinen Tumorzelllinien angewandt haben, sollten diese Ergebnisse präklinisch mit größeren Fallzahlen genauer untersucht werden. Die Wirkung von Sorafenib sollte auch an anderen Modellen von neuroendokrinen Tumoren wie etwa INS-1-Zellen (eine Insulinomzelllinie) untersucht werden und im nächsten Schritt an gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumormodellen in Säugetieren. Schließlich könnten klinische Studien durchgeführt werden, um die Wirksamkeit von Sorafenib gegen GEP-NETs zu überprüfen. Durch die Seltenheit der Tumore könnte allerdings eine ausreichend große Fallzahl für eine klinische Signifikanz schwierig zu erreichen sein.

## E Zusammenfassung

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NETs) sind seltene Tumore, die aus Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems des Gastrointestinaltraktes oder Pankreas entstehen. Unter den funktionellen GEP-NETs zählen zu den häufigsten Serotonin-produzierende neuroendokrinen Tumore, die von Klinikern weltweit häufig mit dem Begriff „Karzinoid“ beschrieben werden, Insulinome und Gastrinome. Über die molekulare Pathogenese von GEP-NETs ist wenig bekannt (Calender 2000; Delle Fave und Corleto 2001; Rindi und Bordi 2003; Rindi und Kloppel 2004). Die Mehrheit der Tumore treten sporadisch auf, sie können aber auch als Teil eines komplexen familiären Syndroms auftreten. Hierzu gehören in abnehmender Häufigkeit die Multiple Endokrine Neoplasien Typ 1, das von-Hippel-Lindau-Syndrom, die Neurofibromatose Recklinghausen sowie die Tuberöse Sklerose (Morbus Bourneville-Pringle) (Leotlela et al. 2003). Im Gegensatz zu den häufigeren Tumoren des Verdauungstraktes wie dem kolorektalen Adenokarzinom, dem Magenkarzinom und dem Pankreaskarzinom sind in den sporadischen GEP-NETs weder Veränderungen in Onkogenen (ras, Myc, fos, jun, Src) noch in Tumorsuppressorgenen (p53, retinoblastoma susceptibility gene) typisch. Auch eine Überexpression von Genprodukten der EGF-Rezeptorfamilie sind bei den GEP-NETs nicht bekannt (Calender 2000; Delle Fave und Corleto 2001).

Zu den wohl am besten untersuchten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden gehören die Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden. Dieser evolutionär stark konservierte Signaltransduktionsweg besteht aus einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor und drei aufeinander folgenden Kinasen, die sich nacheinander fortlaufend phosphorylieren und dadurch aktivieren. Die letzte Kinase in dieser Reihe, die MAP-Kinase, transloziert dann in den Zellkern und reguliert Transkriptionsfaktoren (Kolch 2000). Wir untersuchten speziell das MAPK-Modul mit der GTPase Rap1 und den Kinasen B-Raf, MEK und ERK. Die kleine GTPase Rap1 wurde ursprünglich als ein Suppressor der GTPase Ras identifiziert (Krev-1), da Rap1 in vielen Zelltypen als Ras-Antagonist durch Inhibierung der Ras-Kinase Raf-1 wirkt. Ras und Rap1 können jedoch auch synergistisch wirken, je nachdem ob cAMP für einen bestimmten Zelltyp mitogen wirkt. Die Aktivierung der MAPK durch cAMP wird dabei durch Rap1 und die Serin-Threoninkinase B-Raf vermittelt (Hagemann und Rapp 1999; Kolch 2000; Bos et al. 2001).

In papillären Schilddrüsenkarzinomen, die ihren Ursprung von neuroendokrinen Zellen nehmen, wurden B-Raf-Mutationen nachgewiesen (Cohen et al. 2003). Auch in malignen Melanomen, deren Ursprungszellen ähnliche Eigenschaften aufwiesen wie die Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems des Gastrointestinaltraktes, aus denen die GEP-NETs entstehen, wurden aktivierende B-Raf-Mutationen nachgewiesen (Brose et al. 2002). Wir erwarteten daher, dass der Rap1/B-Raf-Signaltransduktionsweg in der Pathogenese der GEP-NETs eine Rolle spielt.

Zuerst untersuchten wir die Expression von Rap1 und B-Raf immunhistochemisch in 49 GEP-NETs. Diese Experimente zeigten eine hochselektive Expression von B-Raf in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Zellen, aus denen die GEP-NETs entstehen. Im Vergleich zu den festgelegten internen Standards zeigten Rap1 und B-Raf in der Mehrzahl der GEP-NETs eine deutliche Überexpression. Mittels Luziferaseassay fanden wir heraus, dass vor allem Wildtyp-Rap1 und die aktivierte Mutante B-Raf BxB eine starke Aktivierung des ERK-abhängigen Transkriptionsfaktors Elk-1 in einer neuroendokrinen Tumorzelllinie (BON-Zellen) induzieren und somit die Signaltransduktion über Rap1/B-Raf/MEK/ERK aktivieren.

