

Molekulare Charakterisierung des Effekts von zielgerichteten  
Therapien in pankreatischen Neuroendokrinen Tumoren und  
Tumor-assoziierten Makrophagen *in vitro* und *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg



vorgelegt von

Frau Maren Juliane Egidi (M.Sc.)

geb. am 26. August 1988 in Lich



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15.04.2014 bis 31.03.2015 an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin, Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel und vom 01.04.2015 bis 30.09.2018 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Medizin, Klinik für Innere Medizin I unter der Leitung von Prof. Dr. med. Patrick Michl angefertigt.

Gutachter

Prof. Dr. rer.nat. Stefan Hüttelmaier

Prof. Dr. med. Patrick Michl

Prof. Dr. rer.nat. Malte Buchholz

Promotionsgesuch eingereicht: 11. November 2019

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01. Juli 2020



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Pankreatische Neuroendokrine Tumore des Pankreas.....	6
1.1.1 Molekulare Pathogenese von Pankreatischen Neuroendokrinen Tumoren.....	6
1.1.2 Klinik & Symptomatik .....	7
1.1.3 Diagnose und Therapiemöglichkeiten .....	8
1.2 Mausmodelle zur Erforschung von PNETs .....	12
1.3 Resistenzmechanismen in der Krebstherapie.....	14
1.4 Die Bedeutung des Tumormikromilieus in der Krebstherapie .....	16
1.4.1 Tumorassoziierte Makrophagen.....	17
1.5 Ziel der Arbeit / Fragestellung .....	20
<b>2 Material .....</b>	<b>21</b>
2.1 Geräte.....	21
2.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme .....	22
2.3 Kits .....	23
2.4 Oligonukleotidsequenzen .....	24
2.5 Antikörper.....	25
2.6 Zelllinien .....	26
2.6.1 Zusätze für die Zellkultur .....	26
2.7 Mäuse.....	27
2.7.1 Tierhaltung .....	27
2.8 Software .....	27
<b>3 Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.1 Zellkultur.....	28
3.1.1 Zellkultivierung .....	28
3.1.2 Kryokonservierung.....	28
3.1.3 Zellzahlbestimmung .....	29
3.1.5 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren.....	29
3.1.6 Isolation und Kultivierung primärer muriner Makrophagen.....	30
3.1.8 Isolation muriner $\beta$ -Tumorzelllinien aus der RIP1Tag2-Maus.....	31
3.1.9 Isolation von Insulinomen aus der RIP1Tag2-Maus.....	32
3.2 Funktionelle Analysen.....	33
3.2.1 Zellviabilität .....	33
3.2.2 Bestimmung der Zellproliferation mittels Zellzählung.....	33
3.2.3 Bestimmung der Zellproliferation mittels Click-iT™ EdU .....	34
3.2.3 Metabolische Analyse mittels der Seahorse XF Technologie.....	34
3.3 Proteinbiochemische Methoden .....	36
3.3.1 Proteinlysate aus der Zellkultur und Proteinbestimmung .....	36
3.3.2 Proteinlysate aus Paraffin-eingebetteten Organen und Proteinbestimmung .....	37

---

3.3.3 Proteinanalyse .....	38
3.3.3.1 Diskontinuierliche Auftrennung von Proteinen .....	38
3.3.3.2 Western Blot und Detektion.....	39
3.4 Durchflusszytometrie .....	41
3.4.1 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse .....	41
3.4.2 Durchflusszytometrische Apoptosedetektion .....	42
3.5. Molekularbiologische Methoden.....	43
3.5.1 RNA-Isolation aus der Zellkultur .....	43
3.5.2 RNA-Isolation aus Paraffin-eingebetteten Organen .....	43
3.5.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	44
3.5.3 cDNA-Synthese.....	44
3.5.4 Quantitative RT-PCR.....	44
3.6 Arbeiten mit dem transgenen RIP1Tag2-Mausmodell.....	45
3.6.1 Genotypisierung .....	45
3.6.2 Versuchsaufbau und Abbruchkriterien.....	46
3.6.3 Medikamenten-Applikation per Schlundsonde .....	47
3.6.4 Blutentnahme.....	47
3.6.5 Aufarbeitung des Gewebes zur immunhistologischen Untersuchung.....	47
3.6.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Immunhistochemie .....	48
3.6.7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	48
3.7 Statistische Auswertung .....	49
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
4.1 Effekte von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Viabilität von BON-1- und QGP-1-Zellen .....	50
4.2 Einfluss von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Proliferation von BON-1- und QGP-1-Zellen .....	52
4.3 Einfluss von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf den Metabolismus von BON-1- und QGP-1-Zellen .....	58
4.3.1 Effekt von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die mitochondriale Atmung in BON-1- und QGP-1-Zellen.....	58
4.4 Isolation von murinen $\beta$ -Tumorzellen.....	63
4.4.1 Charakterisierung der HMEG-Zelllinien .....	63
4.4.2 Regorafenib senkt die Viabilität von $\beta$ -Tumorzellen zeit- und dosisabhängig .....	65
4.4.3 Einfluss von Regorafenib auf die Proliferation .....	66
4.5 Effekte von Regorafenib im RIP1Tag2-Mausmodell.....	71
4.5.1 Therapieschema im RIP1Tag2-Mausmodell .....	72
4.6 Effekte von Regorafenib auf die Tumorentstehung.....	73
4.6.1 Überlebenskurve und Gewichtsverlauf .....	73
4.6.2 Anzahl und Größe der Tumore .....	74
4.6.3 Einfluss von Regorafenib auf die Proliferation von Insulinomen .....	76
4.6.4 Einfluss von Regorafenib auf die Blutgefäße .....	78
4.6.5 Effekte von Regorafenib auf den VEGF-A-Gehalt im Serum und Pankreasgewebe der RIP1Tag2-Mäuse.....	79
4.7 Effekte von Regorafenib auf das Tumorwachstum.....	80

4.7.1 Überlebenskurve und Gewichtsverlauf .....	80
4.7.2 Anzahl und Größe der Tumore .....	82
4.7.3 Einfluss von Regorafenib auf die Proliferation von Insulinomen .....	83
4.7.4 Einfluss von Regorafenib auf die Blutgefäße .....	84
4.7.5 Effekte von Regorafenib auf den VEGF-A-Gehalt im Serum und Pankreasgewebe der RIP1Tag2-Mäuse .....	85
4.8 Einfluss von Regorafenib auf die Invasivität der Insulinome in der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum .....	87
4.8.1 Einfluss von Regorafenib auf die Cathepsin B-Expression .....	89
4.9 Entwicklung von Resistenzmechanismen unter der Regorafenib-Therapie <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	92
4.9.1 Expressionsanalyse von überlebensfördernden Proteinen unter dem Einfluss von Regorafenib in BON-1- und QGP-1- Zellen <i>in vitro</i> .....	92
4.9.2 Expression von Bcl-2 in den murinen $\beta$ -Tumorzellen .....	94
4.9.3 Einfluss von Regorafenib auf die Bcl-2-Expression in der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum .....	96
4.9.4 Effekte der Kombinationstherapie von Regorafenib und dem Bcl-2-Inhibitor ABT-199 <i>in vitro</i> .....	98
4.10 Einfluss von Regorafenib auf Makrophagen und das Tumormikromilieu <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	103
4.10.1 Einfluss von Regorafenib auf die Viabilität von primären murinen Makrophagen <i>in vitro</i> .....	103
4.10.2 Einfluss von Regorafenib auf die Viabilität in primären Makrophagen <i>in vitro</i> .....	105
4.10.3 Der CSF1-Rezeptor als eine mögliche Zielstruktur von Regorafenib in Makrophagen .....	106
4.11 Einfluss von Regorafenib auf Makrophagen in der Tumorentstehung .....	107
4.12 Einfluss von Regorafenib auf Makrophagen während des Tumorwachstums .....	110
4.13 Einfluss von Regorafenib auf die Entstehung eines tumorfördernden Mikromilieus 112	
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>114</b>
5.1 Effekte von Regorafenib <i>in vitro</i> .....	114
5.2 Regorafenib steigert die Proliferation und Invasivität <i>in vivo</i> .....	118
5.3 Regorafenib übt einen geringen Einfluss auf Blutgefäße aus .....	120
5.4 Regorafenib fördert die Entstehung eines tumorfördernden Mikromilieus .....	123
5.5 Resistenzmechanismen und mögliche Kombinationstherapien .....	125
5.6 Limitationen des Mausmodells und des Studiendesigns .....	127
<b>Zusammenfassung / Abstract .....</b>	<b>131</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>134</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>145</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>149</b>

---

Tabellenverzeichnis .....	152
Lebenslauf .....	153
Danksagung.....	154
Eidesstattliche Erklärung.....	156



# 1 Einleitung

Krebs zählt nach den Herz-Kreislaufkrankungen zu der zweithäufigsten Todesursache weltweit. Im Jahr 2015 waren 17,2 Millionen Menschen weltweit an Krebs erkrankt, 8,9 Millionen Menschen sind an einer Krebserkrankung gestorben. Die häufigste krebsbedingte Todesursache war bei den Männern Prostatakrebs, bei Frauen Brustkrebs. Die Inzidenz von Krebserkrankungen nahm zwischen 2006 und 2016 insgesamt um ein Drittel zu (Fitzmaurice *et al.* 2018). Dies liegt an dem steigenden Alter der Weltbevölkerung, dem Bevölkerungswachstum und den besseren Diagnosemöglichkeiten. Aufgrund der heterogenen Tumorbiologie, dem unterschiedlichen Zeitpunkt der Diagnose und den verschiedenen effektiven Therapiemöglichkeiten variiert die 5-Jahresüberlebensrate zwischen 90% für das Prostata- und Hodenkarzinom und weniger als 20% bei Leber-, Lungen und Bauchspeicheldrüsenkrebs.

Hanahan und Weinberg haben im Jahr 2000 in ihrer Veröffentlichung "*Hallmarks of Cancer*" die bedeutendsten Eigenschaften und die Komplexität von Krebszellen beschrieben. Darin gehen sie davon aus, dass alle Krebszellen sechs charakteristische Eigenschaften, sog. "*Hallmarks*" besitzen, die es ihnen ermöglichen, vom gesunden Gewebe in Krebszellen zu transformieren (Hanahan und Weinberg 2000). Diese lauten:

- Hochregulation von Wachstumsfaktoren
- Resistenz gegenüber anti-proliferativen Faktoren
- Umgehung der Apoptose
- Unlimitiertes Replikationspotential
- Stimulation von Blutgefäßen zur Versorgung des Tumors
- Invasion und Metastasierung

Bei vielen Tumorentitäten konnten in den vergangenen Jahren deutliche Fortschritte bei der Erforschung der Pathogenese und Identifikation molekularer Therapieansätze erzielt werden. Bei den vergleichsweise seltenen Neuroendokrinen Tumoren der Bauchspeicheldrüse hingegen sind die Erkenntnisse zu Pathogenese und molekularen Therapieoptionen noch rudimentär. Es ist daher zwingend notwendig, die komplexe Biologie der Tumore besser zu verstehen, mögliche Resistenzmechanismen zu identifizieren und weitere molekulare Therapieoptionen zu entwickeln.

## 1.1 Pankreatische Neuroendokrine Tumore des Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse übernimmt als exokrines und endokrines Drüsenorgan vielfältige Aufgaben. Während die wichtigste Funktion des exokrinen Pankreas in der Produktion und Abgabe von Verdauungsssekreten liegt, dient das endokrine Pankreas insbesondere durch Insulin und Glukagon zur Regulation des Blutzuckerspiegels. Tumore des exokrinen Pankreas entstehen aus dem Drüsengewebe oder Gangsystem. Maligne Veränderungen des endokrinen Pankreas entwickeln sich hingegen aus den hormonproduzierenden endokrinen Zellen. Dabei stellt das Pankreatisch duktales Adenokarzinom (PDAC) mit etwa 95% im Vergleich zu 5% in Pankreatisch Neuroendokrinen Tumoren (PNET) das weitaus häufigere und aggressivere Pankreaskarzinom dar (Zhang *et al.* 2016).

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf den neuroendokrinen Tumoren des Pankreas liegt, sollen diese im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

Neuroendokrine Tumore (NET) sind eine heterogene Tumorentität, die ihren Ursprung im Neuroektoderm haben, aber auch endokrine Marker aufweisen können. NETs treten primär im Gastrointestinaltrakt, aber auch im Bereich der Lunge und des Thymus auf. Pankreatische NET machen etwa 7% aller NETs aus (McKenna und Edil 2014, Lawrence *et al.* 2011, Yao *et al.* 2007).

PNETs stellen eine sehr seltene Tumorentität dar, die nur etwa 1-2% der pankreatischen Neoplasien ausmacht. Die Inzidenz liegt bei ca. 0,43/ 100.000/ Jahr, welche sich jedoch insbesondere durch bessere Diagnosemöglichkeiten in den letzten 30 Jahren verdoppelt hat (Liu *et al.* 2013, Scherübl *et al.* 2013, Maxwell *et al.* 2016).

### 1.1.1 Molekulare Pathogenese von Pankreatischen Neuroendokrinen Tumoren

In der Regel erscheinen PNETs spontan, nur etwa 10% sind auf genetische Syndrome, wie die Multiple Endokrine Neoplasie Typ1 oder Typ 2 (MEN-1 bzw. MEN-2) oder das von-Hippel-Lindau-Syndrom zurückzuführen (McKenna und Edil 2014).

In einer umfangreichen Analyse von Jiao und seinen Kollegen wurden exomweite Analysen an Patienten mit sporadisch aufgetretenen gut-differenzierten PNETs durchgeführt (Jiao *et al.* 2011). Innerhalb dieser Patienten konnten somatisch inaktivierende Mutationen zu 44% im *MEN-1*-Gen, zu 43% im DAXX/ATRX-Komplex und nur zu 15% in Genen des kanonischen mTOR/AKT-Signalwegs identifiziert werden (Jiao *et al.* 2011).

Des Weiteren konnte in einer genomweiten Sequenzierstudie mit 100 PNET-Patienten die molekulare Pathogenese weiter charakterisiert und die Aussagen von Jiao bekräftigt werden. Im Rahmen dieser Studie konnten sie zeigen, dass in PNET-Patienten die vier häufigsten Gruppen von Alterationen Muta-

tionen im DNA-Reparaturmechanismus (11%), im Chromatin-Remodeling (10%), in der Telomerase-unabhängigen Telomerverlängerung (ALT; 32%) und dem mTOR-Signalweg (12%) darstellen (Missiaglia *et al.* 2010, Marinoni *et al.* 2014, Scarpa *et al.* 2017).

Beim *MEN-1*-Gen handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, das als Histonmodulator im Zellkern lokalisiert ist und neben der Chromatin-Modulation an der Zellzyklus-Regulation und an der Beseitigung von DNA-Schäden beteiligt ist. Die Mutationen des *MEN-1*-Gens führen in der Regel zu einer Trunkierung und Inaktivierung des Proteins. Mutationen im DAXX/ATR-X-Komplex resultieren in chromosomaler Instabilität und einem Telomerase-unabhängigen Mechanismus der Telomerverlängerung (ALT) (Marinoni *et al.* 2014, Di Domenico *et al.* 2017).

Diese Studien verdeutlichen, dass PNETs im Vergleich zum PDAC ein deutlich geringeres Mutationspektrum aufweisen und diese Mutationen zudem vor allem viele epigenetische Faktoren betreffen (Scarpa *et al.* 2017, Jiao *et al.* 2011, Jones *et al.* 2008).

### 1.1.2 Klinik & Symptomatik

PNETs werden entsprechend ihrer Fähigkeit Hormone zu sekretieren in funktionale und nicht-funktionale Tumore eingestuft, wobei 90% der Tumore nicht-funktional sind (McKenna und Edil 2014). Funktionale Tumore werden dabei nach dem Hormon benannt, das sie sezernieren und entsprechende hormonspezifische Symptome hervorrufen. Die häufigsten funktionalen PNETs sind das Insulinom (ausgehend von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas), Glucagonom ( $\alpha$ -Zellen), das Somatostatinom ( $\delta$ -Zellen), das Gastrinom und VIPom. Das Insulinom tritt mit 75% am häufigsten auf; 90% dieser Tumore sind gutartig (Halfdanarson *et al.* 2008, Chen *et al.* 2012, Falconi *et al.* 2016). Funktionale Tumore werden aufgrund der hormonspezifischen Symptome deutlich früher diagnostiziert als Tumore, die klinisch nicht auffällig sind. Bei 60% der Patienten mit nicht-funktionalen Tumoren ist der Tumor bei Diagnosestellung bereits metastasiert (Franko *et al.* 2010, McKenna und Edil 2014). Daher liegt das Gesamtüberleben bei Patienten mit funktionalen Tumoren bei 54 Monaten im Gegensatz zu nicht-funktionalen Tumoren mit nur 26 Monaten (Halfdanarson *et al.* 2008).

PNETs werden nach Angaben der WHO aus dem Jahr 2010 histopathologisch in drei Stufen klassifiziert. Diese Einstufung, das sogenannte Grading (G1-G3), basiert auf dem mitotischen bzw. Ki-67-Index. Tumore mit einem Ki-67-Index von 0-2% werden als G1 eingestuft, sind gut differenziert und die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten liegt bei 85%. Bei einem Ki-67-Index von 2-20% werden die Tumore als G2 eingestuft. Diese Tumore sind ebenfalls gut differenziert und die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 78%. G1- und G2-Tumore machen 90% aller Tumore aus. G3-Tumore zeichnen sich durch eine Ki-67-Rate von über 20% aus und sind oftmals schlecht differenziert (McKenna und Edil 2014). Eine Studie von Childs *et al.* konnte jedoch zeigen, dass Tumore, die einen hohen Ki-67-Index aufweisen, ein besseres

Ansprechen auf eine Chemotherapie aufweisen als geringer proliferierende Tumore (Childs *et al.* 2016). Hoch proliferative, schlecht-differenzierte Tumore stellen nur eine kleine Gruppe der PNETs dar und werden meist als NEC (*Neuroendocrine carcinoma*) G3 klassifiziert (Rindi und Klöppel 2004, Scherübl *et al.* 2011). Im Gegensatz zu den gut-differenzierten Tumoren konnte in einer Studie gezeigt werden, dass 100% der analysierten NEC-Tumore eine Bcl-2-Überexpression und eine veränderte oder gar abwesende Expression der Tumorsuppressorgene p53 und RB (Retinoblastom) aufweisen (Yachida *et al.* 2012). In der Nordic-NEC-Studie konnte auf Basis der Ansprechrate auf Chemotherapien ein erweiterter Cut-off-Wert von <55% für Ki-67 identifiziert werden. Patienten mit einem Ki-67-Index unter 55% sprachen schlechter an, hatten aber eine bessere Überlebensrate als Patienten mit einem Ki-67-Index größer als 55% (Sorbye *et al.* 2013). Seit 2017 unterscheidet die WHO demnach auch noch eine weitere Gruppe; die noch gut differenzierten NET, die einen Ki-67-Index größer 20% aufweisen, jedoch nicht zu den undifferenzierten NECs gehören (Kim *et al.* 2017, Kruljac und Pape 2017, Klöppel 2019).

### 1.1.3 Diagnose und Therapiemöglichkeiten

Funktionale Tumore werden durch die Hormon-spezifischen Symptome früher erkannt als nicht-funktionale Tumore. Patienten mit einem Insulinom leiden oftmals unter Hypoglykämie-Symptomen bis hin zu neurologischen Ausfällen mit Bewusstseinsstörungen und Bewusstlosigkeit (Falconi *et al.* 2016). Zur Diagnose des Insulinoms wird ein Fastentest über 48h durchgeführt, bei dem im Falle eines positiven Befunds ein Blutzuckerspiegelabfall mit einem gleichzeitigen C-Peptid-Anstieg nachgewiesen werden kann. Dies deutet auf eine autonome, von der Blutzuckerkonzentration unabhängige Insulinsekretion hin. Neben dieser Methode können PNETs ebenfalls mit Hilfe der Sonographie, der Computertomographie, der Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie anhand radiomarkierter Somatostatin-Analoga und der Positronenemissionstomographie diagnostiziert werden. Da viele der PNETs nicht funktional sind und somit auch keine Hormon-spezifischen Symptome und Schmerzen hervorrufen, werden diese Tumore erst sehr spät erkannt und sind bei der Diagnose bereits metastasiert. Eine chirurgische Resektion ist daher nur noch sehr selten möglich und das mittlere Überleben liegt bei nur noch 24 Monaten (Halfdanarson *et al.* 2008, Capdevila und Tabernero 2011, Falconi *et al.* 2016). Die systemische Therapie ist notwendig, um die Symptome zu kontrollieren, das Tumorwachstum zu senken oder gar zu stoppen, mit dem Ziel, die Lebensqualität zu verbessern und das Überleben zu verlängern.