Die Mehrheit der GEP-NETs ist wenig chemosensitiv, was eine Klärung der Pathogenese mit Identifizierung von möglichen Angriffspunkten für eine konservative Behandlung umso wichtiger werden lässt (Delle Fave und Corleto 2001; Lubomierski et al. 2001; Oberg 2003). Auf der Suche nach therapeutischen Angriffspunkten von GEP-NETs untersuchten wir in MTT-Assays den Effekt des Rafkinase-Inhibitors BAY 43-9006 auf Wachstum und Apoptose von neuroendokrinen Tumorzelllinien (In-R1-G9- und BON-Zellen) und in Westernblots den Effekt von BAY 43-9006 auf die Kinasen des MEK-ERK-Moduls. Wir wiesen nach, dass BAY 43-9006 in relativ hohen Konzentrationen die Proliferation der neuroendokrinen Tumorzellen inhibierte. Die Phosphorylierung der Downstreamkinasen wurde aber bereits durch niedrigere Konzentrationen induziert. Rafkinase-Inhibitoren sind also eine vielversprechende Option in der konservativen Behandlung von GEP-NETs.

## F Literaturverzeichnis

Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 369-377.

Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002; 62: 6997-7000.

Calender A. Molecular genetics of neuroendocrine tumors. *Digestion* 2000; 62 Suppl 1:3-18.: 3-18.

Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71: 479-500.

Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 625-627.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.

Delle Fave G, Corleto VD. Oncogenes, growth factors, receptor expression and proliferation markers in digestive neuroendocrine tumours. A critical reappraisal. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 2:S13-7.: S13-S17.

Dhanasekaran N, Premkumar RE. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 1998; 17: 1447-1455.

Donow C, Pipeleers-Marichal M, Schroder S, Stamm B, Heitz PU, Kloppel G. Surgical pathology of gastrinoma. Site, size, multicentricity, association with multiple endocrine neoplasia type 1, and malignancy. *Cancer* 1991; 68: 1329-1334.

Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 211-218.

Hagemann C, Rapp UR. Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 1999; 253: 34-46.

Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 1349-1353.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.

Ishida D, Kometani K, Yang H, Kakugawa K, Masuda K, Iwai K, Suzuki M, Itohara S, Nakahata T, Hiai H, Kawamoto H, Hattori M, Minato N. Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated Rap1 activation in SPA-1-deficient mice. *Cancer Cell* 2003; 4: 55-65.

Jensen RT, Baumgart DC, Wiedenmann B. Neuroendokrine Tumoren (NET) des gastroentero-pankreatischen (GEP) Systems. In: Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N, editors. *Harrisons Innere Medizin* 1, 15. Auflage, deutsche Ausgabe. Berlin, Leiben: ABW Wissenschaftsverlag, 2002: 656-66.

Klöpffel G. [Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract]. *Pathologe* 2003; 24: 287-296.

Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 2006; 38: 200-211.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351 Pt 2:289-305.: 289-305.

Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid tumors. *N Engl J Med* 1999; 340: 858-868.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Larkin JM, Eisen T. Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; ..

Leotlela PD, Jauch A, Holtgreve-Grez H, Thakker RV. Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 437-450.

Lubomierski N, Kersting M, Bert T, Muench K, Wulbrand U, Schuermann M, Bartsch D, Simon B. Tumor suppressor genes in the 9p21 gene cluster are selective targets of inactivation in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 5905-5910.

Lynch TM, Gutmann DH. Neurofibromatosis 1. *Neurol Clin* 2002; 20: 841-865.

Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 219-225.

Matheny SA, White MA. Ras-Sensitive IMP Modulation of the Raf/MEK/ERK Cascade Through KSR1. *Methods Enzymol* 2005; 407:237-47.: 237-247.

Mignon M. Natural history of neuroendocrine enteropancreatic tumors. *Digestion* 2000; 62 Suppl 1:51-8.: 51-58.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

Norton JA. Surgical treatment and prognosis of gastrinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 799-805.

O'Neill E, Kolch W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* 2004; 90: 283-288.

Oberg K. Diagnosis and treatment of carcinoid tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 2003; 3: 863-877.

Oberg K. Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: recent advances in molecular genetics, diagnosis, and treatment. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 386-391.

Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., Haber B, Beauchamp RD, Karp G, Kim SW, Rajaraman S, Greeley G, Jr., Thompson JC. Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* 1994; 9: 83-90.