Die Therapie pankreatischer Neuroendokriner Tumore richtet sich u.a. nach folgenden Kriterien: Funktionalität, Differenzierungsgrad, Proliferationsindex und Somatostatinrezeptor (SSTR)-Status (Pavel 2018). Somatostatin-Analoga können nachweislich die Hormonsekretion um meist 70-80% senken, üben jedoch nur einen geringen Effekt von 5-10% auf die Proliferation aus (Capdevila und Tabernero 2011).

Immer größeren Einsatz in der Behandlung von PNETs haben daher sogenannte „*targeted therapies*“. Wie in verschiedenen Studien bereits gezeigt wurde, treten Mutationen des mTOR-Signalweges zu 15% in PNET-Patienten auf (Jiao *et al.* 2011).

mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) ist eine Serin-Threonin-Kinase, die dem PI3K-AKT-Signalweg nachgeschaltet ist und über diverse Wachstumsfaktoren wie dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF: *epidermal growth factor*) und dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF: *insulin-like growth factor-1*) eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation, Motilität, Zellüberleben, Proteinsynthese, aber auch der Autophagie und der Regulation des zellulären Energiestatus spielt (Phan und Dave 2006, Paquette *et al.* 2018). Der mTOR-Signalweg spielt aber auch unter hypoxischen Bedingungen eine essentielle Rolle in der Bildung von neuen Blutgefäßen, mittels Translation und Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ : *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) und einer nachgeschalteten Aktivierung von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Land und Tee 2007).

Der mTOR-Inhibitor Everolimus, ein Rapamycin-Analogon, ist seit 2011 zur Behandlung von PNETs zugelassen. Everolimus bindet an den intrazellulären Rezeptor FKBP12 (*FK506-binding protein 12*) in der Nähe des katalytischen Zentrums von mTOR. Der daraus resultierende Komplex aus mTOR und dem Inhibitor verhindert die mTOR-Kinase-Aktivität (Atkins *et al.* 2009). In diversen präklinischen und klinischen Studien konnte die Wirksamkeit anhand des anti-proliferativen Effekts von Everolimus bestätigt werden (Yao *et al.* 2008, Yao *et al.* 2011). In der randomisierten doppel-geblindeten Phase 3 Studie (RADIANT 3) lag das progressionsfreie Überleben unter Everolimus-Therapie bei 16,7 Monaten im Vergleich zu 4,6 Monaten unter Placebo. Eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens konnte jedoch nur in weniger als 10% der Patienten nachgewiesen werden (Liu *et al.* 2013).

PNETs gehören nach derzeitigem Wissensstand zu den am meisten vaskularisierten Tumoren, die sich durch eine gesteigerte Expression entsprechender Wachstumsfaktoren, wie VEGF, IGF-1, PDGF (*Platelet-derived growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und TGF $\beta$  (*Transforming growth factor*  $\beta$ ) auszeichnen (Liu *et al.* 2013). Gut-differenzierte Tumore weisen hohe Expressionslevel von HIF1 $\alpha$  und VEGF sowie eine hohe Blutgefäßdichte auf, sodass davon ausgegangen wird, dass die Angiogenese insbesondere in der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielt (Couvelard *et al.* 2005, Klöppel *et al.* 2011). Weitere immunhistochemische Färbungen von malignen, gut-differenzierten PNETs konnten eine hohe Expression des VEGFR 1-2, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , c-KIT (Stammzelleffektor-Rezeptor) und des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*) aufzeigen (Couvelard *et al.* 2005, Casanovas *et al.* 2005, Inoue *et al.* 2002). Untersuchungen von Zhang *et al.* konnten zudem zeigen, dass die VEGF-Expression mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben (PFS: *progression free survival*) und einer höheren Metastasenrate korreliert (Zhang *et al.* 2007). Anti-angiogene Therapien stellen somit einen weiteren vielversprechenden Ansatz in der Behandlung pankreatisch neuroendokriner Tumore dar.

Der Multirezeptortyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib wurde im Jahr 2011 basierend auf der SUN 1111 Studie für die Behandlung von PNETs zugelassen (Raymond *et al.* 2011). Sunitinib übt über die Inhibierung diverser Rezeptortyrosinkinasen wie VEGFR1-3, c-KIT, PDGFR $\alpha$  und - $\beta$  und CSFR einen anti-proliferativen und anti-angiogenen Effekt aus (Mendel *et al.* 2003, Abrams *et al.* 2003). Sunitinib gehört zur Gruppe der sog. Typ I-Kinase-Inhibitoren, die reversibel die aktive Form der Kinase inhibieren. Nach dem Eintritt von Sunitinib in das Zytoplasma konkurriert es mit ATP an der ATP-Bindetasche der Rezeptoren, wodurch die intrazelluläre Kinasedomäne der Rezeptoren nicht mehr aktiviert wird und keine nachfolgenden Signalkaskaden erfolgen können (Delbaldo *et al.* 2011, Wu *et al.* 2015).

Im transgenen RIP1Tag2-Mausmodell konnte Sunitinib die Dichte der Endothelzellen um 75% senken, das Tumorwachstum hemmen und das Gesamtüberleben erhöhen (Pietras und Hanahan 2005).

#### 1.1.4 Der Multityrosinkinase-Inhibitor Regorafenib

Regorafenib ist ein „*small-molecule*“ Multityrosinkinase-Inhibitor, der sich durch ein zusätzliches Fluor-Atom im Zentrum des Phenylringes von Sorafenib unterscheidet und 2012 für die Behandlung des metastasierten Kolorektalkarzinoms zugelassen wurde. Als sog. Typ-II-Kinase-Inhibitor bindet Regorafenib reversibel außerhalb der ATP-Bindetasche an die inaktive Form der Kinase und hemmt somit die Aktivierung der Kinasedomäne und nachfolgende intrazelluläre Signalkaskaden (Wu *et al.* 2015). Durch die Inhibierung angiogener Kinasen (VEGFR1-3, TIE2), onkogener Kinasen (c-KIT, RET), stromaler Kinasen (PDGFR $\beta$ , FGFR-1) und intrazellulärer Kinasen (c-RAF/RAF-1, BRAF, BRAFV600E) beeinflusst Regorafenib das Tumorwachstum und -überleben, die Angiogenese sowie die Invasion und Migration (Goel 2018). In biochemischen Experimenten konnte der inhibierende Effekt von Regorafenib auf diverse beschriebene Zielstrukturen wie u.a. den VEGFR1-3, TIE2 und PDGFR $\beta$  nachgewiesen werden (Wilhelm *et al.* 2011). Diese Untersuchungen führten aber auch zu der Erkenntnis, dass Regorafenib bei einer Konzentration von bis zu 1 $\mu$ M keinen Effekt auf bedeutende Kinasen wie die der EGF- und IGF-Rezeptoren sowie MEK, ERK 1/2 und AKT hatte (Wilhelm *et al.* 2011).

Regorafenib wird in der Leber ausschließlich über Cytochrom P3A4 und UGT1A9 (*Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9*) metabolisiert, weshalb das erhöhte Risiko einer medikamenteninduzierten Leberschädigung besteht. Durch die Verstoffwechslung von Regorafenib entstehen zwei aktive Metabolite: M-2 (*N*-Oxid Metabolit, BAY 75-7495) und M-5 (*N*-Oxid/*N*-desmethyl Metabolit, BAY 81-8752). In Studien konnte gezeigt werden, dass beide Metabolite eine ähnliche Effizienz in der Inhibierung der beschriebenen Kinasen haben, wie die Ausgangssubstanz (Wilhelm *et al.* 2011, Zopf *et al.* 2016). Zudem konnte *in vitro* ein Effekt auf die Autophosphorylierung von VEGFR 2 und Tie2 in VEGF-Rezeptor-2-überexprimierenden NIH-3T3-Zellen bzw. Tie2-überexprimierenden CHO-Zellen nachgewiesen werden. Regorafenib inhibierte außerdem die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors und FGF-Rezeptors in PDGF bzw. FGF stimulierten Zellen (Wilhelm *et al.* 2011).

Darüber hinaus hat Regorafenib neben dem Effekt auf die Proliferation in 19 von 25 humanen Kolonkarzinomzelllinien, darunter SW620 (KRAS<sup>G12V</sup>) und Colo-205 (BRAF<sup>V600E</sup>), auch einen Effekt auf humane und lymphatische Endothelzelllinien (huVECs bzw. LEC) gezeigt (Schmieder *et al.* 2014). Innerhalb dieser Studien bestand keine Korrelation zwischen dem Mutationsstatus von u.a. KRAS und BRAF und dem Effekt auf die Proliferation (Schmieder *et al.* 2014).

Regorafenib konnte in, aus humanen Zelllinien abgeleiteten, *Xenograft*-Mausmodellen das Tumorstadium und die Angiogenese reduzieren. Das Wachstum der Colo-205 Zelllinie konnte beispielsweise bei einer Dosisbreite von 10-100mg/kg nach 14 Tagen um 75% reduziert werden (Wilhelm *et al.* 2011). In einem orthotopen Kolorektalkarzinom-Mausmodell konnte der inhibierende Effekt auf die Angiogenese, das Tumorstadium und die Ausbildung von Lebermetastasen weiter bekräftigt werden (Abou-Elkacem *et al.* 2013). Neben diesen beschriebenen Effekten hat Regorafenib auch immunmodulatorische Eigenschaften, indem es den CSF1-Rezeptor inhibiert, der bedeutende Funktionen in der Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Makrophagen besitzt (Kissel *et al.* 2017). In der Arbeit von Abou-Elkacem konnte zudem eine Reduktion infiltrierender Makrophagen in den Tumor durch Regorafenib belegt werden (Abou-Elkacem *et al.* 2013).

Die Zulassung für das metastasierte Kolonkarzinom erlangte Regorafenib 2012 auf Grundlage der CORRECT-Studie (Grothey *et al.* 2013). Dies war eine randomisierte, Placebo-kontrollierte, Doppelblindstudie mit Patienten, bei denen die Standardbehandlung keinen Effekt mehr gezeigt hat. In der Regorafenib-Gruppe konnte ein gesteigertes medianes Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben sowie eine bessere Kontrolle der Krankheit (Disease control rate) gegenüber der Placebo-Gruppe nachgewiesen werden. Die teils sehr starken Nebenwirkungen waren jedoch oftmals der limitierende Faktor in der Therapie mit Regorafenib. Am häufigsten trat dabei Müdigkeit und Diarrhöe auf. Dadurch musste in 20% der Patienten die Dosis reduziert und in 70% der Patienten die Behandlung abgebrochen werden (Grothey *et al.* 2013). Regorafenib ist zum derzeitigen Stand noch nicht für die Behandlung von pankreatisch neuroendokrinen Tumoren zugelassen. Dennoch läuft in den USA seit dem Jahr 2016 eine Phase-II-Studie, in der der Effekt von Regorafenib in Patienten mit metastasierten neuroendokrinen Tumoren untersucht werden soll (NCT02259725). Das Hauptziel dieser Studie liegt in der Evaluierung des progressionsfreien Überlebens der Patienten unter Regorafenib-Therapie.

## 1.2 Mausmodelle zur Erforschung von PNETs

Grundlegende Eigenschaften eines Medikaments wie die Wirksamkeit, Verträglichkeit und der Metabolismus müssen vor der Zulassung in präklinischen Studien neben Zellkultur-basierten Experimenten auch in Mausmodellen intensiv untersucht werden. Die Annahme, dass Tumorzellen alleine für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sind, konnte in vielen Studien widerlegt werden. Denn gerade die Kommunikation von Tumorzellen mit dem umliegenden Gewebe hat sich als ein bedeutender Faktor bei der Tumorprogression herausgestellt (Hanahan und Weinberg 2011, Quatromoni und Eruslanov 2012, Noy und Pollard 2014). Da die alleinige Erforschung in der Zellkultur nicht mehr ausreichend ist, haben die Untersuchungen im lebenden Organismus in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Dazu werden häufig *Xenograft*-Modelle in immundefizienten Mäusen eingesetzt. In diesem Modell kann der Effekt eines Medikaments auf das Tumorwachstum relativ einfach und in kurzer Zeit untersucht werden. Der große und limitierende Nachteil ist jedoch, dass die Mäuse ein nur sehr eingeschränkt funktionales Immunsystem aufweisen und die Interaktion von Tumorzellen und Immunzellen nicht angemessen erforscht werden kann (Becher und Holland 2006, Richmond und Su 2008).

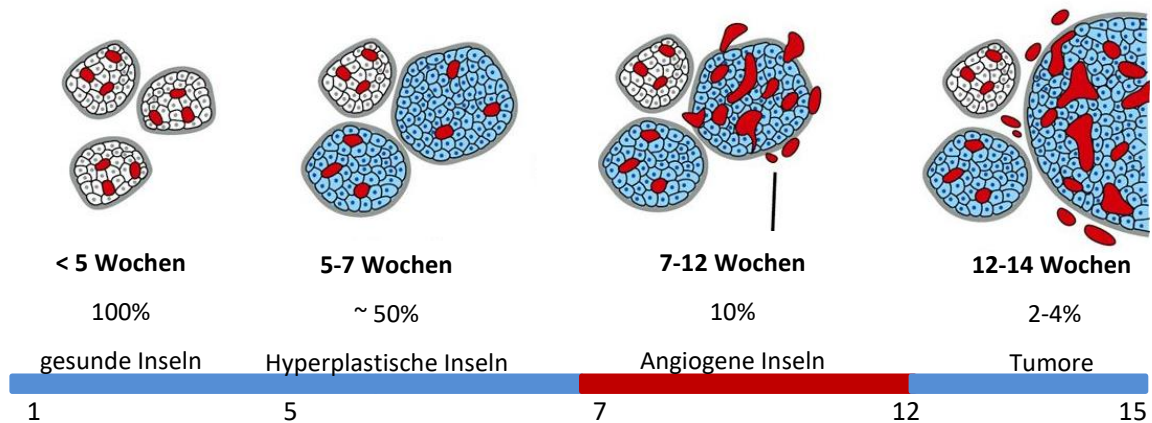
Um den Effekt von Therapien unter möglichst realistischen und physiologischen Bedingungen zu untersuchen, werden immer häufiger genetisch veränderte Mausmodelle eingesetzt. Ein geeignetes Mausmodell sollte die Tumorbiologie mit den entsprechenden tumor- und organspezifischen Mutationen dabei möglichst realistisch rekapitulieren. Die Vorteile dieses Modells liegen darin, dass tumor- und organspezifische Mutationen eingebracht und analysiert werden. Zudem entsteht der Tumor in einem existierenden und funktionalen Immunsystem, das die Kommunikation zwischen dem Tumor und dem Tumormikromilieu widerspiegelt. Ein weiterer Vorteil gegenüber den *Xenograft*-Modellen ist, dass verschiedene Stadien der Tumorprogression (Vorläuferstufen bis hin zu invasiven Karzinomen) untersucht werden können. Ein Nachteil der genetisch veränderten Mausmodelle ist hingegen die fehlende Heterogenität des Tumors, sodass die unterschiedlichen Tumoreigenschaften der Patienten nicht ideal untersucht werden können (Becher und Holland 2006, Richmond und Su 2008).

Für die Erforschung der PNETs stehen verschiedene Mausmodelle zur Verfügung, die sich hinsichtlich der genetischen Mutationen, der Tumorbiologie und ihrer entsprechenden phänotypischen Ausprägung stark unterscheiden (Yu 2016).

Das am häufigsten verwendete PNET-Mausmodell ist das bereits im Jahr 1985 von Douglas Hanahan und seinen Kollegen entwickelte transgene RIP1Tag2-Mausmodell, das die humane Situation von Beta-Zelltumoren sehr gut rekapituliert (Hanahan 1985, Folkman *et al.* 1989). Über DNA-Mikroinjektion wurde ein Genkonstrukt, bestehend aus dem *Rat-Insulin-Promotor* (RIP), dem *Enhancer Element Rat II Insulin*-Gen und dem für das Onkogen *Large T-Antigen* (LTag) kodierenden Abschnitt des Simian-Virus 40 (SV40), in die Keimbahn von Mäusen eingebracht. Die Expression des SV40 large T-Antigens unter



der Kontrolle des Insulinpromotors inhibiert die Funktion der Tumorsuppressorproteine p53 und Rb in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Dies führt innerhalb einiger Wochen zu einer stufenweisen, neoplastischen Transformation von gesunden Inselzellen zu invasiven Insulinomen (Abbildung 1). In den RIP1Tag2-Mäusen bilden sich ab der 5. Lebenswoche aus circa 50% der ursprünglich etwa 400 Langerhans-Inseln hyperplastische und dysplastische Vorläuferzellen, aus denen sich ab der 6. Lebenswoche 10% der hyperplastischen Inseln durch den sogenannten „*angiogenen Switch*“ zu gut vaskularisierten Inselzellhyperplasien entwickeln. Nach der 10. Lebenswoche kommt es in 2-4% der angiogenen Inseln zur Entstehung von soliden  $\beta$ -Zelltumoren (Insulinomen), die sich in gut differenzierte, benigne Adenome (etwa 2%) und etwa 0,5% dedifferenzierte, invasive Inselzellkarzinome unterteilen lassen. Durch die massive Insulinproduktion der  $\beta$ -Zellen ab der 14. Lebenswoche versterben die Mäuse im Rahmen einer Unterzuckerung (Hypoglykämie) spontan, wenn diese nicht mehr durch die Glukoneogenese der Leber kompensiert werden kann (Hanahan *et al.* 1985, Folkman *et al.* 1989, Perl *et al.* 1998, Du *et al.* 2007).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tumorprogression des transgenen RIP1Tag2-Mausmodells.**

Stufenweiser Prozess der Tumorentstehung von gesunden Insulinomen (bis 5. Woche), über hyperplastische (5-7. Woche) und angiogene Inseln (7.-12. Woche) zu invasiven Karzinomen (12.-14. Woche). Während der gesamten Tumorprogression steigt die Dichte der Blutgefäße (rot), wobei dieser Prozess maßgeblich durch den „*angiogenen Switch*“ ab der 7. Woche (roter Balken) hervorgerufen wird (modifiziert nach Weinberg; *Biology of Cancer* 2013).

Ein großer Vorteil des RIP1Tag2-Mausmodells ist die schnelle Tumorprogression. Aufgrund der guten Charakterisierung des Mausmodells kann innerhalb von nur 16 Wochen der Effekt auf unterschiedliche Tumorstadien von hyperplastischen Vorläuferzellen bis zu invasiven Insulinomen untersucht werden. Wie in dieser Arbeit beschrieben, kann dabei der Effekt von bestimmten Inhibitoren auf die frühe Tumorentstehung und das spätere Tumorstadium analysiert werden. Des Weiteren zeichnet sich dieses Mausmodell durch eine hohe Dichte an Blutgefäßen aus, sodass der Einfluss auf die Angiogenese und Vaskularisierung, der auch in humanen neuroendokrinen Pankreastumoren eine wichtige Rolle spielt, intensiv untersucht werden kann.

Ein Nachteil dieses Mausmodells ist hingegen, dass die RIP1Tag2-Mäuse infolge der Hypoglykämie spontan versterben und sich bis zu diesem Zeitpunkt, im Gegensatz zur humanen Situation, sehr wenige bis keine Metastasen ausgebildet haben (Perl *et al.* 1998, Raymond *et al.* 2012).

### 1.3 Resistenzmechanismen in der Krebstherapie

Die Resistenzentwicklung von Tumoren gegenüber Chemotherapie und gezielten molekularen Therapien (*molecular targeted therapy*) stellt eines der größten und herausforderndsten Probleme in der Behandlung von Tumoren dar. Das schlechte Ansprechen auf bestimmte Therapien kann dabei auf eine intrinsische Resistenz, bei der Tumorzellen bereits vor der Behandlung resistent sind, oder auf eine erworbene Resistenz zurückgeführt werden. Bei der erworbenen Resistenz sind die Tumorzellen zunächst sensitiv gegenüber der Therapie, können aber im Verlauf der Behandlung eine Resistenz entwickeln (Holohan *et al.* 2013). Zu den häufigsten Mechanismen zählen dabei die Aktivierung alternativer kompensatorischer Signalwege, eine erhöhte Reparatur von DNA-Schäden, die Umgehung der Apoptose durch den Anstieg überlebensfördernder Proteine oder der Prozess der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) (Holohan *et al.* 2013, Housman *et al.* 2014, Mansoori *et al.* 2017).