- Pelengaris S, Khan M. Oncogenic co-operation in beta-cell tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 307-314.
- Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001; 93: 53-62.
- Pouyssegur J, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3291-3299.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418: 934.
- Richly H, Henning BF, Kupsch P, Passarge K, Grubert M, Hilger RA, Christensen O, Brendel E, Schwartz B, Ludwig M, Flashar C, Voigtmann R, Scheulen ME, Seeber S, Strumberg D. Results of a Phase I trial of sorafenib (BAY 43-9006) in combination with doxorubicin in patients with refractory solid tumors. *Ann Oncol* 2006; 17: 866-873.
- Rindi G, Bordi C. Highlights of the biology of endocrine tumours of the gut and pancreas. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 427-436.
- Rindi G, Kloppel G. Endocrine tumors of the gut and pancreas tumor biology and classification. *Neuroendocrinology* 2004; 80 Suppl 1:12-5.: 12-15.
- Rindi G, Villanacci V, Ubiali A. Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion* 2000; 62 Suppl 1:19-26.: 19-26.
- Rini BI. Sorafenib. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 453-461.
- Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2435-2444.
- Singer G, Oldt R, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih M. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 19;95: 484-486.
- Solcia E, Klöppel G, Sobin LH. WHO Histological Typing of Endocrine Tumours. Berlin, Heidelberg: Springer, 2000.
- Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)* 2005; 41: 773-784.

Takaki R, Ono J, Nakamura M, Yokogawa Y, Kumae S, Hiraoka T, Yamaguchi K, Hamaguchi K, Uchida S. Isolation of glucagon-secreting cell lines by cloning insulinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986; 22: 120-126.

Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, Katalinic A, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003; 52: 706-712.

Tannapfel A, Vomschloss S, Karhoff D, Markwarth A, Hengge UR, Wittekind C, Arnold R, Hörsch D. BRAF gene mutations are rare events in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 256-260.

van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den OA, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Sampson JR, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, Ali JB, Ward S, Green AJ, Yates JR, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 1997; 277: 805-808.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116: 855-867.

WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon (France): IARC Press, 2000.

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109.

Yajnik V, Paulding C, Sordella R, McClatchey AI, Saito M, Wahrer DC, Reynolds P, Bell DW, Lake R, van den HS, Settleman J, Haber DA. DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. *Cell* 2003; 112: 673-684.



Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, Latich I, Modlin IM. The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer* 2005; 104: 2292-2309.

## G Anhang

### 1. Verzeichnis der Abkürzungen

- 5-HIAA: 5-Hydroxyindolessigsäure  
ABC: Avidin-Biotin-Complex  
APS: Ammoniumperoxodisulfat  
BSA: bovines Serumalbumin  
C3G: *Guanine nucleotide-releasing factor 2*  
cAMP: *Cyclic adenosine monophosphate*  
c-Myc: *Cellular homologue of avian myelocytomatosis virus oncogene*  
CREB: *cAMP response element-binding protein*  
CRK: *CT10 sarcoma oncogene cellular homolog*  
DAB: 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat  
DMSO: Dimethylsulfoxid  
ECL: *enhanced chemoluminescence*, verstärkte Chemolumineszenz  
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure  
Elk-1: *Ets domain protein*  
EPAC: *Exchange protein activated by cAMP*  
Erk: Extrazellulär signalregulierte Kinase  
FCS: *fetal calf serum*, fetales Kälberserum  
GAP: GTPase aktivierende Proteine  
GEF: *Guanine nucleotide exchange factor*  
GEP-NETs: gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore  
GRB2: *Growth factor receptor-bound protein 2*  
HCl: Salzsäure  
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure  
HPR: *horse radish peroxidase*, Meerrettichperoxidase  
IMP: *impedes mitogenic signal propagation*  
JNK: Jun N-terminale Kinase  
KSR: Kinase Suppressor von Ras  
MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase  
MEK: MAPK/Erk Kinase  
MEKK: MAPK/Erk Kinase Kinase

MP-1: MEK Partner 1

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid

NaOH: Natronlauge

NETs: neuroendokrine Tumore

P53: Tumorsuppressorgen

PBS: *Phosphate buffered saline*, Phosphatpuffer

PI3K: Phosphatidylinositol 3 Kinase

PKA: Proteinkinase A

PKC: Proteinkinase C

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

Rap1: Ras proximate 1

RasGRP: *Ras guanyl nucleotide releasing protein*

Rb: Retinoblastoma Gen, ein Tumorsuppressorgen

RT: Raumtemperatur

RTK: Rezeptor Tyrosinkinase

SDS-PAGE: *sodium dodecylsulfate- polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Sos: *Son of sevenless guanine nucleotide exchange factor*