Die Bcl-2-Proteinfamilie spielt eine tragende Rolle im Zellüberleben und der Apoptose. Die Umgehung der Apoptose durch die Hochregulation der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine wurde bereits durch Hanahan und Weinberg als ein „Hallmark of Cancer“ beschrieben (Hanahan und Weinberg 2011).

Die Bcl-2-Familie besteht aus zwei pro-apoptotischen Proteinen (BAX und BAK), die durch 5 anti-apoptotische Proteine (u.a. Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1) gebunden und gehemmt werden. In Folge von zellulärem Stress, wie DNA-Schäden, kommt es durch die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und der Abgabe von Cytochrom C in das Zytoplasma zur Aktivierung der Caspasenkaskade und der Induktion des programmierten Zelltods (Leber *et al.* 2007, Youle und Strasser 2008, Ni Chonghaile und Letai 2011). In Tumoren verhindert die Überexpression der überlebensfördernden Bcl-2-Proteine hingegen das Absterben der Zellen. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass viele Tumore *per se* eine hohe Bcl-2-Expression aufweisen oder diese als Reaktion auf eine therapeutische Behandlung erhöht ist (Kirkin *et al.* 2004, Ni Chonghaile und Letai 2011). Ein gut beschriebener Signalweg, der durch die Induktion der Bcl-2-Proteine das Zellüberleben fördert ist der JAK/STAT (*Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription*)-Signalweg. Infolge der extrazellulären Bindung von Zytokinen an den JAK-Rezeptor kommt es zu einer intrazellulären Rezeptordimerisierung und Phosphorylierung von JAK, die wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Proteinen führt. Die gebildeten STAT-Dimere translozieren über Transportproteine in den Zellkern und können dabei die Expression von Genen beeinflussen, welche die Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren (Rawlings *et al.* 2004, Li 2008).

Die gezielte pharmakologische Inhibition der überlebensfördernden Bcl-2-Proteine durch sogenannte „BH3-mimetics“ stellt daher einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung von Tumoren dar. In soliden Tumoren, wie Brust- und Lungentumoren, sowie diversen hämatologischen Erkrankungen konnte die Wirksamkeit auf das Tumorstadium bereits nachgewiesen werden (van Delft *et al.* 2006, Vaillant *et al.* 2013, Lochmann *et al.* 2017). Zwei dieser BH3-Mimetika, die bereits in der Klinik Anwendung finden, sind ABT-263 (Navitoclax) und ABT-199 (Venetoclax). ABT-263 inhibiert Bcl-2 und Bcl-xL. Da Bcl-xL für die Differenzierung und das Überleben von Thrombozyten essentiell ist, führte die Behandlung mit ABT-263 in diversen Studien zu einer medikamenteninduzierten Thrombozytopenie (Tse *et al.* 2008, Gandhi *et al.* 2011, Soderquist und Eastman 2016). Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Weiterentwicklung zu ABT-199, wodurch ausschließlich Bcl-2, jedoch nicht Bcl-xL und Mcl-1, selektiv inhibiert wird. In verschiedenen Studien konnte ein deutlicher Effekt auf das Tumorstadium erzielt werden, ohne dabei Thrombozyten zu schädigen (Souers *et al.* 2013, Vandenberg *et al.* 2013). In Arbeiten von Lochmann *et al.* konnte ABT-199 in Zelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) *in vitro* die BIM-abhängige Apoptose induzieren und zu einem reduzierten Tumorstadium in Bcl-2-tragenden SCLC-*Xenograft*-Modellen führen (Lochmann *et al.* 2017). Des Weiteren konnte die Kombinationstherapie von ABT-199 und Tamoxifen in Brustkrebs-*Xenografts* eine gesteigerte Effektivität im Vergleich zur Tamoxifen-Einzelgabe erzielen (Vaillant *et al.* 2013).

Nach dem derzeitigen Wissenstand existieren zur Rolle der BIM-abhängigen Apoptose bzw. deren Modulation durch Bcl-2-Inhibitoren in PNETs noch keine Daten.

Ein weiterer bedeutender Mechanismus in der Ausbildung von Resistenzen stellt die Epithelial-Mesenchymale Transition von Tumorzellen dar. Durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten transformieren epitheliale Zellen in einen mesenchymalen Phänotyp und entwickeln dabei eine fibroblastenartige Morphologie, die eine erhöhte Motilität und Invasion ermöglicht. Dieser Transformationsprozess untersteht der Regulation diverser Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Proteinen induzieren und somit die Zytoskelettstruktur, die Zellpolarität, Zell-Zell-Kontakte und die Degradation der Extrazellulären Matrix (ECM: *extracellular matrix*) fördern (Holohan *et al.* 2013). Cathepsine stellen dabei einen wichtigen Regulator in der Degradation der ECM dar. Cathepsin B ist eine Cysteinprotease, die hauptsächlich in Lysosomen lokalisiert ist, aber auch an der Degradation der Extrazellulären Matrix beteiligt ist. Die erhöhte Expression von Cathepsin B wurde in invasiven und metastasierenden Tumoren, wie dem Kolorektal-, Brust- und Hautkrebs beschrieben. Dabei wurde ersichtlich, dass neben den Tumorzellen auch Stroma- und Immunzellen, wie z.B. Makrophagen, an der gesteigerten Tumorstadiumprogression und Metastasierung durch Cathepsin B beteiligt sind (Vasiljeva *et al.* 2006, Küster *et al.* 2008). In Studien von Gocheva *et al.* konnte gezeigt werden, dass Cathepsine während der Tumorstadiumprogression der  $\beta$ -Zell-Karzinogenese im RIP1Tag2-Mausmodell erhöht sind und ein gezieltes Ausschalten von Cathepsinen in diesen Mäusen zu einer gesenkten Proliferation, Angiogenese und Invasivität führt (Gocheva *et al.* 2006).

Eine weitere Studie konnte in diesem Mausmodell durch einen Pan-Cathepsin-Inhibitor ebenfalls eine Reduktion des Tumorwachstums nachweisen (Bell-McGuinn *et al.* 2007).

In der Therapie, die gegen die Ausbildung von neuen Blutgefäßen gerichtet ist, konnte des Weiteren die Hochregulation alternativer pro-angiogener Signalwege beobachtet werden. Durch die Rückbildung der Blutgefäße und der damit verbundenen Sekretion von VEGF bzw. der Hochregulation und Aktivierung von HIF1 $\alpha$  werden alternative Signalwege aktiviert. In dem RIP1Tag2-Mausmodell konnte nach einer VEGFR2-Inhibition zunächst ein Ansprechen auf die Therapie beobachtet werden, im Verlauf erfolgte jedoch ein erneutes Wachstum des Tumors. In diesen Tumoren konnten dabei erhöhte Spiegel des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2 (FGF2: *Fibroblast growth factor 2*), von Angiopoietin und von Ephrinen auf mRNA-Ebene ermittelt werden. Die Hypothese, dass FGF2 ein potentieller Kompensationsmechanismus ist, konnte anhand eines langsameren Tumorwachstums unter der Kombinationstherapie von VEGFR- und FGF-Inhibitoren im Vergleich zur Einzelgabe bestätigt werden. Ferner stellen die Rekrutierung vaskulärer Progenitorzellen und pro-angiogener Monozyten aus dem Knochenmark, sowie eine gesteigerte Auskleidung von Blutgefäßen mit Perizyten weitere Resistenzmechanismen unter anti-angiogenen Therapien dar (Bergers *et al.* 2008).

Der Einfluss des Tumormikromilieus, bestehend u.a. aus Fibroblasten, Endothel- und Immunzellen, nimmt somit ebenfalls eine sehr bedeutende Rolle in der Ausbildung von Resistenzmechanismen ein und wird im folgenden Kapitel detaillierter beschrieben.

## 1.4 Die Bedeutung des Tumormikromilieus in der Krebstherapie

Zu Beginn der Tumorforschung lag der Fokus auf der Untersuchung und Zerstörung der Tumorzellen. Es zeigte sich jedoch immer häufiger, dass das Tumorwachstum innerhalb eines komplexen Netzwerks aus Epithelzellen, Fibroblasten, Perizyten, Blut- und Lymphgefäßen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und infiltrierenden Immunzellen stattfindet. Die Interaktion von malignen und nicht malignen Zellen stellt zusammen das Tumormikromilieu (TME: *tumor microenvironment*) dar. Auf Grundlage vieler Studien konnte gezeigt werden, dass somit neben den Tumorzellen auch weitere Zelltypen an dem Tumorwachstum, der Invasion und Metastasierung beteiligt sind (Hanahan und Weinberg 2011, Quatromoni und Eruslanov 2012, Noy und Pollard 2014). Die nicht malignen Zellen des TME üben dabei oft eine tumorfördernde Funktion während aller Stadien der Tumorprogression aus, wobei die Effekte der infiltrierenden Immunzellen abhängig von dem Subtyp, der Tumorentität und des Patienten stark variieren können (Hanahan und Coussens 2012).

Durch die Erkenntnis, dass Immunzellen maßgeblich an der Tumorprogression, der Angiogenese und auch der medikamentenvermittelten Resistenz beteiligt sind, wurde die Bedeutung des Immunsystems

und insbesondere dessen Umgehung von Tumorzellen von Hanahan und Weinberg als das "*7th hallmark of cancer*" ergänzt (Hanahan und Weinberg 2011, Qian und Pollard 2010).

Die Immunzellen umfassen eine sehr heterogene Gruppe, die aus Makrophagen, Dendritischen Zellen, Mastzellen, NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten besteht, wovon die Makrophagen die größte Gruppe der Leukozytenpopulation ausmachen (Abbas *et al.* 2011). Makrophagen sind eine heterogene Population von ausdifferenzierten, myeloischen Zellen, die von zirkulierenden monozytären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammen und unter bestimmten Stimuli wie dem *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) oder VEGF in den Tumor einwandern (Quatromoni und Eruslanov 2012). Obwohl PNETs im Vergleich zum PDAC ein weniger ausgeprägtes Tumorstroma aufweisen, konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Infiltration von tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) mit einer höheren Aggressivität und Invasivität verbunden ist (Pyonteck *et al.* 2012). Aber auch in weiteren Tumorentitäten, wie Brust-, Ovarial- und Lungentumoren, korrelierte die Anzahl infiltrierender Makrophagen mit einer schlechten Prognose, einer erhöhten Metastasierung sowie einer gesteigerten Proliferation (Lewis und Pollard 2006, Mantovani *et al.* 2017, Zhao *et al.* 2017, Zhu *et al.* 2017). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass TAMs die Degradation der Extrazellulären Matrix durch Proteasen wie Cathepsine und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) begünstigen, und die Gefäßneubildung über die Sezernierung von VEGF fördern (Quatromoni und Eruslanov 2012).

Oft ist die Immunantwort durch infiltrierende Makrophagen nicht gegen den Tumor gerichtet. Die Immunzellen werden vielmehr in einen Phänotyp umprogrammiert, der die Tumorprogression unterstützt. Dies führt anschließend zu einem gesteigerten Wachstum und Invasivität des Tumors (Balkwill *et al.* 2012).

Dies scheint abhängig von der Tumorentität zu sein. Ein Gegenbeispiel stellt das Kolorektalkarzinom dar; dort ist die Infiltration von Makrophagen mit einer besseren Prognose verbunden (Lewis und Pollard 2006, Zhou *et al.* 2010, Cavnar *et al.* 2017).

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Rollen von Makrophagen im Tumor liegt in der funktionellen Plastizität dieser Zellen, die abhängig von ihrem Mikromilieu ist (Biswas und Mantovani 2010).

#### 1.4.1 Tumorassoziierte Makrophagen

Makrophagen übernehmen Aufgaben in der Immunabwehr, der Wundheilung, der Regulation des Immunsystems und in der Gewebsentwicklung (Pollard 2009). Dieses große Spektrum spiegelt sich auch in den verschiedenen Phänotypen, die sich teils stark voneinander unterscheiden, wider.

Innerhalb der Makrophagen kann zwischen zwei unterschiedlichen Aktivierungsmustern unterschieden werden, wobei diese zwei Extreme lediglich eine vereinfachte Darstellung sind und unter physiologischen Bedingungen im Organismus in der Regel von intermediären Phänotypen ausgegangen wird. Die

klassisch aktivierten M1-Makrophagen sind innerhalb der Makrophagen die weitaus länger und besser erforschte Population. Makrophagen werden durch bakterielle Produkte, den Toll-like-Rezeptor-Signalweg und Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) in den M1-Typ polarisiert und sind hauptsächlich an der Phagozytose von Tumorzellen und der Antigenpräsentation im Rahmen der adaptiven Immunantwort für T-Zellen beteiligt. Durch den hohen Anteil an pro-inflammatorischen Zytokinen, der Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und dem T<sub>H</sub>1-assoziiertem Zytokin IL-12 zeichnen sich die M1-Makrophagen durch eine starke und gegen den Tumor gerichtete Immunantwort aus.

Im Kontrast dazu stehen die durch die Interleukine IL-4,-10,-13 und den *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ) alternativ-aktivierten M2-Makrophagen (Gordon 2003, Pollard 2009, Gordon und Martinez 2010). Das Wachstum und die Differenzierung von Makrophagen ist von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, wie dem *Colony stimulating growth factor* (CSF-1), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), IL-3 und des Chemokins CCL-2 abhängig. In Mäusen konnte darunter der CSF-1 als einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren zur Differenzierung von monozytären Progenitorzellen zu Makrophagen identifiziert werden (Gordon 2003, Pollard 2009). Die Assoziation der CSF-1-Überexpression mit einer schlechten Prognose in diversen Tumorentitäten wie dem Brust-, Prostata- und Ovarialkarzinom, konnte die Rolle von CSF-1 in der Tumorprogression, Invasion und Metastasierung verdeutlichen. Eine genetische CSF-1-Depletion, sowie der gezielte therapeutische Einsatz von Antikörpern, die gegen CSF-1 gerichtet sind, oder Liposomales Clodronat konnten die Rekrutierung von Makrophagen zum Tumor und somit das Tumorstadium reduzieren (Gordon 2003, Gazzaniga *et al.* 2007, Abraham *et al.* 2010, Griesmann *et al.* 2016).

M2-Makrophagen, die in der Literatur mit tumorassoziierten Makrophagen (TAM) gleichgesetzt werden, hemmen außerdem durch die Sekretion von IL-10, IL-1 $\beta$ , Prostaglandin 2 (PGE<sub>2</sub>) die T<sub>H</sub>1-vermittelte Immunantwort und locken durch die Sezernierung des Chemokins CCL22 regulatorische T-Zellen (Treg) zum Tumor an.

Regulatorische T-Zellen stellen eine Subpopulation von T-Lymphozyten dar, deren wichtigste Funktion die Suppression des Immunsystems ist, um Autoimmunreaktionen im Organismus zu verhindern. Tregs werden als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-Zellen charakterisiert, wobei die eindeutige Identifikation von Tregs ausschließlich anhand des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein 3 (FoxP3) erfolgt, der spezifisch nur von dieser Subpopulation exprimiert wird (Beyer und Schultze 2006, Keir 2008, Takeuchi und Nishikawa 2016). Im Kontext des Tumors können diese Zellen aufgrund ihrer immunsupprimierenden Eigenschaften jedoch auch die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort blockieren und somit das Tumorstadium fördern. Aus diesem Grund stellt die Anwesenheit von Tregs neben M2-Makrophagen im Tumormikromilieu einen weiteren negativen prognostischen Faktor bei Patienten verschiedener Tumorentitäten wie dem Prostata-, Brust- und Pankreaskarzinom dar (Flammiger *et al.* 2012, Jang *et al.* 2016,

Takeuchi und Nishikawa 2016). In weiteren Studien konnte zudem beobachtet werden, dass in Tumoren das Verhältnis von CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Lymphozyten hin zu regulatorischen T-Zellen häufig verschoben ist, sodass von einer supprimierenden Funktion der Tregs gegenüber CD8<sup>+</sup>-Zellen ausgegangen wird.

Die tumorfördernden Funktionen der Tregs erfolgen dabei zum großen Teil über inhibitorische Zytokine wie IL-10, TGFβ und die Expression von Granzymen und Perforinen. Den Schlüsselmechanismus stellt jedoch der Oberflächenmarker CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) dar. Dabei handelt es sich um einen inhibierenden Rezeptor, der konstitutiv auf Tregs exprimiert wird und über die Interaktion mit dem Liganden CD80/86 auf antigenpräsentierenden Zellen (APC: *antigen presenting cells*) deren Immunantwort blockiert. Eine vergleichbare Funktion weist PD-1 (*programmed death ligand 1*) auf. Durch die Interaktion mit dem PD-1 Liganden (PD-L1) auf APC-Zellen wird die Proliferation und das Überleben der T-Zellen gesenkt und die T-Zell-vermittelte Immunantwort durch die verminderte Sekretion von IFNγ, TNFα und IL-2 verhindert (Keir 2008, Buchbinder und Desai 2016). Zusätzlich können ebenso TAMs durch die erhöhte Expression von PD-1 die T-Zell-Aktivierung inhibieren und T-Zell-Apoptose induzieren (Gordon *et al.* 2017).

## 1.5 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Neuroendokrine Tumore des Pankreas stellen eine heterogene Tumorentität dar, die sich durch eine hohe Dichte an Blutgefäßen auszeichnet. Anti-angiogene Behandlungsstrategien, wie Sunitinib, zeigen jedoch nur schwache Effekte auf das Tumorwachstum. Oftmals ist die Therapieeffizienz durch das Auftreten von Resistenzmechanismen limitiert. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob der Multityrosinkinase-Inhibitor Regorafenib, der anti-tumorale und anti-angiogene Effekte aufweist, im Vergleich zu dem etablierten Multikinase-Inhibitor Sunitinib und dem mTOR Inhibitor Everolimus eine neue Therapieoption in der Behandlung pankreatisch neuroendokriner Tumore darstellt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung stehen zwei humane und drei murine PNET-Zelllinien zur Verfügung. Außerdem soll der Effekt in dem transgenen RIP1Tag-Mausmodell untersucht werden. Durch die genaue Charakterisierung der einzelnen Tumorstadien kann der Effekt auf die Tumorentstehung und das spätere Tumorwachstum untersucht werden.

Diese Fragestellung sollte in vier wesentlichen Schritten untersucht werden:

1. Hat Regorafenib einen Effekt auf die Proliferation und Viabilität der humanen PNET-Zelllinien BON-1 und QGP-1 *in vitro*?
2. Ist der Effekt von Regorafenib vergleichbar mit den etablierten Therapien mit Sunitinib bzw. Everolimus?
3. Hat Regorafenib einen Effekt auf die Proliferation und Viabilität in den murinen  $\beta$ -Tumorzellen aus der RIP1Tag2-Maus *in vitro*?
4. Hat Regorafenib einen Einfluss auf die Proliferation, Angiogenese und tumorassoziierte Makrophagen in dem transgenen RIP1Tag2-Mausmodell?



## 2 Material

### 2.1 Geräte

**Tabelle 1: Laborgeräte**

Bezeichnung	Hersteller
Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Axio Scan Z.1	Zeiss
BioZero BZ-8100E Mikroskop	Keyence
Eppendorf® Thermomixer Compact	Sigma-Aldrich
Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	ThermoFisher Scientific
Heraeus™ Megafuge™ 40	ThermoFisher Scientific
INTAS Advanced Fluorescence Imager	INTAS
LSR II Fortessa™	BD Biosciences
Luminoskan Ascent	ThermoFisher Scientific
Master Cycler nexus gradient	Eppendorf
Microm EC 350-1	ThermoFisher Scientific
Microm STP 120	ThermoFisher Scientific
Mini Trans-Blot® Cell	Biorad
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Biorad
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	ThermoFisher Scientific
NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific
Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent

## 2.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl) - 1-piperazinyl) -ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	Roth
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)	Agilent
Collagenase from <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Desoxy-Nucleotridiphosphate (dNTPs)	Biozym
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich
Ethanol, Absolute (200 Proof)	Fisher Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fetales Kälber Serum (FCS)	Capricorn
Glucose	Sigma-Aldrich
Glutamin	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
GoTaq G2 DNA Polymerase	Promega
HDGreen™ DNA-Dye	INTAS
Isopropanol	Fisher Scientific
Kälberserumalbumin (BSA)	Serva
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Luna Universal qPCR Master Mix	NEB
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth
Methanol	Honeywell
Methansulfonsäure	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natrium-Deoxycholsäure (SDS)	Roth
Natronlauge (NaOH)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth
Nonident P40 (NP40)	Roth
Oligomycin	Agilent
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Penicillin	Thermo Fischer Scientific
Pferdeserum	Gibco

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Serva
Phosphatase-Inhibitor-Mix I	Th Geyer
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Polyethylenglycol	Roth
Propidiumiodide	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Applichem
Pyruvat	Sigma-Aldrich
RNase A	Applichem
RNase-Free DNase Set	Qiagen
Rotenone	Roth
Roticlear	Roth
RotiLoad	Roth
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth
Salzsäure (HCL)	Roth
SERVALight Helios CL HRP WB Substrat-Kit	SERVA
SERVALight Polaris CL HRP WB Substrat-Kit	SERVA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Tris	Serva
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween®-20	Sigma-Aldrich
Xylol	Honeywell

## 2.3 Kits

**Tabelle 3: Verwendete Kits**

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	G7571	Promega
Click-iT™ Edu Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit	C10337	Thermo Fisher Scientific
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	103015-100	Agilent
NucleoSpin® RNA	740955	Macherey & Nagel
RNeasy FFPE Kit	73504	Qiagen
Omniscript RT Kit	205113	Qiagen

## 2.4 Oligonukleotidsequenzen

Tabelle 4: Oligonukleotidsequenzen

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
CCL5	mqRT-Ccl5-for	TCCCTGTCATTGCTTGCTTGTCTAG
	mqRT-Ccl5-rev	GAGCAGCTGAGATGCCCAT
CD8	mqRT-CD8-for	GAAAGCGTGTGGCAAATGT
	mqRT-CD8-rev	TTCTCTGAAGGTCTGGGCTT
Cathepsin B	mqRT-CtsB-for	TTCCACCGGTCTCAACTACA
	mqRT-CtsB-rev	TCACTGGCTATGCGAGGTAG
CSF1R	mqRT-Csf1r-for	TCTATAGTCCCGCTCATCC
	mqRT-Csf1r-rev	GGGCACTGGGTAGAACAACCT
Cyclin D3	mqRT-Ccnd3-for	AGTCAGCTCCTCTTCTTC
	mqRT-Ccnd3-rev	AATGCTGGTGTGTGGATT
Dectin	mqRT-Dectin1-for	GGAATCCTGTGCTTTGTGGTAGTAG
	mqRT-Dectin1-rev	GGAAGGCAAGACTGAGAAAAACCTC
E-Cadherin	mqRT-E-cadherin-for	CTGGGCAGAGTGAGATTGA
	mqRT-E-cadherin-rev	CCACTTTGAATCGGGAGTCT
FOXP3	mqRT-Foxp3-for	CCATACCTTGAACACAAGCTCATC
	mqRT-Foxp3-rev	CTTGTCGGACACAAAGGAAGCTG
Granzyme B	mqRT-Granzyme B-for	CGACCCTACATGGCCTTACT
	mqRT-Granzyme B-rev	CAGCACAAAGTCCTCTCGAA
Heparanase	mqRT-Heparanase-for	CGATGTCTGTAGTGTGGCT
	mqRT-Heparanase-rev	TCTGATTGCTGCTGGATCTC
iNOS	mqRT-iNos-for	CCAAGCCCTCACCTACTTCC
	mqRT-iNos-rev	CTCTGAGGGCTGACACAAGG
Insulin	mqRT-Insulin-for	CACAAGTGGAGCTGGGTGGA
	mqRT-Insulin-rev	TAGGCTGGGTAGTGGTGGGT
Mgl2	mqRT-Mgl2-for	TTAGCCAATGTGCTTAGCTGG
	mqRT-Mgl2-rev	GGCCTCCAATTCTTGAACCT
N-Cadherin	mqRT-Ncad-for	ATTTCAAGGTGGACGAGGAC
	mqRT-Ncad-rev	GGTTTCTTTGTCTTGGGCAT
PD-1	mqRT-PD-1-for	GACTGCTACTGAAGGCGACA
	mqRT-PD-1-rev	ACCTCTAGAAGCCACCCTGA
PDX1	mqRT-PDX1-for	GAGAGCCAGTTGGGTATAG
	mqRT-PDX1-rev	ATTGGTCCCAGGAAAGAG
VEGF-A	mqRT-VEGFA-for	GCTCACTCCAGAAACACGA
	mqRT-VEGFA-rev	GTTGGAACCGGCATCTTTAT
YM-1	mqRT-Ym1-for	CAGGCCAATAGAAGGGAGTTT
	mqRT-Ym1-rev	TGCTCATGTGTGTAAGTGATCT
RIP1Tag2	RIP1Tag2-for	GGACAAACCACAACCTAGAATGCA
	RIP1Tag2-rev	CAGAGCAGAATTGTGGAGTGG
RPLP0	qRT-RPLP0-for	TGGGCAAGAACACCATGATG
	qRT-RPLP0-rev	AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT

## 2.5 Antikörper

Tabelle 5: Primär-Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Bestellnummer	Anwendung	Hersteller
Bcl-2	Ratte	1:100	EP36	IHC	Epitomics
BCL-2 (humanspezifisch)	Kaninchen	1:1000	2872	WB	Cell Signaling
Bcl-2 (mausspezifisch)	Maus	1:500	sc-7382	WB	Santa Cruz
Bcl-XL	Kaninchen	1:1000	2764	WB	Cell Signaling
Beclin 1	Kaninchen	1:1000	3738	WB	Cell Signaling
Cathepsin B	Kaninchen	1:100	bs-1500	IHC	Bioss
CD31	Ratte	1:100	DIA-310	IHC	Dianova
Chromogranin A	Schaf	1:1000	sc-1488	WB	Santa Cruz
CSF1R	Kaninchen	1:1000	sc-692	WB	Santa Cruz
CSF1R	Kaninchen	1:100	215441	IHC	Abcam
Phospho-CSF1R (Tyr723)	Kaninchen	1:1000	MA5-15151	WB	Thermo Fisher Scientific
Cyclin D3	Maus	1:1000	2936	WB	Cell Signaling
Cytochrom C	Kaninchen	1:1000	11940	WB	Cell Signaling
E-Cadherin	Kaninchen	1:1000	3195	WB	Cell Signaling
F4/80	Ratte	1:100	NB600-404	IHC	NOVUS
Heparanase	Kaninchen	1:1000	bs-1541	WB	Bioss
Ki-67	Ratte	1:100	M7249	IHC	DAKO
LC3B	Kaninchen	1:1000	3868	WB	Cell Signaling
Mcl-1 (human)	Kaninchen	1:1000	4572	WB	Cell Signaling
Mcl-1 (murin)	Maus	1:500	sc-74436	WB	Santa cruz
N-Cadherin	Maus	1:1000	14215	WB	Cell Signaling
PARP	Kaninchen	1:1000	9542	WB	Cell Signaling
PCNA	Maus	1:1000	sc-56	WB	Santa Cruz
Phospho-STAT3 (Tyr705)	Kaninchen	1:1000	9145	WB	Cell Signaling
S6 Ribosomal Protein	Kaninchen	1:1000	2217	WB	Cell Signaling
S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	Kaninchen	1:1000	2211	WB	Cell Signaling
β-Aktin	Maus	1:10.000	A1978	WB	Sigma
STAT3	Kaninchen	1:1000	9139	WB	Cell Signaling
SV40 T Ag	Kaninchen	1:1000	sc-147	WB	Santa Cruz
VEGF-A	Kaninchen	1:1000	ab46154	WB	Cell Signaling

Tabelle 6: Sekundär-Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Bestellnummer	Methode	Hersteller
ECL Mouse IgG, HRP-linked	Schaf	1: 10.000	NA931	WB	GE Healthcare
ECL Rabbit IgG, HRP-linked	Affe	1: 10.000	NA934	WB	GE Healthcare
Anti-goat IgG, HRP-linked	Kaninchen	1: 10.000	A5420	WB	Sigma

## 2.6 Zelllinien

Die verwendeten humanen BON-1- und QGP-1-Zelllinien stammen aus dem Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg. Alle weiteren Zellen wurden im Zuge dieser Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe im Universitätsklinikum Halle (Saale) eigens isoliert bzw. hergestellt.

Tabelle 7: Zelllinien

Name	Zelltyp	Ursprung
BON-1	Humane, pankreatische serotonin-produzierende Lymphknotenmetastase	CVCL_3985
QGP-1	humane pankreatische Somatostatinom-Zelllinie	CVCL_3143
HMEG-1	Murine, pankreatische $\beta$ -Tumorzelllinie	RIP1Tag2-Maus
HMEG-2	Murine, pankreatische $\beta$ -Tumorzelllinie	RIP1Tag2-Maus
HMEG-3	Murine, pankreatische $\beta$ -Tumorzelllinie	RIP1Tag2-Maus
mBMM	Murine primäre Makrophagen	C57BL/6N Maus

### 2.6.1 Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 8: Zusätze für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Gibco™ Antibiotikum-Antimykotikum (100X)	Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälberserum	Capricorn
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich
Muriner <i>macrophage colony stimulating factor</i> (MCSF)	BioLegend
murines Interferon gamma (IFN $\gamma$ )	PeptoTech
murines Interleukin 4 (IL-4)	PeptoTech
Penicillin / Streptavidin	Thermo Fisher Scientific
Pferdeserum	Thermo Fisher Scientific

## 2.7 Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die transgene Mauslinie B6.D2-Tg(RIP1Tag2) 2Dh, kurz genannt RIP1Tag2, auf einem C57BL/6N Hintergrund verwendet. Dabei wurden männliche heterozygote RIP1Tag2-Mäuse mit weiblichen C57BL/6N -Mäusen verpaart, wodurch aufgrund des autosomal-dominanten Erbgangs in der Regel 50% der Nachkommen das RIP1Tag2-Gen tragen.

### 2.7.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Halle (Saale) gehalten. Als Tierhaltungssystem für Mäuse wurden einzelbelüftete Käfigsysteme (IVC-Käfige) verwendet.

Die Tiere wurden in einem periodischen 12 h Tag- und Nachtrhythmus, bei einer Luftfeuchte von 45-65%, einer Raumtemperatur von 20-24°C und einem 15-fachem Luftwechsel gehalten. Die Fütterung und Wassergabe erfolgten *ad libitum*.

## 2.8 Software

**Tabelle 9: Software**

Name	Hersteller
7500 Software v2.3	Thermo Fisher Scientific
ChemoStar	INTAS
FlowJo® V10	FlowJo, LLC
GraphPad Prism 5	Graph Pad (San Diego, CA,USA)
LabImage 1D	INTAS
Strataquest	TissueGnostics
Wave 2.1.0	Agilent
ZEN	Zeiss

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

Alle verwendeten Materialien wie Reaktionsgefäße, Glaspipetten und Pipettenspitzen wurden vor ihrer Anwendung autoklaviert und steril entnommen.

#### 3.1.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub>. Das Kultivierungsmedium für die einzelnen Zelllinien ist der Tabelle 10 auf Seite 31 zu entnehmen.

Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen durch die Zugabe von 3ml 0,05%iger Trypsin/EDTA-Lösung und einer Inkubationszeit von 3 min vom Flaschenboden abgelöst. Durch die Zugabe von 3 ml Kulturmedium wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt, die Zellen gründlich vom Flaschenboden abgelöst und in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 1300 rpm pelletiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet daraufhin erneut in Kulturmedium resuspendiert. Je nach Zelltyp wurde die Zellsuspension in der entsprechenden Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche in einem Volumen von 10 ml Medium überführt. Das Kultivierungsmedium wurde alle 3 Tage durch frisches Medium ersetzt.

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen mittels qRT-PCR auf Mykoplasmen getestet.

#### 3.1.2 Kryokonservierung

Die Lagerung der Zellen erfolgte in der Gasphase über dem flüssigen Stickstoff in einem Kryotank. Dazu wurden ca. 1 Mio. Zellen in 1 ml Einfriermedium in beschriftete Kryogefäße überführt und in ein mit 100% Isopropanol gefülltes Einfriergefäß (Mr. Frosty™, Nalgene) gesetzt, welches mit einer Abkühlrate von -1°C/min die Zellen sicher über Nacht bei -80°C runterkühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryogefäße in den Stickstofftank überführt.

Einfriermedium:       70% ml Kulturmedium mit 10% FCS  
                              20% ml FCS  
                              10% ml DMSO



Zum Auftauen der Zellen wurden diese in den Kryogefäßen langsam auf Eis aufgetaut, die Zellsuspension in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei einer dreiminütigen Zentrifugation bei 1300rpm pelletiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt wurde, wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 10 ml Kultivierungsmedium überführt.

### 3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe der Neubauer Zählkammer. Nach dem Festdrücken des Deckgläschens auf der Neubauer Zählkammer und dem Erscheinen der Newton'schen Ringe wurden 10µl der Zellsuspension blasenfrei unter das Deckgläschen pipettiert. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde die Anzahl der Zellen in allen 4 Großquadraten gezählt. Der ermittelte Durchschnittswert aus den Einzelquadraten wurde mit dem Kammerfaktor von  $1 \times 10^4$  multipliziert, sodass sich daraus die Zellzahl pro 1 ml errechnete.

### 3.1.5 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Um die Zellen mit den entsprechenden Inhibitoren zu behandeln, wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und die Zellen anschließend mit einer definierten Zellzahl in die jeweiligen Zellkulturplatten ausgesät (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: Übersicht über die eingesetzten Zellen und den entsprechenden Zellzahlen**

Name	96-Well	24-Well	12-Well	6-Well	Zellkulturmedium
BON-1	$7 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	-	$3 \times 10^5$	DMEM F-12 + 10% FCS
QGP-1	$1 \times 10^4$	$7 \times 10^4$	-	$5 \times 10^5$	RPMI + 10% FCS
HMEG-1	$4 \times 10^4$	-	$3 \times 10^5$	$8 \times 10^5$	DMEM + 10%FCS
HMEG-2	$4 \times 10^4$	-	$3 \times 10^5$	$8 \times 10^5$	DMEM + 10%FCS
HMEG-3	$4 \times 10^4$	-	$3 \times 10^5$	$8 \times 10^5$	DMEM + 10%FCS
mBMM	$2 \times 10^4$	-	-	$1 \times 10^5$	RPMI + 5% FCS + 5ng/ml mMCSF*

\*mMCSF: *murine Macrophage colony-stimulating factor*

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem gewünschten Inhibitor alleine oder in Kombination für 24h bzw. 48h behandelt. Dazu wurden die Stocklösungen der Inhibitoren (Seite 32, Tabelle 11) im Zellkulturmedium verdünnt und anschließend vorsichtig auf die Zellen gegeben. Alle eingesetzten Inhibitoren waren in DMSO gelöst. Um einen zytotoxischen Effekt von DMSO auszuschließen, wurden DMSO bzw. die Inhibitoren mindestens in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Dadurch wurde eine DMSO-Konzentration von maximal 0,1% gewährleistet. Die Zellen wurden bis zum Versuchsende mikroskopisch kontrolliert und für die jeweilige Analyse weiterverwendet.

Tabelle 11: Verwendete Inhibitoren mit den eingesetzten Konzentrationen

Produkt	Hersteller	Artikelnummer	Stockkonzentration	Eingesetzte Konzentration
ABT-199	Hölzel Diagnostic	TMO-T2119	10mM [DMSO]	4µM
Everolimus (RAD001)	MedChemExpress	Y-10218	10mM [DMSO]	0,5µM und 1µM
Regorafenib (BAY 73-4506)	Sellekchem	S1178	10mM [DMSO]	0,1 und 0,5µM (Makrophagen) 4µM, 6µM (PNET-Zellen) 10µM (HMEG-Zellen)
Sunitinib malate (SU11248)	Axon medchem	Axon 1398	19mM [DMSO]	5µM und 10µM

### 3.1.6 Isolation und Kultivierung primärer muriner Makrophagen

Für die Isolation von primären Makrophagen wurden 8-Wochen alte C57BL/6N Mäuse verwendet. Zunächst wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, anschließend Femur und Tibia zügig freigelegt, heraus präpariert und in mit RPMI-Medium gefüllte Zellkulturschalen auf Eis gelegt. Die nächsten Schritte erfolgten anschließend unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank. Das Knochenmark mit den darin enthaltenen Monozyten wurde mithilfe einer Kanüle mit RPMI-Medium in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen gespült, mit einer Pipette vereinzelt und anschließend für 7 Minuten bei 1200rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet erneut in RPMI-Medium aufgenommen und für 7 Minuten bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu entfernen, wurde das Zellpellet anschließend in 7ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 3 ml RPMI-Medium hinzugegeben und die Zellen 7 Minuten bei 4°C 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 5 ml RPMI-Medium aufgenommen und durch einen 30µm-Filter gegeben. Im letzten Schritt wurde die Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt und jeweils  $2 \times 10^6$  Monozyten in einem Volumen von 7 ml RPMI-Medium mit 5% FCS, 20ng/ml murinen MCSF (*macrophage stimulating colony factor*) und 1% Penicillin/Streptavidin in 10 cm-Schalen ausgesät. Nach einer 3-tägigen Kultivierung wurden weitere 7ml RPMI-Medium mit 5%FCS und 20ng/ml MCSF zu den Monozyten gegeben. Nach 7 Tagen waren die Monozyten vollständig zu Makrophagen ausdifferenziert und wurden entweder direkt für einen Versuch weiterverwendet oder kryokonserviert.

Medium für die Ausdifferenzierung

RPMI + 5% FCS  
20ng/ml mMCSF  
1% Penicillin/Streptavidin

Medium für die anschließende Kultivierung

RPMI + 5% FCS  
5ng/ml mMCSF

Erythrozytenlysepuffer	150mM NH <sub>4</sub> CL 10mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA In H <sub>2</sub> O
	steril filtriert, Lagerung bei 4°C

mMCSF: 10µg in 100µl PBS + 0,1% BSA lösen = 100ng/µl

Die Lagerung der hergestellten Aliquots erfolgte bei -20°C.

### 3.1.8 Isolation muriner β-Tumorzelllinien aus der RIP1Tag2-Maus

Zur Gewinnung von murinen Zelllinien aus pankreatischen β-Zelltumoren aus der RIP1Tag2-Maus wurde das Protokoll von Efrat *et al.* 1988 angewendet. Dazu wurden zwei 15-Wochen-alte RIP1Tag2-Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, desinfiziert und der Bauchraum zügig eröffnet. Das Pankreas wurde anschließend heraus präpariert und in DMEM-Medium auf Eis gelagert. Die weiteren Schritte fanden anschließend unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank statt. Aus dem Pankreas wurden die makroskopisch gut sichtbaren Insulinome herausgeschnitten und vom exokrinen Pankreasgewebe freigelegt. Danach wurde die Insulinomkapsel mit einer Schere eröffnet und der gesamte Zellinhalt in eine mit Medium gefüllte Zellkulturschale überführt. Grobe Zelltrümmer wurden direkt entfernt. Um Zelltypen wie Erythrozyten und Fibroblasten zu eliminieren, erfolgte die Kultivierung anschließend über mehrere Passagen mit DMEM-Medium. Um Fibroblasten zu entfernen, wurde dem Medium Pferdeserum zugesetzt. Da sich Fibroblasten außerdem schlechter vom Zellkulturboden lösen als die β-Tumorzellen, konnten diese durch eine entsprechend angepasste zeitliche Trypsinbehandlung nach mehrmaligen Passagieren aus der Zellkultur beseitigt werden. β-Tumorzellen, die auch nach mehrmaligen Passagieren dennoch von einer zu hohen Anzahl an Fibroblasten zugewachsen waren, wurden verworfen. Letztendlich konnten 3 β-Tumorzelllinien etabliert und kultiviert werden (HMEG-1, HMEG-2, HMEG-3), worunter die HMEG-2- und 3-Zellen aus derselben Maus stammen.

Medium zur Selektion:	DMEM 2,5% FCS 15% Pferdeserum Penicillin/Streptavidin Antibiotikum
-----------------------	--

Medium für die Kultivierung:	DMEM 10% FCS
------------------------------	-----------------

### 3.1.9 Isolation von Insulinomen aus der RIP1Tag2-Maus

Zur Entnahme von Insulinomen aus dem Pankreas von 15-Wochen alten RIP1Tag2-Mäusen wurden die Mäuse per zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde die Collagenase P-Lösung (1,5 mg/ml) über den Gallengang der Mäuse in das exokrine Pankreas gespritzt. Nach der Entnahme des Pankreas wurde dieser in ein 50ml Zentrifugenröhrchen mit 3ml Collagenase P-Lösung gegeben und schüttelnd für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte ein 3-maliges kräftiges, vertikales Schütteln per Hand, sodass die Insulinome vom exokrinen Teil des Pankreas getrennt werden konnten.

Die isolierten Insulinome wurden anschließend anhand der Größe (klein: 2 mm Durchmesser; groß: 3-4 mm Durchmesser) und des angiogenem Status (schwach angiogen: hellrot; stark angiogen: dunkelrot) in zwei Gruppen unterteilt.