TBS: *TRIS buffered saline*, TRIS-Puffer

TEMED: N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin

TRIS: Tris(hydroxymethyl)-amino-Methan

## 2. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schema der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade.....	11
Abbildung 2: Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade bei der Regulierung von Wachstum, Differenzierung und Proliferation. ....	12
Abbildung 3: Die immunhistochemische ABC-Methode. ....	24
Abbildung 4: Festgelegte interne Standards für die semiquantitative Auswertung der mit Rap1- und B-Raf-Antikörpern immunhistochemisch angefärbten GEP-NETs. ....	26
Abbildung 5: Versuchsaufbau MTT-Assay.....	29
Abbildung 6: Normale Mikroanatomie der Rap1- und B-Raf Expression.....	34
Abbildung 7: Die Expression von Rap1 und B-Raf in Insulinomen. ....	36
Abbildung 8: Die Expression von Rap1 und B-Raf in Serotonin-produzierenden NETs und Gastrinomen.....	38
Abbildung 9: Gal4-Elk1 abhängiger Luziferaseassay.....	40
Abbildung 10: Inhibition und Proliferation der neuroendokrinen Tumorzelllinien BON und In-R1-G9 durch BAY 43-9006.....	41
Abbildung 11: Der Effekt von BAY 43-9006 auf MAPK-Signaltransduktion in BON-Zellen. ....	43
Abbildung 12: Die differente Signaltransduktion zu ERK durch unterschiedliche B-Raf-Mutanten. ....	50

## 3. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Gastrointestinale neuroendokrine Tumorsyndrome .....	2
Tabelle 2: Genetische Syndrome, die mit einer erhöhten Inzidenz neuroendokriner Tumoren (NET) assoziiert sind.....	8
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper für die Westernblots.....	20
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper bei der immunhistochemischen Anfärbung der GEP-NETs.....	21
Tabelle 5: Semi-qualitative Bewertung von Rap1 und B-Raf in GEP-NETs.....	35
Tabelle 6: Zelltypen, Hauptprodukte und Syndrome von GEP-NETs. ....	46

#### 4. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Becker, Bertalanffy, Bien, Brück, Christiansen, Daut, Efe, Eilers, Engelhardt-Cabillic, Feuser, Freyschmidt-Paul, Garrel v., Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Görg, Gotthardt, Gotzen, Grimm, Griss, Gudermann, Hamer, Happle, Hellinger, Hertl, Hesse, Hörsch, Hörster, Hofbauer, Hofmann, Jungclas, Kalder, Kann, Kern, Klenk, Klose, Köhler, König, Köster, Koolman, Kowalski, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhlmann, Lang, Langer, Lemke, Lippert, Löffler, Lohoff, Max, Maisch, Mann, Meinhardt, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumann, Neumüller, Nies, Oertel, Petermann, Pfeiffer, Rager, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röhrenbeck, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schueffel, Schultz, Seitz, Stehl, Steininger, Stief, Stiletto, Suske, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zielke

## 5. Publikationen

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Karhoff D., Sauer S., Schrader J., Arnold R., Fendrich V., Bartsch D., Hörsch D. 2007. Rap1/B-Raf signaling is activated in neuroendocrine tumors of the digestive tract and raf kinase inhibition constitutes a putative therapeutic target. *Neuroendocrinology* 2007, 85:45-53

Tannapfel A., Vomschloss S., Karhoff D., Markwarth A., Hengge U., Wittekind C., Arnold R., Hörsch D. 2005. BRAF gene mutations are rare events in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol.* 2005 Feb; 123(3): 256-60

## **6. Danksagung**

Herrn PD Dr. Dieter Hörsch möchte ich für die Vergabe dieses interessanten Themas und für seine schnellen Hilfestellungen bei Organisationsproblemen danken. Er stand mir als Doktorvater jederzeit als Ansprechpartner beratend zur Seite und hatte viele wertvolle Tipps und Anregungen für mich.

Bei Frau Dorothee Bonnorden, Frau Eleni Archontidu-Aprin, Herrn Harald Schmidt, Herrn Martin Schäfer und Dr. Jörg Schrader bedanke ich mich für die intensive Einarbeitung in die Methoden und kontinuierliche und geduldige Bereitschaft, Fragen zu beantworten.

Ich danke Johannes Steiff für die vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen zum Thema und zur Gestaltung. Für die Motivation und geduldige Unterstützung während der Arbeit danke ich Nicola Möller und Johannes Steiff.

Besonders danken möchte ich schließlich meinen Eltern, die mich stets mit tiefem Vertrauen unterstützt, motiviert und gefördert haben.