Die präparierten Insulinome wurden anschließend in mit 1,5%-Agarose beschichteten 12-Well-Platten in RPMI-Medium und 10% FCS kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Insulinome für 48 Stunden mit 10µM Regorafenib behandelt und im Anschluss Proteinlysate nach Protokoll hergestellt.

HBSS-Puffer:	5 mM KCl
	0,3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,4 mM MgSO <sub>4</sub>
	140 mM NaCl
	4 mM NaHCO <sub>3</sub>
	0,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	5,5 mM d-Glucose
	in Aqua bidest, steril filtriert, Lagerung bei 4°C

Zur Verwendung der Agarose wurde eine 1,5% Lösung in Aqua bidest hergestellt und in dem Autoklaven bei 121°C für 5 Minuten erhitzt und sterilisiert. Vor dem Gebrauch wurde die Agarose in der Mikrowelle erneut erhitzt und zügig mithilfe eines Multistepers in den 12-Well-Platten verteilt. Zum Aushärten der Agarose wurde die 12-Well-Platte mit Parafilm verschlossen und für mindestens 1h im Kühlschrank gelagert.

## 3.2 Funktionelle Analysen

### 3.2.1 Zellviabilität

Die Messung der Zellviabilität wurde mithilfe des *CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay* nach Herstellerangaben durchgeführt. In dieser Analyse werden die Zellen durch die Zugabe des CellTiter-Glo-Reagenzes lysiert und das entstehende Lumineszenzsignal, welches proportional zur ATP-Menge in den Zellen ist, gemessen. In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ , ATP und molekularem Sauerstoff wird durch die thermostabile Luciferase (*Ultra-Glo<sup>™</sup> Recombinant Luciferase*) ein Lumineszenzsignal erzeugt, das anschließend mithilfe des Luminometers gemessen werden kann.

Für diesen Versuchsansatz wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl in einem Volumen von 100µl in eine lichtundurchlässige weiße 96-Well-Zellkulturplatte in Duplikaten ausgesät und für 24h bzw. 48h mit den Inhibitoren behandelt. Eine durchsichtige 96-Well-Zellkulturplatte diente als visuelle Kontrollplatte. Am Versuchsende wurde die Zellkulturplatte 30 Minuten vor der Messung auf Raumtemperatur äquilibriert, das ebenfalls äquilibrierte CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Reagenz in einem Volumen von 100µl zu den Zellen pipettiert und im Luminometer ausgelesen. Zwei Wells mit dem eingesetzten Zellkulturmedium ohne Zellen dienten als Hintergrundwert (Blank). Die ATP-Menge ist dabei direkt proportional zur Zahl der lebenden Zellen in jedem gemessenen Ansatz.

### 3.2.2 Bestimmung der Zellproliferation mittels Zellzählung

Zur Bestimmung der Proliferation der Zellen unter den entsprechenden Behandlungen wurden die BON-1- und QGP-1-Zelllinien in 24-Well-Zellkulturplatten und die HMEG-Zelllinien in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 24h bzw. 48h behandelt. Am Versuchsende wurden die Zellen mithilfe von Trypsin abgelöst, mit dem gleichen Volumen Medium versetzt und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation von 1300rpm wurde das Zellpellet in 1 ml Medium aufgenommen, resuspendiert und die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.2.3 Bestimmung der Zellproliferation mittels Click-iT™ EdU

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Proliferation von Zellen stellte das Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit der Firma Thermo Fisher Scientific dar. Diese Methode basiert auf dem Einbau des Thymidin-Analogen EdU (5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin) in neu synthetisierte DNA. Das in die DNA integrierte EdU wird anschließend über eine Click-Reaktion mithilfe des Alexa Fluor® Farbstoffs spezifisch fluoreszenzmarkiert. Anhand des gemessenen Fluoreszenzsignals können somit proliferierende Zellen von ruhenden Zellen unterschieden werden.

Zur Bestimmung der Proliferation der Zellen nach einer 48-stündigen Regorafenib-Behandlung erfolgte das Protokoll nach Herstellerangaben. Im letzten Schritt wurde das Zellpellet in 500µl frisch hergestellter Propidium-Iodid-Färbelösung resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Bestimmung des Fluoreszenzsignals fand anschließend am *BD LSRFortessa™* Durchflusszytometer (BD Biosciences) statt.

Propidium-Iodid-Lösung:                    10µg/ml Propidiumiodid  
    100µg/ml RNaseA  
    in PBS, steril filtriert

### 3.2.3 Metabolische Analyse mittels der Seahorse XF Technologie

Um den Effekt von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf den Metabolismus zu untersuchen, wurde das XF MitoStressKit der Firma Agilent nach Herstellerangaben verwendet. Der Seahorse XF Flux Analyzer ermöglicht es die zwei Hauptenergie-Stoffwechselwege der Zelle, die mitochondriale Atmung und die Glykolyserate, zu messen.

Die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR: *oxygen consumption rate*) und die extrazelluläre Ansäuerungsrate in Form von Protonen (ECAR: *extracelullar acidification rate*) wird in Echtzeit durch optische Sensoren in jedem Well über den Zellen gemessen. In die Sensorplatte, die auf die Zellkulturplatte gesetzt wird, können bis zu vier Substanzen in sogenannte Ports geladen werden, die anschließend zeitlich versetzt in das Medium der Zellen injiziert werden. Durch die Zugabe der Inhibitoren Oligomycin, FCCP und Rotenone/Antimycin A werden einzelne Komponenten der Elektronentransportkette inhibiert. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase, indem es den Protonenkanal der ATP-Synthase (Komplex V) inhibiert. FCCP (Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone), ein Ionentransporter, wirkt als Entkoppler des mitochondrialen Membranpotentials. Da Protonen nicht durch den Protonenkanal der ATP-Synthase, sondern aktiv durch die mitochondriale Membran transportiert werden, kommt es zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials. Rotenone/Antimycin A inhibieren den Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und den Komplex III (Cytochrom c Reduktase). Rotenone verhindert den Elektronentransfer von den Eisen-Schwefel-Zentren im Komplex I zum Coenzym Q, wodurch NADH nicht in ATP umgewandelt

werden kann (Nicholls *et al.* 2010). Antimycin A blockiert im Komplex III den Elektronentransfer vom Coenzym Q auf Cytochrom c, wodurch der Sauerstoffverbrauch im Komplex IV und die ATP-Synthese im Komplex V gehemmt wird.

Für die Analyse des Energiestoffwechsels wurden BON-1- und QGP-1-Zellen in der entsprechenden Zellzahl in Triplikaten in die XF Zellkulturplatte ausgesät und am nächsten Tag für 24h mit Regorafenib, Sunitinib und Everolimus behandelt. Vor der Messung wurde das Zellkulturmedium durch das Versuchsmedium mit den entsprechenden Komponenten ersetzt und die Zellen anschließend für 45 Minuten in einem CO<sub>2</sub>-freiem Inkubator bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Oligomycin, FCCP und Rotenone/Antimycin A in den entsprechenden Konzentrationen in die Ports der Sensorplatte pipettiert und zur Kalibrierung in das Seahorse Flux Analyser gestellt. Die Messung erfolgte abschließend in einem Wechsel von einer dreiminütigen Durchmischung des Mediums und einer dreiminütigen Messung der OCR und ECAR. Die Auswertung erfolgte im Anschluss mithilfe der Wave-Software.

Versuchsmedium:

- XF Base Medium
- 10mM Glucose
- 1mM Pyruvat
- 2mM Glutamin
- pH 7,4

**Tabelle 12: Konzentrationen und Wirkmechanismus der Inhibitoren**

Inhibitor	Zielstruktur	Finale Konzentration [ $\mu$ M]	Effekt auf die OCR*
Oligomycin	ATP-Synthase (Komplex V)	2	Abfall
FCCP	Innere mitochondriale Membran	1	Anstieg
Rotenone / Antimycin A	Komplex I bzw. III	0,5	Abfall

\* OCR: *oxygen consumption rate*

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Proteinlysate aus der Zellkultur und Proteinbestimmung

Für die Isolation der Proteine aus der Zellkultur wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 500µl eiskaltes PBS hinzugegeben. Mithilfe des Zellschabers wurden die Zellen auf Eis vom Zellkulturboden abgelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 1200 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit RIPA-Lysepuffer versetzt und resuspendiert. Das Zelllysat wurde anschließend mit einer Stärke von 35% und einer Amplitude von 0,5 für 7 Impulse sonifiziert und anschließend für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Zuletzt wurde das Proteinlysat bei 15000rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand im Anschluss in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

RIPA-Lysepuffer:	50 mM Tris-HCl pH 7.5
	150 mM NaCl
	0,1% SDS
	1% Natrium-Deoxycholsäure
	1% Triton X-100
	Steril filtriert, bei 4°C gelagert

Vor Versuchsbeginn wurden 2ml des RIPA-Lysepuffers mit 1x Complete Protease-Inhibitor, 1x Phosphatase-Inhibitor und 1mM PMSF versetzt.

Der Proteingehalt wurde anschließend nach der Methode von Bradford mithilfe des *Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit* von ThermoFisher Scientific bestimmt (Bradford 1976). Coomassie-Blau wird bei der Bindung an Proteine von einem kationischen in den anionischen Zustand überführt, wodurch das Absorptionsmaximum der Proteine von einer Wellenlänge von 465 nach 595nm verschoben wird.

Um die Konzentration der Proteinlysate zu bestimmen, wurde eine BSA-Standardreihe von 1-8µg in Duplikaten in eine durchsichtigen 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurden jeweils 2 µl des RIPA-Puffers in die BSA-Standardreihe und in zwei leere Wells (Blindwert) pipettiert. Anschließend wurden 2µl der Proteinlysatproben in Duplikaten in die restlichen Wells pipettiert. Nach der Zugabe von 200 µl Coomassie-Reagenz in die Wells wurde die Absorption im Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer bei 595 nm gegen den Blindwert gemessen. Anhand der BSA-Standardreihe konnte eine Eichkurve erstellt und so im Anschluss die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.





### 3.3.3 Proteinanalyse

Mithilfe der Western Blot-Methode werden Proteine in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt, auf eine Trägermembran übertragen und anschließend mithilfe von spezifischen Antikörpern detektiert.

#### 3.3.3.1 Diskontinuierliche Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte standardmäßig unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Das Aufkochen der Proteinlysate erfolgte unter Zugabe von Laemmli-Puffer. Das darin enthaltene SDS führt zu einer Entfaltung der Polypeptidketten und einer einheitlich negativen Absättigung der Proteine, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ausschließlich durch das Molekulargewicht, nicht aber durch die Eigenladung, bestimmt wird. Die Verwendung von 1-Mercaptoethanol führt zusätzlich zu einer Reduktion von Disulfidbrücken.

Angepasst an die jeweiligen zu detektierenden Proteingrößen wurden 9%-, 10%- oder 12%-ige Trenngelle mit einem 5%-igen Sammelgel hergestellt. Um ein vollständiges Polymerisieren der Gele zu gewährleisten, wurden diese über Nacht bei 4°C in feuchten Tüchern gelagert.

**Tabelle 13: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel**

Trenngel:

	9%	10%	12%
Trenngelpuffer	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
Wasser	2 ml	1,84 ml	1,5 ml
Acrylamid (30/0.8)	1,5 ml	1,67 ml	2 ml
Glycerol	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
10% APS	10 µl	10 µl	10 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Sammelgel:

	1 Gel	2 Gele
Sammelgelpuffer	0,5 ml	1 ml
Wasser	1,18 ml	2,36 ml
Acrylamid (30/0.8)	0,32 ml	0,64 ml
10% APS	5 µl	10 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Trenngelpuffer :

1,5M Tris-Base, pH8.8  
0,4% SDS  
steril filtriert, Lagerung bei 4°C

Sammelgelpuffer : 0,5M Tris-Base, pH6.8  
0,4% SDS  
Steril filtriert, Lagerung bei 4°C

10x Laufpuffer : 0,25 M Tris-Base  
1,92 M Glycin  
1% SDS

Der 10x Laufpuffer wurde vor dem Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest verdünnt.

Die Proteinlysate wurden in der gewünschten Proteinmenge mit RIPA-Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 20µl gebracht, mit 4x Laemmli-Puffer (Roth) versetzt und 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht.

Die Polyacrylamidgele wurden in eine Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Biorad) mit 1xSDS-Laufpuffer gesetzt. Die vorbereiteten Proteinproben wurden anschließend in die Taschen des Sammelgels pipettiert, bei 100V im Sammelgel fokussiert und bei 130V weiter aufgetrennt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine zum Pluspol (Kathode), da sie durch die SDS-Beladung eine negative Ladung relativ zur Masse tragen, die die endogene Proteinladung überlagert. Als Referenz für das Molekulargewicht diente ein Proteinmarker (SERVA Triple Color Proteinstandard III, SERVA).

### 3.3.3.2 Western Blot und Detektion

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mithilfe einer Blottingkammer (Mini Trans-Blot Modul, BioRad) nach dem Wet-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde in einer Halterungskassette die zuvor in Methanol aktivierte Membran und das Gel mit den aufgetrennten Proteinen zwischen Transferpuffer getränkte Schwämme und Whatman-Filterpapiere luftblasenfrei übereinandergeschichtet und fixiert. Das Gel zeigte dabei zur Kathode und die Membran zur Anode. Der Transfer erfolgte in der mit kaltem 1x Transferpuffer gefüllten Blottingkammer für 2 Stunden bei 4°C und konstanter Stromstärke von 350mA.

10x Transferpuffer : 0,25 M Tris-Base  
1,92 M Glycin  
in Aqua bidest, Lagerung bei RT

1x Transferpuffer : 10x Transferpuffer 1:10 mit Aqua bidest verdünnen  
20% Methanol hinzufügen  
Lagerung bei 4°C

Für den Transfer wurde der 10x Transferpuffer 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt, mit 20% Methanol versetzt und bei 4°C gelagert.

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran für 1h mit 5% Magermilchpulver in 1x TBS-T bei Raumtemperatur geblockt. Der primäre Antikörper, der spezifisch gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, wurde je nach Herstellerangabe in einer 5%-igen BSA- oder Magermilchlösung in der entsprechenden Verdünnung auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran zunächst dreimal kurz und im Anschluss 3x 10 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen. Dieser Schritt wurde nach der einstündigen Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper, der speziesspezifisch den Primärantikörper bindet, wiederholt.

10x TBS :	0,2 M Tris-Base 1,37 M NaCl pH 7.6 in Aqua bidest, Lagerung bei RT
1x TBS-T :	10x TBS mit Aqua bidest 1 :10 verdünnen 0,1% Tween-20
Blockierlösung :	5% Magermilchpulver in 1x TBS-T

Für die Verwendung des Puffers wurde die 10x-Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest verdünnt und mit 0,1% Tween® 20 versetzt. Die Blockierlösung wurde aus 5% Magermilchpulver in 1x TBS-Puffer hergestellt.

Das ECL-Verfahren diente abschließend zur Visualisierung der zu untersuchenden Proteine. Das Luminol in dem ECL-Reagenz dient dabei als Substrat für die Meerrettichperoxidase des Sekundärantikörpers, die das Luminol oxidiert und so ein Chemolumineszenzsignal generiert. Die Membran wurde 5 Minuten mit dem ECL-Reagenz im Dunkeln inkubiert und das Chemolumineszenzsignal anschließend im *Advanced Fluorescence Imager* von INTAS detektiert und mit dem Programm *ChemoStar* von INTAS ausgewertet. Die densitometrische Auswertung von einzelnen Banden erfolgte mithilfe der LabImage 1D Software von INTAS.

## 3.4 Durchflusszytometrie

### 3.4.1 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen in der entsprechenden Zellzahl in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 24h und 48h mit dem Inhibitor behandelt. Die zu analysierenden Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Zellkulturboden abgelöst und in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300g und 4°C wurde das Zellpellet in 5ml FACS-Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 500µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und tropfenweise mit 5ml eiskaltem 70%-igen Ethanol unter ständigem Vortexen fixiert. Nachdem die Zellen nach einer Woche bei 4°C vollständig fixiert waren, wurde der Ethanol nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 800g und 4°C abgenommen und die Zellen zweimal mit 1ml FACS-Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Zellpellet mit 500µl der Propidium-Iodid (PI)-Färbelösung resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Das Propidium-Iodid interkaliert zwischen die Basenpaare doppelsträngiger DNA und kann nach einer Anregung von 488nm bei 620nm emittiert werden. Da die Intensität des gemessenen PI-Signals proportional zum DNA-Gehalt ist, kann der prozentuale Anteil der Zellen, der sich in der G1-Phase (einfacher Chromosomensatz), G2-Phase (doppelter Chromosomensatz) und S-Phase (intermediärer Chromosomensatz) befindet, ermittelt werden. Die Messung erfolgte an einem *LSR II Fortessa™* von BD und die anschließende Auswertung mithilfe der FlowJo-Software.

Waschpuffer:	1% FCS 1mM EDTA pH 8.0 in PBS, 4°C
Propidium-Iodid-Lösung:	10µg/ml Propidium-Iodid 100µg/ml RNaseA in PBS, steril filtriert

### 3.4.2 Durchflusszytometrische Apoptosedetektion

Für den Nachweis der Apoptoseinduktion wurden Annexin V / Propidium-Iodid-Färbungen durchgeführt und durchflusszytometrisch bestimmt.

Phosphatidylserin (PS) ist in einer lebenden Zelle ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Erst während der Apoptose transloziert es auf die Außenseite der Membran und kann von Annexin V gebunden werden. Um apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidium-Iodid (PI) angefärbt. PI dringt nur in Zellen mit einer durchlässigen Membran ein und markiert somit nekrotische und tote Zellen.

Um eine mögliche Apoptoseinduktion von Regorafenib in primären Makrophagen aus der Maus nachzuweisen, wurden  $1 \times 10^6$  Makrophagen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und am folgenden Tag zunächst für 4 Stunden in M1- bzw. M2-Makrophagen polarisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von  $0,5 \mu\text{M}$  Regorafenib für weitere 24 Stunden. Als Positivkontrolle dienten Makrophagen, die für 8 Minuten unter UV-Licht bestrahlt wurden.

Am Tag der Messung wurden die Zellen mithilfe von TrypLE™ Select vom Zellkulturboden abgelöst und bei 3000rpm für 1 Minute pelletiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 1 Minute bei 3000rpm und RT. Das Zellpellet wurde anschließend in  $400 \mu\text{l}$  1x Bindungspuffer aufgenommen,  $8 \mu\text{l}$  Annexin V-FITC (BD Pharmingen) dazugegeben und für 20 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Vor der Messung erfolgte die Zugabe von  $10 \mu\text{l}$  PI-Färbelösung mit einer weiteren Inkubation von 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Dunkeln.

Zellkulturmedium:	RPMI-Medium + 5%FCS 5ng/ml mMCSF
M1-Makrophagen:	je 10ng/ml LPS und IFN $\gamma$
M2-Makrophagen:	10ng/ml IL-4
10x Bindungspuffer:	0,1 M HEPES pH 7.5 25mM CaCl 1,4 M NaCl  in H $_2$ O, Lagerung bei RT
Propidium-Iodid-Lösung:	10 $\mu\text{g}$ /ml Propidiumiodid 100 $\mu\text{g}$ /ml RNaseA in PBS, steril filtriert

### 3.5. Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 RNA-Isolation aus der Zellkultur

Die RNA-Isolation aus adhärenenten Zellen wurde mithilfe des RNA-Kits von Macherey und Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nachdem die Zellen mithilfe von Trypsin vom Zellkulturboden abgelöst und PBS gewaschen wurden, wurde 400µl Lysispuffer auf das Zellpellet gegeben, resuspendiert und die Zellsuspension auf eine *DNA-Removing-Column* pipettiert. Nach einer Zentrifugation für eine Minute bei 16.000g bei Raumtemperatur wurde der Säulendurchfluss zur Fällung der RNA mit 400µl 70%igem Ethanol versetzt und auf eine *Binding Column* gegeben. Im Anschluss folgten vier Waschschrte und der DNA-Verdau. Die RNA wurde abschließend durch die Zugabe von 50µl RNase-freiem Wasser mittig auf die *Binding Column* und einer Zentrifugation von 1 Minute bei 8000g in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß eluiert.

#### 3.5.2 RNA-Isolation aus Paraffin-eingebetteten Organen

Die RNA-Isolation aus Paraffin-eingebetteten Pankreata wurde mithilfe des RNA-Kits RNeasy FFPE von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zunächst wurden jeweils 3x 5µM-dicke Paraffinschnitte mit dem Microtom angefertigt und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Deparaffinisierung wurde jeweils 1 ml Xylol zu den Paraffinschnitten gegeben, für 10 Sekunden gevortext und 2 Minuten bei 16000g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend 2-mal in 1 ml Ethanol aufgenommen, gevortext und 2 Minuten bei 16000g zentrifugiert. Der Ethanol wurde entfernt und das Pellet unter dem Abzug getrocknet. Nachfolgend wurde das Pellet in 150µl PKD-Puffer gevortext, 10µl Proteinase K hinzugegeben und gründlich resuspendiert. Es folgten zwei 15-minütige Inkubationsschritte bei 56°C bzw. 80°C. Nach einer Inkubation von 3 Minuten auf Eis, folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 20000xg. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit DNase Booster Puffer und DNase-Stocklösung versetzt. Anschließend wurden 320µl RPC-Puffer zu dem Lysat gegeben und gründlich durchmischt. Zur Fällung der RNA wurden 720µl 100%iger Ethanol dazugegeben, resuspendiert und das vollständige Lysat in zwei Schritten auf die Säule gegeben und bei 10.000rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach einem Waschschrte mit RPE-Puffer wurde die RNA durch Zugabe von 25µl RNase-freiem Wasser durch eine Zentrifugation bei 15.000rpm in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß eluiert. Die isolierte RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

### 3.5.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch an einem *NanoDrop™ 2000/2000c* Spektralphotometer, indem 1 µl der isolierten RNA auf den Sensor pipettiert und die Lichtabsorption bei 260 nm gemessen wurde. Das RNase-freie Elutionswasser diente als Leerwert. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei einer RNA-Menge von 40 µg/µl. Die Reinheit der RNA konnte anhand der Verhältnisse  $OD_{260}/OD_{280}$  (Proteinverunreinigung) bzw.  $OD_{260}/OD_{230}$  (Phenol-, Peptidrest) bestimmt werden. Reine Proben sollten dabei einen Wert von 2,0 und 2,2 haben. Die RNA-Konzentration wurde mit folgender modifizierter Beer-Lambert-Gleichung bestimmt:

$$c = A * F$$

c = Konzentration der RNA in ng/µl

A = Extinktion bei 260 nm

F = Extinktionskoeffizient RNA (40 ng/µl)

### 3.5.3 cDNA-Synthese

Die Gesamt-RNA wurde anschließend durch reverse Transkription mithilfe des *Omniscript RT Kit (200)* von Qiagen und Oligo-dT-Primern von Biomers in cDNA umgeschrieben.

Die gewünschte Menge an RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14,1 µl gebracht und mit 5,9 µl des Reaktionsansatzes versetzt. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von 20 µl, welches 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Die cDNA wurde anschließend durch Zugabe von 180 µl RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt und bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese:

2 µl RNase-freies Wasser  
2 µl 10x Puffer  
0,4 µl dNTPs (5mM)  
0,5 µl Oligo-dT-Primer (10mM)  
0,5 µl RNase-Inhibitor (20U/µl)  
0,5 µl Taq-Polymerase (4 U/µl)

### 3.5.4 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht neben spezifischer Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte eine relative Quantifizierung des erhaltenen PCR-Produktes in Echtzeit.

Die Amplifikation der PCR-Produkte wurde mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green detektiert, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Der gebildete Komplex aus DNA und Fluoreszenzfarb-



stoff wird mit einer Wellenlänge von 496nm angeregt und emittiert grünes Licht bei 522nm. Das während der Amplifikation entstandene Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur gebildeten DNA-Menge.

Für das gesamte Verfahren wurden die Protokolle, die Geräte und die Software der Firma Applied Biosystems® verwendet. Die spezifischen Primersequenzen wurden anhand der Primer Express® Software v3.0.1 erstellt. Die Messungen wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Messwerte erfolgte anhand der  $\Delta\Delta$ -Cycle-Threshold-Methode, wobei die mRNAs des ribosomalen Proteins RPLP0 als Referenz diente.

## 3.6 Arbeiten mit dem transgenen RIP1Tag2-Mausmodell

### 3.6.1 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps der RIP1Tag2-Mäuse wurde die DNA aus Schwanzspitzen der Tiere isoliert. Dazu wurde den Mäusen im Alter von 14 Tagen ein etwa 2mm-großes Stück am distalen Ende des Schwanzes mit einer Schere abgenommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Schwanzspitzen wurden anschließend in 200 $\mu$ l PBNB-Puffer mit 20 $\mu$ l/ml Proteinase K über Nacht bei 55°C unter Schütteln verdaut. Am nächsten Tag wurden die Proben zur Inaktivierung der Proteinase K für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend eine genspezifische PCR durchgeführt.

PBNB ( <i>PCR Buffer with Nonionic Detergents</i> ) - Puffer:	50mM KCl 10mM Tris-HCl (pH8.3) 2,5mM MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O 0,45% v/v Nonident P40 (NP40) 0,45% v/v Tween-20  Autoklaviert, Lagerung bei -20°C
Proteinase K-Lösung:	20mg/ml Lagerung bei -20°C

Für die genspezifische PCR wurde die GoTaq® G2 DNA Polymerase von Promega verwendet.

Für jeden Ansatz wurden 23  $\mu$ l des PCR-Ansatzes mit 2 $\mu$ l der Mausschwanz-DNA versetzt.

PCR-Ansatz:	14,75µl H <sub>2</sub> O
	5µl Puffer GoTaq® Reaktionspuffer
	1,25µl 5' Primer (10pmol)
	1,25µl 3' Primer (10pmol)
	0,5µl dNTPs (10mM)
	0,25µl GoTaq® G2 DNA Polymerase
PCR-Programm:	95 °C 2 Min
	95 °C 30 Sec
	60 °C 30 Sec
	72 °C 1 Min
	72 °C 2 Min
	4 °C ∞

Die Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten basiert auf deren unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Nettoladung. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit 1%igen Agarosegelen, bei einer Spannung von 100-120mV in ionischen 1x TAE-Laufpuffer. Durch die Zugabe des HDGreen™ DNA-Farbstoffs (1µl/30ml Agaroselösung) konnten die Banden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

10x DNA-Ladepuffer:	30% Glycerol
	0,1mM EDTA
	0,25% Bromphenolblau
	in Aqua Bidest
50x TAE-Puffer:	2M Tris
	0,05M EDTA-Na <sub>2</sub>
	1M Essigsäure
	in Aqua Bidest

### 3.6.2 Versuchsaufbau und Abbruchkriterien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt von Regorafenib auf die Entstehung des Tumors und das Tumorwachstum und die dafür relevanten Prozesse untersucht. Dazu wurden RIP1Tag2-Mäuse beiderlei Geschlechts von Woche 6-9 und von Woche 9-15 mit 10mg/kg KG/Tag Regorafenib behandelt.

Die Tiere wurden anfangs 1x am Tag kontrolliert und dem Score-Sheet entsprechend begutachtet. In den letzten Therapiewochen wurden die Kontrollen auf 2x am Tag erhöht. Bei einem schlechten Allgemeinzustand wurde das Tier durch zervikale Dislokation getötet.

### 3.6.3 Medikamenten-Applikation per Schlundsonde

Regorafenib wurde für jeden Tag frisch abgewogen, die entsprechende Menge in einer 10x-Konzentration in 1,5ml Reaktionsgefäße vorgelegt und im Dunkeln gelagert. Am Tag der Applikation wurde Regorafenib in 1ml PEG-Methansulfonsäure-Lösung (8:2) aufgenommen, gründlich durchmischt und 100µl der Lösung luftblasenfrei mit einer 1ml Spritze aufgenommen. Nachdem die Tiere hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes begutachtet und gewogen wurden, wurden die Tiere an der Schwanzwurzel gepackt, auf das Käfiggitter gesetzt und im Nacken fest fixiert. Durch eine leichte Überstreckung des Kopfes wurde Regorafenib bzw. die Kontrollsubstanz PEG-Methansulfonsäure mithilfe der Schlundsonde (# 18061-22, Fine Science Tools) in den Magen der Maus appliziert.

PEG-Methansulfonsäure-Lösung:	80% Polyethylenglykol (PEG)
	20% Methansulfonsäure
	steril filtriert

### 3.6.4 Blutentnahme

Am Versuchsende wurden die Tiere zunächst durch zervikale Dislokation getötet und der Brustkorb eröffnet. Anschließend wurde der Herzbeutel mithilfe einer Kanüle punktiert, das gewonnene Blut in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mindestens 4h auf Eis gelagert. Nachdem das Blut geronnen war, wurde es 5 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

Für die Western Blot-Analysen wurde das Serum 1:10 mit PBS verdünnt und der Proteingehalt mithilfe des Coomassie-Reagenzes bestimmt.

### 3.6.5 Aufarbeitung des Gewebes zur immunhistologischen Untersuchung

Nachdem die Blutentnahme abgeschlossen war, wurden die Organe Pankreas, Milz und Leber zügig herauspräpariert. Die Organe wurden anschließend über Nacht in einer gepufferten 3,7%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert und am nächsten Tag in 70%igen Ethanol gelegt. Die Entwässerung fand durch eine aufsteigende Ethanolreihe mit anschließender Xylol- und Paraffininkubation am Entwässerungsautomat „Microm STP-120“ statt.

Tabelle 14: Ablauf des Entwässerungsautomats:

Reagenz	Eintauchzeit [h:min]
Formalin	1:00
70% Ethanol	1:30
80% Ethanol	1:30
96% Ethanol	1:30
100% Ethanol	1:00
100% Ethanol	1:00
100% Ethanol	1:00
Xylol	1:30
Xylol	1:30
Paraffin	2:00
Paraffin	2:00

Die nun entwässerten Organe wurden anschließend am Einbettautomat „*Microm EC-350-1*“ in Paraffin eingebettet. Dazu wurde das Paraffin im Einbettautomat auf 60°C erhitzt und die Organe mittig in einem Metallförmchen platziert. Nachdem das Paraffin auf der Kühlplatte vollständig ausgehärtet war, wurden die Paraffinblöcke aus den Metallförmchen vorsichtig herausgelöst.

### 3.6.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Immunhistochemie

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und immunhistochemischen Färbungen wurden am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. univ. Dr. sc. nat. Johannes Haybäck durchgeführt.

### 3.6.7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden in unserer Arbeitsgruppe am AxioScan Z.1 mit einem 10x-Objektiv eingescannt.

Die Auswertung erfolgte anschließend mithilfe der StrataQuest Software von TissueGnostics. Dies ist eine eigens für die Arbeitsgruppe von Prof. P. Michl programmierte Software, die es ermöglicht, das gesamte Gewebe zu analysieren. Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mithilfe der spezifisch generierten Vorlagen für die Ki-67, CD31 und F4/80-Färbung. Anhand der Auswertung konnten Aussagen über das Gesamtgewebe und insbesondere über die Unterschiede zwischen Tumor und gesundem Gewebe durch die DAB-Reaktion entstandenen Braunfärbungen getroffen werden.

### 3.7 Statistische Auswertung

Alle *in vitro* Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des zweiseitigen ungepaarten *t*-Tests. Die Analyse wurde durch die Ermittlung des Mittelwerts und der Standardabweichung durchgeführt. Die statistische Signifikanz der Pankreata aus den RIP1Tag2-Mäusen im Boxplotformat wurde anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests bestimmt. Die Überlebenszeitanalyse wurde anhand der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt und die statistischen Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen mittels des Log-Rank Tests ermittelt. Die statistische Auswertung der Anzahl von invasiven Inseln und das Grading der Behandlungsgruppen erfolgte mithilfe des Chi-Quadrat Tests.

Die gesamte statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Graph Pad Prism 5 Software.

Für die Angabe der Signifikanz wurde folgende Nomenklatur verwendet:

$p > 0,05$ : nicht signifikant (ns)

$p = 0,01 - 0,05$ : signifikant (\*)

$p = 0,01 - 0,001$ : sehr signifikant (\*\*)

$p < 0,001$ : höchst signifikant (\*\*\*)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Effekte von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Viabilität von BON-1- und QGP-1-Zellen

Um den Effekt von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Viabilität zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, wurden die humanen PNET-Zelllinien BON-1 und QGP-1 mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren für 24h und 48h behandelt. Die geeigneten Konzentrationen wurden zuvor in einem Viabilitäts-Assay anhand einer Konzentrationsreihe auf Grundlage der Literatur bestimmt. Für die folgenden Versuche wurden jeweils zwei Konzentrationen ausgewählt, durch die eine in etwa 50%-ige Hemmung der Viabilität ( $IC_{50}$ -Wert) erzielt werden konnte. Mit Everolimus konnte dieses Ziel jedoch mit keiner der eingesetzten Konzentrationen erreicht werden. Da auf Proteinebene trotzdem ein deutlicher Effekt von Everolimus auf den mTOR-Signalweg nachgewiesen werden konnte, wurde auf eine weitere Konzentrationserhöhung verzichtet.

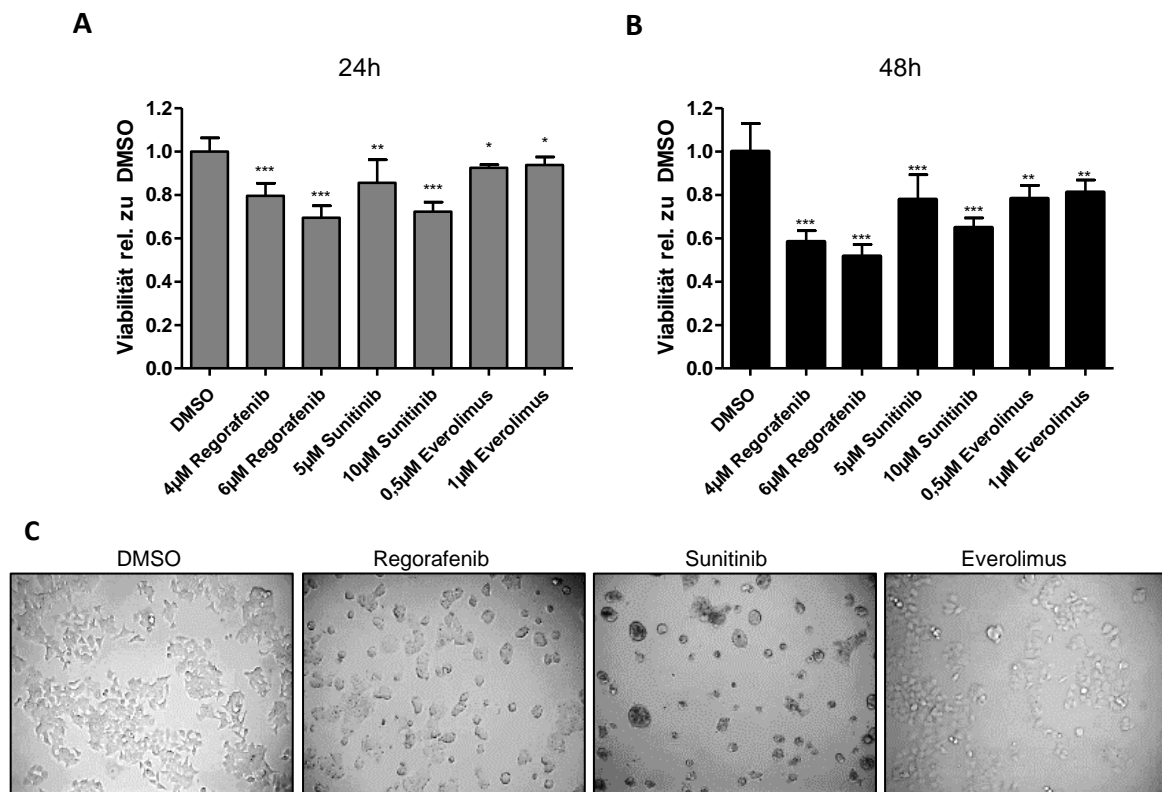
Für die folgenden Experimente wurden demnach 4 $\mu$ M und 6 $\mu$ M Regorafenib, 5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M Sunitinib und 0,5 $\mu$ M und 1 $\mu$ M Everolimus eingesetzt.

Im Anschluss wurde die Viabilität mithilfe des ATP basierten *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays* analysiert. Die gemessenen Lumineszenzsignale sind dabei proportional zur ATP-Menge in den Zellen.

Regorafenib und Sunitinib induzierten eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Viabilität in BON-1-Zellen, wobei Regorafenib im Vergleich zu Sunitinib und Everolimus nach 24h und 48h die stärksten Effekte auf die Viabilität zeigte (Abbildung 2A+B). Everolimus führte nach 48h lediglich zu einer signifikanten Reduktion um 19% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Regorafenib: 49%; Sunitinib: 35%).

Für alle folgenden Versuche wurde die jeweils höhere Konzentration der Inhibitoren eingesetzt (6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1 $\mu$ M Everolimus). Zur Darstellung von Effekten auf die Zellmorphologie der BON-1-Zellen wurden nach einer 48-stündigen Inkubation mit Regorafenib, Sunitinib und Everolimus lichtmikroskopische Aufnahmen erstellt (Abbildung 2C).

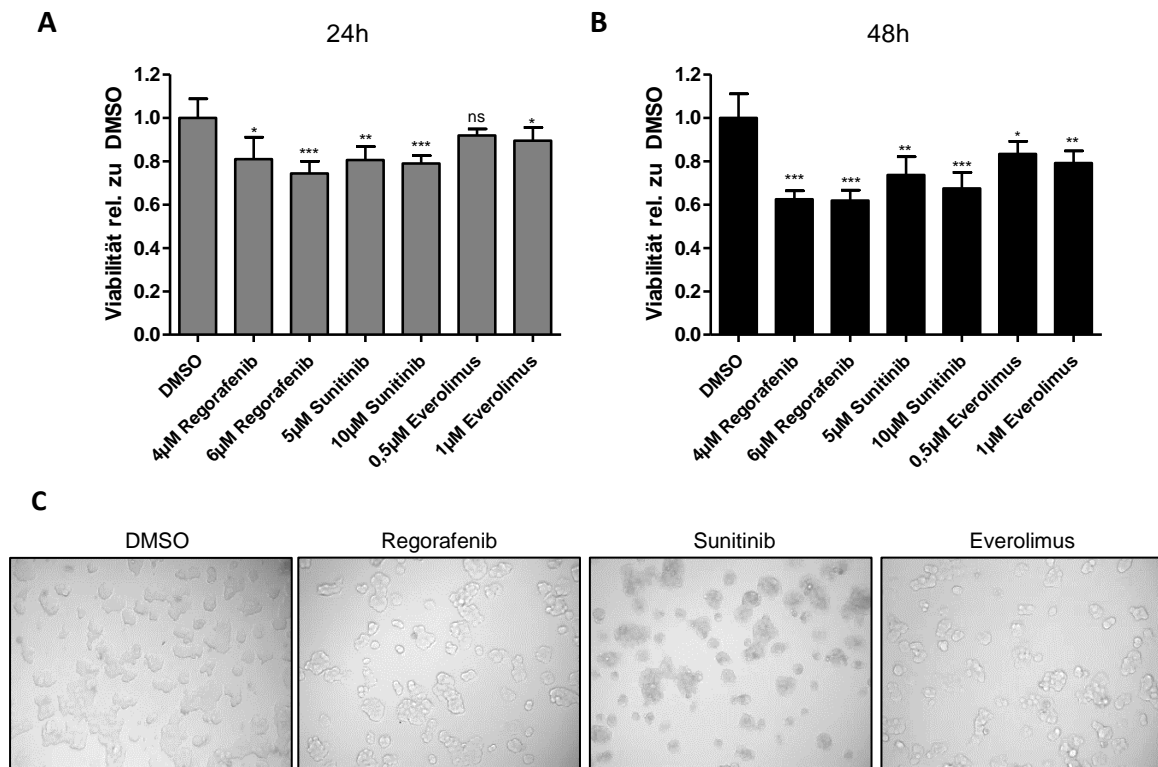
Die mit DMSO und Everolimus behandelten Zellen zeigten die für die nicht-klonale BON-1-Zelllinie beschriebenen Morphologien wie große, runde Zellen und kleine Zellen mit dendritischen Ausläufern (Parekh *et al.* 1994). In der Regorafenib- und Sunitinib-Gruppe hingegen kam es neben einer deutlichen Reduktion der Zellzahl zu drastischen morphologischen Veränderungen. Die Zellen waren stark abgerundet und zeigten keine dendritischen Ausläufer mehr.



**Abbildung 2: Einfluss von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Viabilität von BON-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 96-Well-Platte ausgesät und mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach **(A)** 24h und **(B)** 48h wurde die Zellviabilität mit der ATP basierten Lumineszenzmessung bestimmt und die Mittelwerte relativ zur DMSO-Kontrolle dargestellt. Die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) ergeben sich aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). **(C)** Exemplarische Aufnahmen der BON-1-Zellen nach einer 48-stündigen Behandlung mit 0,1% DMSO, 6µM Regorafenib, 10µM Sunitinib und 1µM Everolimus mittels Durchlichtmikroskopie (20x Vergrößerung).

Auch in der QGP-1-Zelllinie führten Regorafenib, Sunitinib und Everolimus zu einer zeit- und dosisabhängigen Reduktion der Viabilität, wobei die Effekte etwas schwächer ausfielen, als in der BON-1-Zelllinie (Abbildung 3A+B). Diese Daten zeigten erneut, dass die Behandlung mit 6µM Regorafenib nach 48h mit einer Reduktion um 39% im Vergleich zu 10µM Sunitinib (33%) und 1µM Everolimus (21%) den stärksten Effekt auf die Viabilität ausübte. Vergleichbar zu den BON-1-Zellen wurden auch die QGP-1-Zellen für die folgenden Versuche mit 6µM Regorafenib, 10µM Sunitinib und 1µM Everolimus behandelt.

Die QGP-1-Zellen besitzen eine epitheliale Zellstruktur und zeichnen sich durch runde, unregelmäßig ausgebildete Zellaggregate aus (Kaku *et al.* 1980). Unter der Behandlung mit Regorafenib, Sunitinib und Everolimus konnten aufgrund der reduzierten Zellzahl vermehrt kleiner ausgebildete Zellaggregate festgestellt werden, bei denen die einzelnen Zellgrenzen deutlicher zu erkennen waren (Abbildung 3C). Im Vergleich zu den BON-1-Zellen fiel der Effekt auf die Zellmorphologie in den QGP-1-Zellen jedoch schwächer aus.



**Abbildung 3: Einfluss von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Viabilität von QGP-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 96-Well-Platte ausgesät und mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach **(A)** 24h und **(B)** 48h wurde die Zellviabilität mit der ATP basierten Lumineszenzmessung bestimmt und die Mittelwerte relativ zur DMSO-Kontrolle dargestellt. Die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) ergeben sich aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns nicht signifikant). **(C)** Exemplarische Aufnahmen der QGP-1-Zellen nach einer 48-stündigen Behandlung mit 0,1% DMSO, 6µM Regorafenib, 10µM Sunitinib und 1µM Everolimus mittels Durchlichtmikroskopie (20x Vergrößerung).

## 4.2 Einfluss von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Proliferation von BON-1- und QGP-1-Zellen

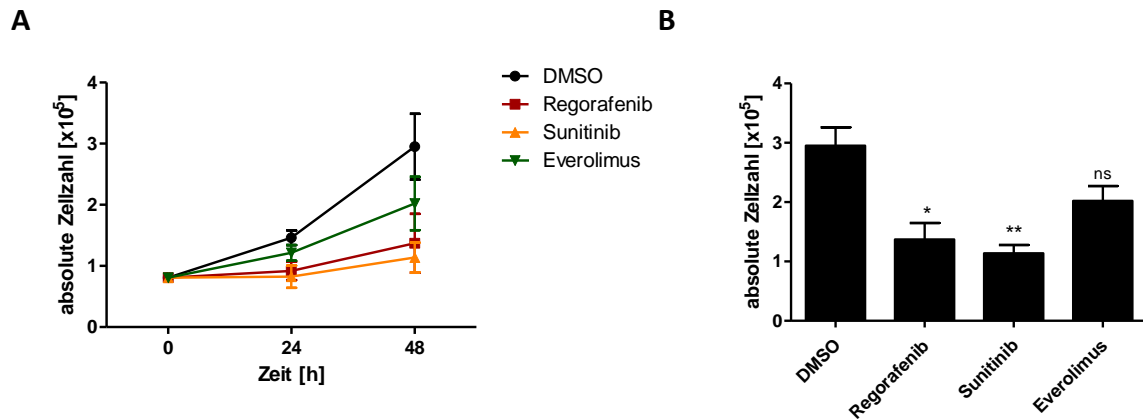
Da die Viabilität, gemessen an dem ATP-Gehalt der Zellen, unter den eingesetzten Inhibitoren reduziert war und gleichzeitig eine Zellzahlreduktion im Lichtmikroskop beobachten wurde, sollte in den nächsten Experimenten analysiert werden, ob dieser Effekt auf eine Proliferationsinhibition oder eine Induktion von Apoptose zurückzuführen ist.

Dazu wurden BON-1- und QGP-1-Zellen für 24h und 48h mit 6µM Regorafenib, 10µM Sunitinib und 1µM Everolimus behandelt. Am Tag der Behandlung wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dieser Wert stellte den Ausgangswert (0h) dar.

In Abbildung 4A ist im Zeitverlauf zu erkennen, dass alle drei Inhibitoren in den BON-1-Zellen zu einer Reduktion der Proliferationsrate führten, wobei Everolimus die geringsten und Sunitinib die stärksten



Effekte zeigte. In Abbildung 4B ist die Zellzahl nach 48h im Balkendiagramm gesondert dargestellt. Ausgehend von einer Gesamtzellzahl zum Zeitpunkt der Behandlung (0h) von  $0,8 \times 10^5$  wurden nach 48h in der DMSO-Gruppe  $3 \times 10^5$ , in der Regorafenib-Gruppe  $1,4 \times 10^5$ , in der Sunitinib-Gruppe  $1,1 \times 10^5$  und in der Everolimus-Gruppe  $2 \times 10^5$  gezählt.



**Abbildung 4: Zeit- und dosisabhängige Reduktion der Proliferation durch Regorafenib, Sunitinib und Everolimus in BON-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 24-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO, 6  $\mu$ M Regorafenib, 10  $\mu$ M Sunitinib und 1  $\mu$ M Everolimus behandelt. **(A)** Bestimmung der Zellzahl nach 24h und 48h im Zeitverlauf und **(B)** Darstellung des 48h-Wertes im Balkendiagramm mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; ns nicht signifikant).

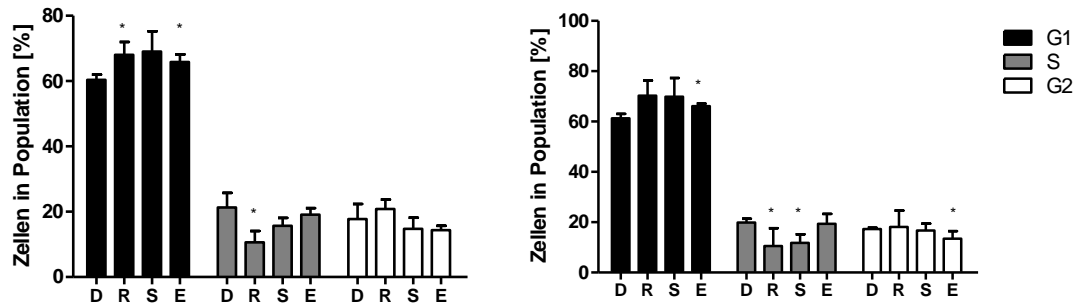
Im Anschluss an die Bestimmung der Zellzahl wurden Zellzyklus-Analysen mittels Propidium-Iodid-Färbung durchgeführt. Diese Methode ermöglicht den DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch zu bestimmen. Da die Intensität des Propidium-Iodid-Farbstoffs proportional zum DNA-Gehalt ist, kann die G1-Phase (einfacher Chromosomensatz) von der G2-Phase (doppelter Chromosomensatz) und der S-Phase (intermediärer Chromosomensatz) unterschieden werden.

Im Einklang mit den Viabilitäts-Daten führte die Behandlung der BON-1-Zellen mit Regorafenib, Sunitinib und Everolimus zu einer zeit- und dosisabhängigen Reduktion der S-Phase mit einem gleichzeitigen Anstieg der G1-Phase (G1-Arrest). Während sich in der DMSO-Gruppe nach einer Behandlung von 48h 20% der Zellen in der S-Phase befanden, betrug dies unter Regorafenib 10%, unter Sunitinib 12% und unter Everolimus 19% (Abbildung 5A). Der Effekt von Regorafenib auf die Proliferation, gemessen an der S-Phase des Zellzyklus, war im Vergleich zu Sunitinib und Everolimus erneut am stärksten.

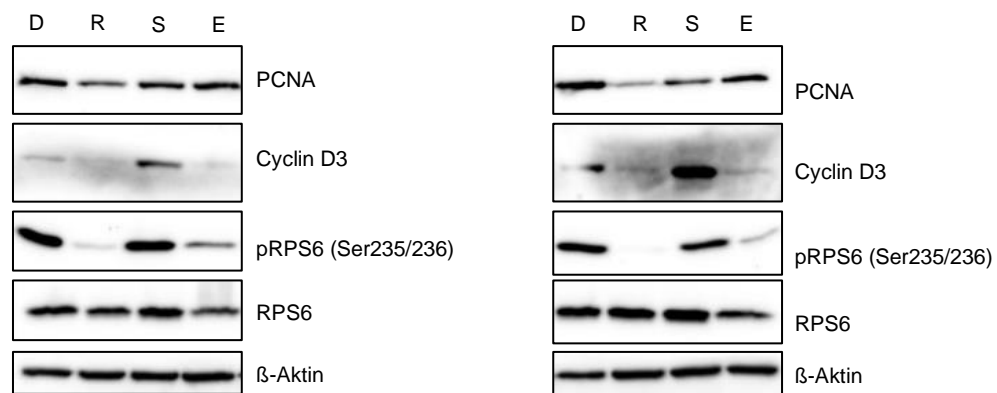
Western Blot-Analysen von BON-1-Zellen nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit Regorafenib, Sunitinib und Everolimus konnten die Zellzyklus-Ergebnisse bestätigen. Regorafenib übte durch die Inhibierung von PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*), Cyclin D3 und phosphoryliertem RPS6 (*Ribosomal protein S6*) einen Einfluss auf die Proliferation und Proteintranslation aus. Sunitinib hatte über die Inhibierung von PCNA lediglich einen Effekt auf die Proliferation. Cyclin D3 und pRPS6 schienen

hingegen unbeeinflusst. Everolimus übte als mTOR-Inhibitor erwartungsgemäß über die Inhibition von RPS6 einen Einfluss auf die Proteintranslation aus (Abbildung 5B).

**A**

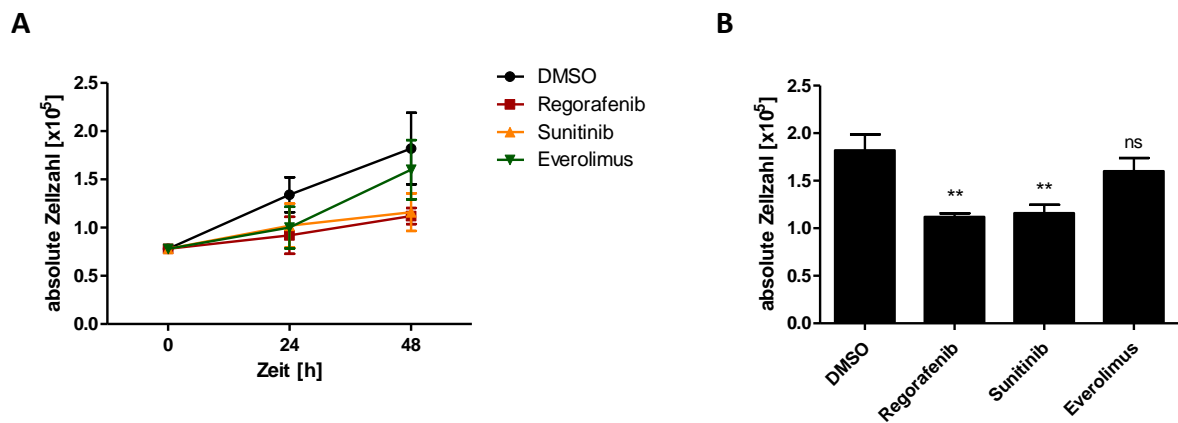


**B**



**Abbildung 5: Effekte von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Proliferation in BON-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO (D), 6µM Regorafenib (R), 10µM Sunitinib (S) und 1µM Everolimus (E) für 24h und 48h behandelt. **(A)** Durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus mit Darstellung des prozentualen Anteils von Zellen in der G1-, S- und G2-Phase und Angabe von Mittelwert und Standardabweichung. Die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\* $p < 0,05$ ). **(B)** Repräsentative Western Blot-Analyse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zur Untersuchung der Proliferation von BON-1-Zellen nach einer Behandlung mit 0,1% DMSO, 6µM Regorafenib, 10µM Sunitinib und 1µM Everolimus für 24h und 48h.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

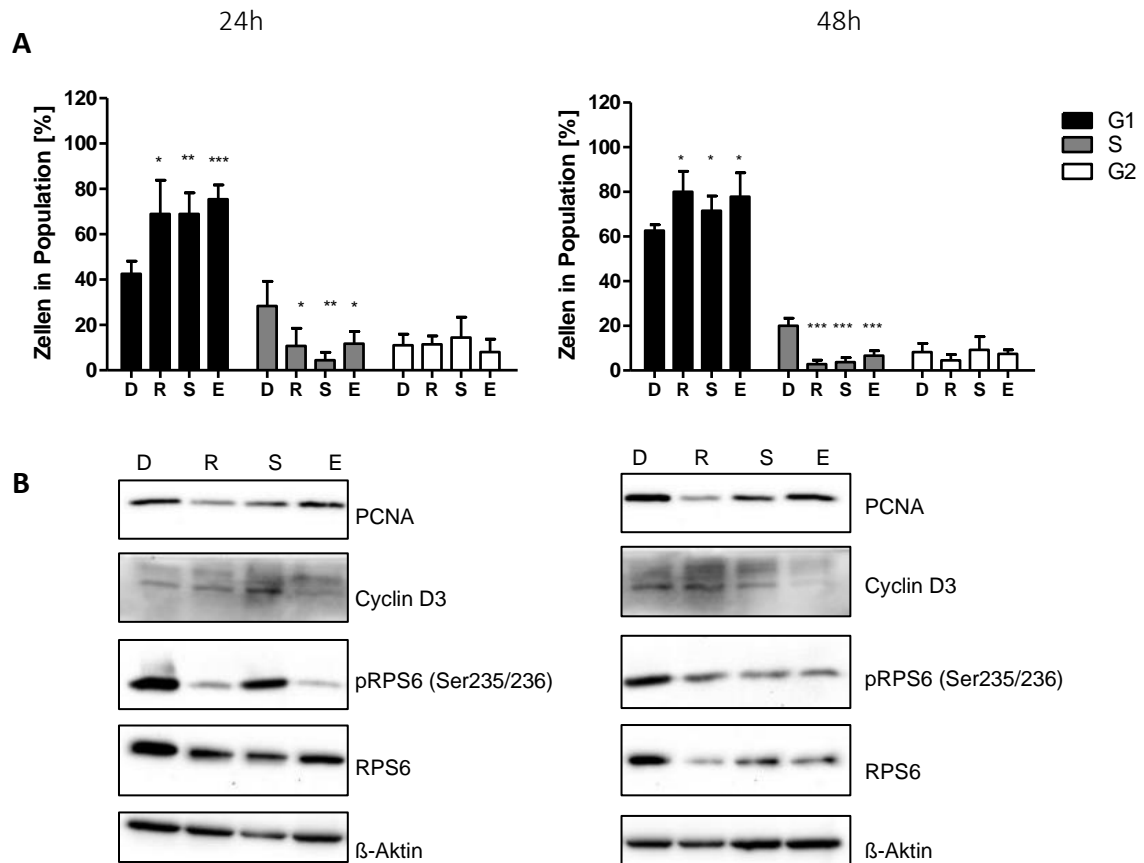
Vergleichbar zu den Daten der BON-1-Zellen war auch in den QGP-1-Zellen eine gesenkte Proliferationsrate unter allen drei Inhibitoren nach 24h und 48h zu erkennen (Abbildung 6). Im Vergleich zur DMSO-Gruppe, in der die Gesamtzellzahl nach 48h bei  $1,8 \times 10^5$  lag, betrug diese unter Regorafenib  $1,1 \times 10^5$  und unter Sunitinib  $1,2 \times 10^5$ . Everolimus zeigte nach 48h wiederholt die schwächsten Effekte auf die Proliferation ( $1,6 \times 10^5$ ).



**Abbildung 6: Zeit- und dosisabhängige Reduktion der Proliferation durch Regorafenib, Sunitinib und Everolimus in QGP-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1  $\mu$ M Everolimus behandelt. **(A)** Bestimmung der Zellzahl nach 24h und 48h im Zeitverlauf und **(B)** Darstellung des 48h-Wertes im Balkendiagramm mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\*\* $p < 0,01$ ; ns nicht signifikant).

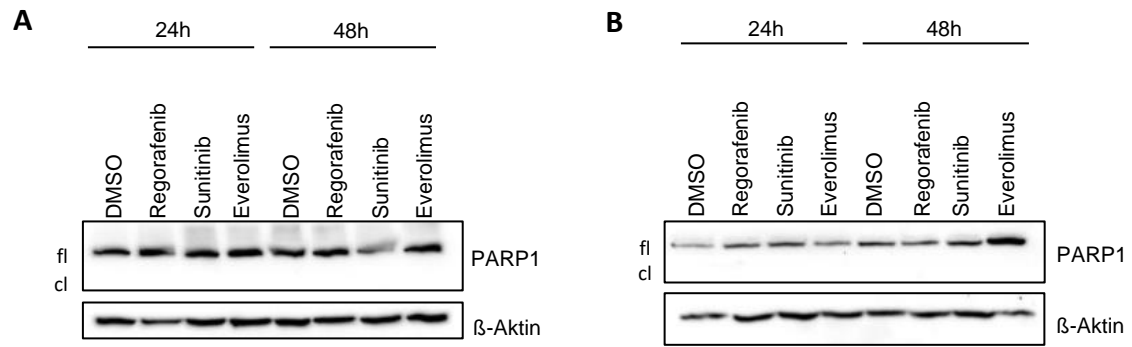
Im Anschluss an die Bestimmung der Zellzahl wurden in den QGP-1-Zellen ebenfalls Zellzyklus-Analysen durchgeführt (Abbildung 7). Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zu den BON-1-Zellen. Alle drei Inhibitoren führten nach 24h und 48h zu einer starken Reduktion der S-Phase und einem einhergehenden G1-Arrest. Während sich unter der DMSO-Behandlung 20% der Zellen in der S-Phase befanden, betrug diese unter 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1 $\mu$ M Everolimus lediglich 3%, 4% bzw. 7% (Abbildung 7A).

In den folgenden Western Blot-Analysen mit QGP-1-Proteinlysaten nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1 $\mu$ M Everolimus konnte ein inhibierender Effekt von Regorafenib auf die Proliferation (PCNA und Cyclin D3) und die Proteintranslation (RPS6) nachgewiesen werden. Während die Effekte von Sunitinib auf die Proliferation nur schwach waren, wurde insbesondere die Proteintranslation nach 48h deutlich inhibiert. Der Effekt von Everolimus lag erneut ausschließlich auf der Inhibierung der Proteintranslation. Im Vergleich zu den BON-1-Zellen führten in den QGP-1-Zellen alle drei Inhibitoren zur Reduktion des RPS6-Gesamtproteins. Hierbei kann die geringe Phosphorylierung von RPS6 auch auf die reduzierte Gesamtmenge von RPS6 zurückgeführt werden (Abbildung 7B).



**Abbildung 7: Effekte von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Proliferation in QGP-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO (D), 6 $\mu$ M Regorafenib (R), 10 $\mu$ M Sunitinib (S) und 1 $\mu$ M Everolimus (E) für 24h und 48h behandelt. **(A)** Durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus mit Darstellung des prozentualen Anteils von Zellen in der G1-, S- und G2-Phase und Angabe von Mittelwert und Standardabweichung. Die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001). **(B)** Repräsentative Western Blot-Analyse aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zur Untersuchung der Proliferation von BON-1-Zellen nach einer Behandlung mit 0,1%DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1 $\mu$ M Everolimus für 24h und 48h.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Nach diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die Reduktion der Zellzahl neben einer verminderten Proliferation auch auf das Absterben der Zellen durch eine Apoptose-Induktion zurück zu führen ist. Es wurden daher Western Blot-Analysen mit Proteinlysaten von BON-1- und QGP-1-Zellen nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit Regorafenib, Sunitinib und Everolimus durchgeführt. Das Enzym PARP1 (Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase1) ist ein Substrat diverser Caspasen, dessen enzymatische Spaltung ein Kennzeichen von Apoptose ist. Das Auftreten von PARP1-Spaltprodukten dient daher zum Nachweis der Apoptose. Die Western Blot-Ergebnisse zeigten jedoch, dass alle drei Inhibitoren aufgrund der fehlenden PARP1-Spaltung zu keiner Induktion von Apoptose führten (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Western Blot-Analyse zur Darstellung von PARP1.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24 und 48 Stunden mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1 $\mu$ M Everolimus behandelt. Die Proteinlysate der BON-1-Zellen **(A)** und QGP-1-Zellen **(B)** wurden hinsichtlich des Apoptose-Markers PARP1 untersucht (fl=full length, cl=cleaved).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Western Blot-Analyse stellt repräsentativ eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

### 4.3 Einfluss von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf den Metabolismus von BON-1- und QGP-1-Zellen

Zellen gelangen über zwei zelluläre Wege an Energie - die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) und die Glykolyse. Nach der Aufnahme von Substraten wie Glucose, Fettsäuren und Glutamin entstehen über intrazelluläre biochemische Reaktionen ATP und diverse Nebenprodukte wie CO<sub>2</sub>. Grundlegende Eigenschaften dieser metabolischen Prozesse und dessen Veränderungen durch die Zugabe von Inhibitoren können durch die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR: *Oxygen consumption rate*) und der Glykolyserate festgestellt werden. Die OCR dient dabei als ein Indikator für die mitochondriale Respiration. In der Glykolyse wird ATP über die Umwandlung von Glucose zu Lactat, unabhängig von Sauerstoff, generiert. Die Glykolyserate wird daher über die entstehenden Protonen anhand der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR: *extracellular acidification rate*) bestimmt.

#### 4.3.1 Effekt von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die mitochondriale Atmung in BON-1- und QGP-1-Zellen

Nachdem die ersten Daten bestätigt haben, dass Regorafenib, Sunitinib und Everolimus einen inhibierenden Effekt auf die Viabilität und die Proliferation in BON-1- und QGP-1-Zellen ausüben, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob dies durch eine Beeinflussung des Metabolismus vermittelt wird. Eine Hemmung der Atmungskette und einer damit verbundenen reduzierten Bereitstellung von ATP könnten die gehemmten Proliferationseigenschaften der BON-1- und QGP-1-Zellen erklären.

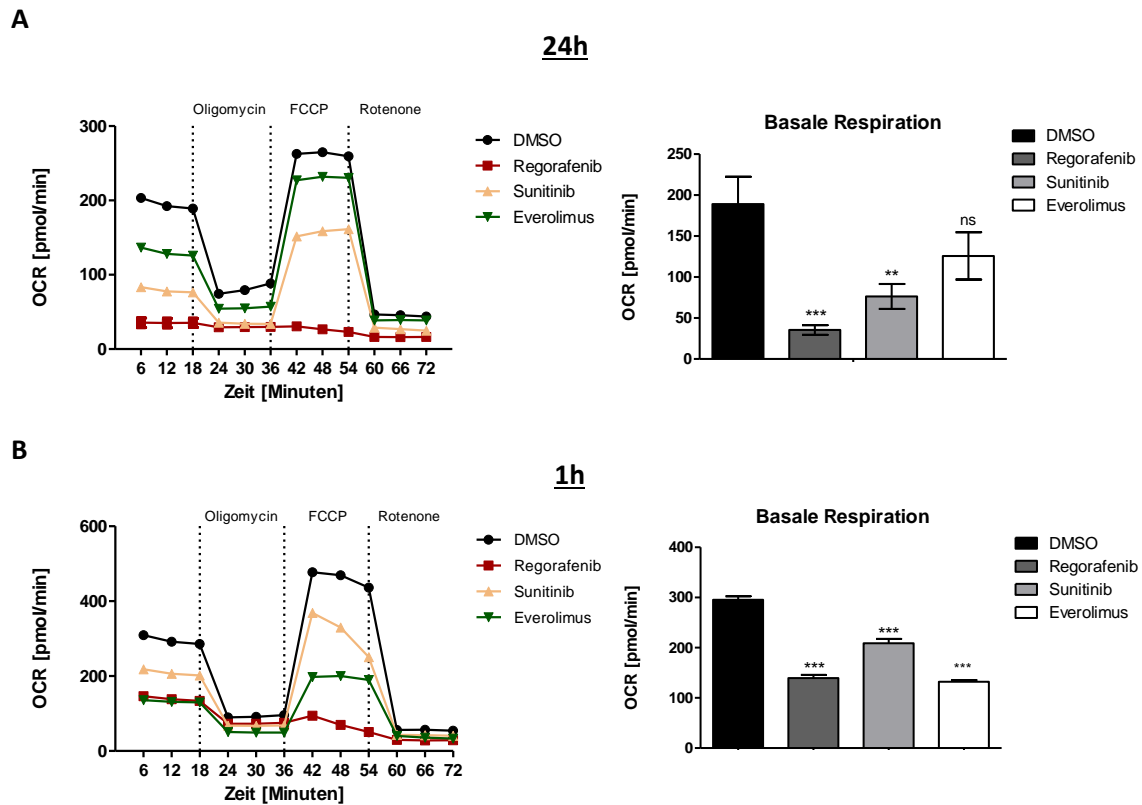
Um den Effekt von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) und die Glykolyse zu analysieren, wurden metabolische Untersuchungen mittels des *Seahorse Flux Analyzers* durchgeführt.

Dazu wurden zunächst BON-1-Zellen für 24h mit Regorafenib, Sunitinib und Everolimus behandelt. Während der Messung wurden die drei Inhibitoren Oligomycin, FCCP und Rotenone/Antimycin A in zeitlicher Abfolge zu den Zellen gegeben.

Die basale Respiration, die vor der Gabe der verschiedenen Inhibitoren gemessen wird, zeigte, dass sowohl Regorafenib als auch Sunitinib und Everolimus die OXPHOS in den BON-1-Zellen senkten, wobei diese durch Regorafenib vollständig entkoppelt wurde (Abbildung 9A). Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (180 pmol/min), lag diese mit Regorafenib bei lediglich 35 pmol/min.

Um sicher zu stellen, dass die reduzierte basale Respiration nicht auf die verminderte Zellzahl zurück zu führen ist, wurden BON-1-Zellen ebenfalls für nur 1h mit Regorafenib, Sunitinib und Everolimus behandelt (Abbildung 9B). Zu diesem Zeitpunkt können Proliferationseffekte ausgeschlossen werden. In dieser Messung konnte ebenfalls eine deutlich gesenkte basale Respiration unter allen Inhibitoren gemessen

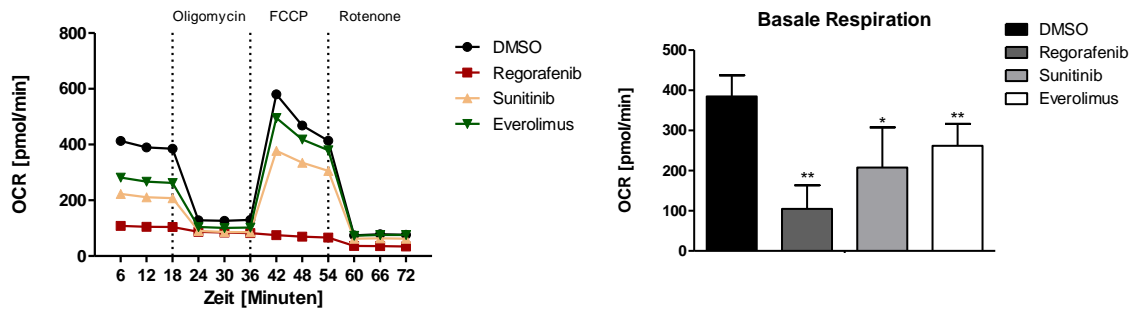
werden, die jedoch etwas schwächer ausfiel, als nach der 24-stündigen Behandlung. Diese Daten bekräftigen zum einen den zeitabhängigen Effekt der drei Inhibitoren. Zum anderen ist der Effekt auf die Atmungskette nicht auf eine reduzierte Zellzahl zurückzuführen.



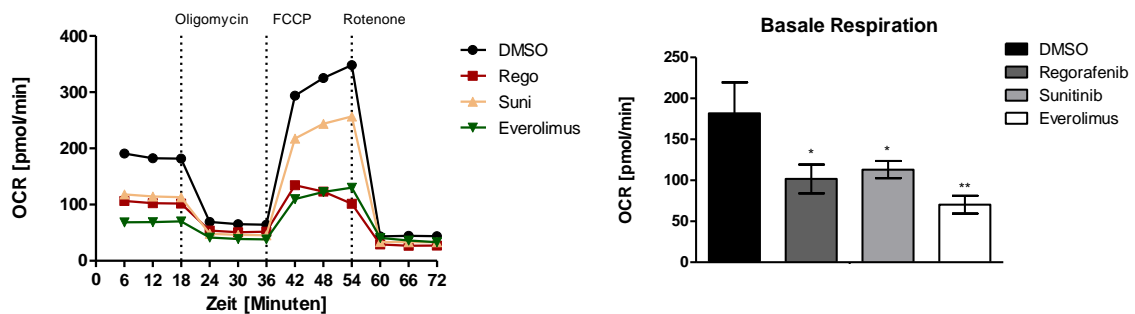
**Abbildung 9: Metabolische Untersuchung in BON-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24h und 1h mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1 $\mu$ M Everolimus behandelt. Die gestrichelten Linien zeigen den Zeitpunkt der Injektion von Oligomycin (Endkonzentration 2  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M) und Rotenone/Antimycin A (0,5  $\mu$ M). Darstellung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) im Zeitverlauf nach **(A)** 24h und **(B)** 1h. Das Balkendiagramm mit Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichung stellt die basale Respiration am dritten Messpunkt nach 18 Minuten dar. Die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns nicht signifikant).

Das beschriebene Experiment wurde ebenfalls in QGP-1-Zellen durchgeführt und die basale Respiration nach einer 1- und 24-stündigen Behandlung ermittelt. Hier zeigten sich große Parallelen zu den Ergebnissen der BON-1-Zellen. Regorafenib, Sunitinib und Everolimus senkten die mitochondriale Atmung, wobei Regorafenib erneut zu einer vollständigen Entkopplung der OXPHOS führte (Abbildung 10A). Die Effekte von Sunitinib und Everolimus fielen in den QGP-1-Zellen schwächer aus als in den BON-1-Zellen. Dieser Effekt konnte auch nach der einstündigen Behandlung beobachtet werden (Abbildung 10B). Auffällig war dennoch, dass der Effekt auf die basale Respiration durch Everolimus nach 1h stärker war als nach 24h.

A

**24h**

B

**1h**

**Abbildung 10: Metabolische Untersuchung in QGP-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24h und 1h mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1 $\mu$ M Everolimus behandelt. Die gestrichelten Linien zeigen den Zeitpunkt der Injektion von Oligomycin (Endkonzentration 2  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M) und Rotenone/Antimycin A (0,5  $\mu$ M). Darstellung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) im Zeitverlauf nach **(A)** 24h und **(B)** 1h. Das Balkendiagramm mit Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichung stellt die basale Respiration am dritten Messpunkt nach 18 Minuten dar. Die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01).

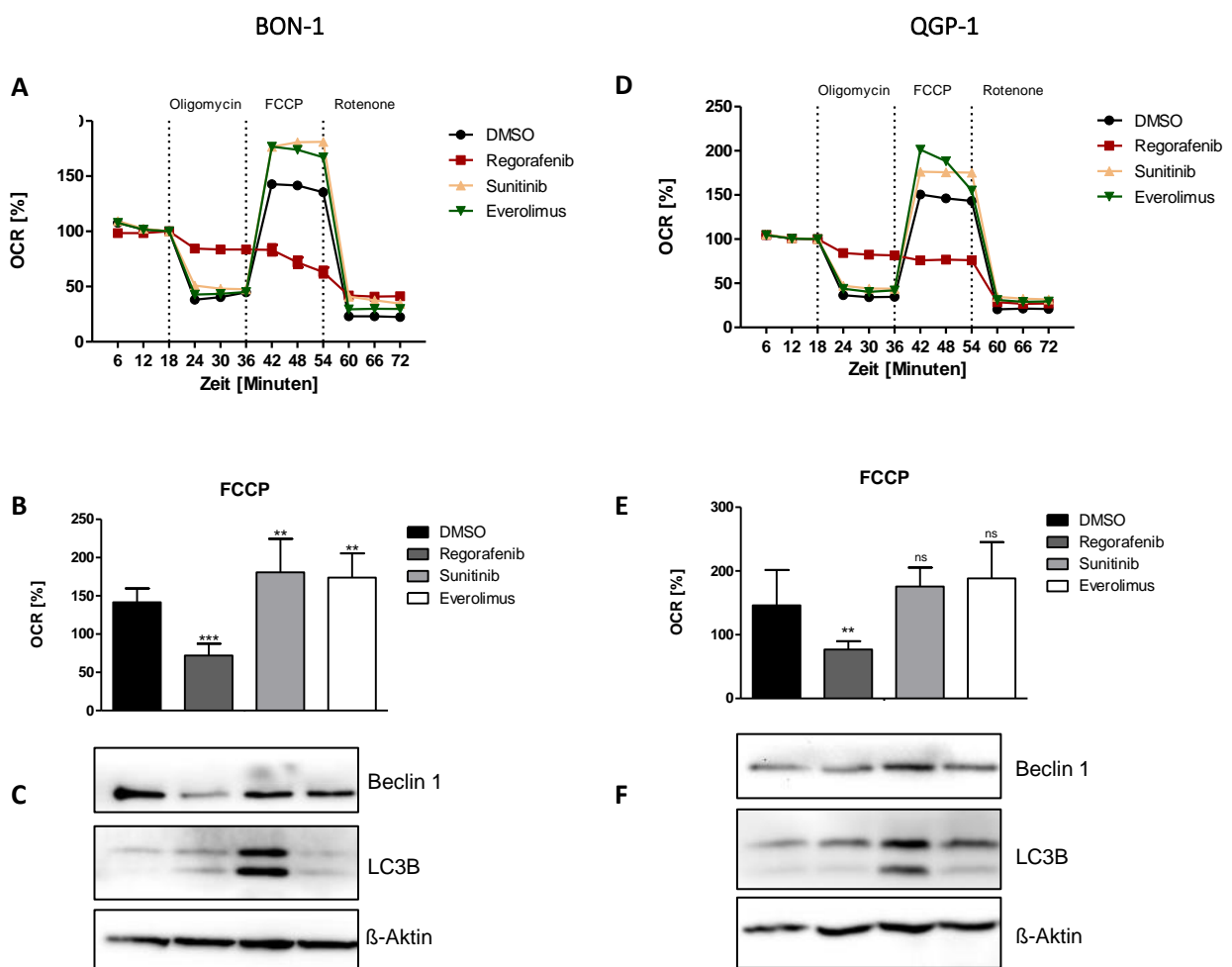
Neben der basalen Respiration kann ebenfalls eine Aussage über die maximale Respiration von Zellen getroffen werden. Durch die Zugabe des Entkopplers FCCP wird die mitochondriale Atmungskette dazu angeregt mit maximaler Kapazität zu arbeiten. Dies kann durch eine schnelle Oxidation von Substraten, wie Aminosäuren und Zucker, erreicht werden. Um die Inhibitoren miteinander vergleichen zu können, wird die Basislinie vor der ersten Injektion von Oligomycin auf 100% gesetzt. Unabhängig von der ausgehenden basalen Respiration kann so ermittelt werden, welche maximale Atmung die Zellen nach der Gabe von FCCP erreichen können. In beiden Zelllinien wurde deutlich, dass die Zellen unter der Gabe von Sunitinib und Everolimus im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach 24 Stunden eine deutlich höhere maximale Respiration erzielten. Dies ist im Kurvenverlauf und in dem Balkendiagramm, das den prozentualen OCR-Wert des 8. Messwerts darstellt, zu erkennen (Abbildung 11).

Die erhöhte maximale Respiration weist auf eine höhere Energiebereitstellung der Zellen unter der Therapie von Sunitinib und Everolimus hin. In der Literatur wird diesbezüglich häufig der Prozess der Autophagie diskutiert. Durch die Degradation und das Recyceln von Proteinen und Organellen stellt dieser



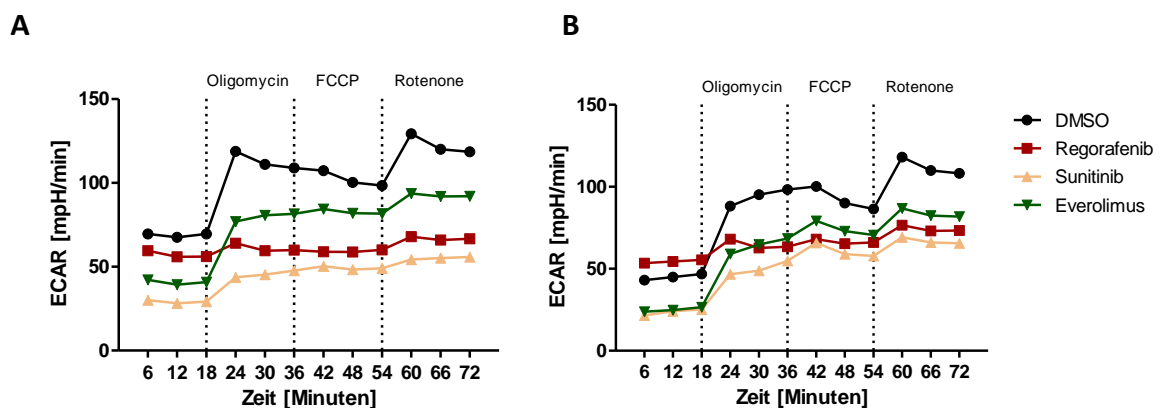
Prozess einen wichtigen Überlebensmechanismus von Tumorzellen unter erhöhtem zellulärem Stress wie Hypoxie oder therapeutischer Inhibition dar. Insbesondere Sunitinib und Everolimus wurden in diversen Studien sowohl in PNETs als auch in weiteren Zellsystemen bereits als Induktor der Autophagie beschrieben (Avniel-Polak *et al.* 2016, de Vorkin *et al.* 2017, Wiedmer *et al.* 2017).

In weiterführenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob die Autophagie-Induktion unter der Therapie die erhöhte maximale Atmung in den BON-1- und QGP-1-Zellen erklären kann. In Western Blot Analysen konnte dabei eine erhöhte Expression der Autophagiemarker Beclin 1 und LC3B (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) unter der Behandlung von Sunitinib nachgewiesen werden.



**Abbildung 11: Sunitinib und Everolimus induzieren eine erhöhte maximale Respiration in BON-1-Zellen und QGP-1-Zellen.** Die BON-1-Zellen (A-C) und QGP-1-Zellen (D-F) wurden wie vorher beschrieben in einer 96-Well-Platte bzw. 6-Well-Platte (Western Blot Analyse) ausgesät und für 24h mit 0,1% DMSO, 6µM Regorafenib, 10µM Sunitinib und 1µM Everolimus behandelt. Die gestrichelten Linien zeigen den Zeitpunkt der Injektion von Oligomycin (Endkonzentration 2 µM), FCCP (1 µM) und Rotenone/Antimycin A (0,5 µM). **(A+D)** Darstellung der OXPHOS im Zeitverlauf mit der Angabe der prozentualen OCR-Werte und des Mittelwerts. **(B+E)** Das Balkendiagramm mit Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichung ( $\pm$ SD) stellt die maximale Respiration nach der FCCP-Gabe am 8. Messpunkt nach 48 Minuten dar (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; ns nicht signifikant). **(C+F)** Die Western Blot-Analyse zur Expression der Autophagie-Marker Beclin 1 und LC3B stellt repräsentativ eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Nachdem ein deutlicher Effekt von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die mitochondriale Atmungskette gemessen werden konnte, sollte anschließend der Einfluss auf die Glykolyse untersucht werden. Dabei stellte sich die Frage, ob die Energiegewinnung von ATP nun durch die Glykolyse kompensiert werden kann oder diese ebenfalls inhibiert wird. Die Daten in Abbildung 12 zeigen, dass die Glykolyserate in den BON-1- und QGP-1-Zellen durch alle drei Inhibitoren ebenfalls reduziert wurde. Während der Kurvenverlauf der Zellen unter der Regorafenib-Behandlung nahezu gerade verläuft, ist unter Sunitinib und Everolimus nach der Injektion von Oligomycin, FCCP und Rotenone ein leichter Anstieg der ECAR zu erkennen (Abbildung 12). Neben der erhöhten maximalen Atmung könnte die alternative Energiegewinnung über die Glykolyse einen zusätzlichen kompensatorischen Weg der Zellen unter der Therapie mit Sunitinib und Everolimus darstellen.



**Abbildung 12: Regorafenib, Sunitinib und Everolimus senken die Glykolyserate in BON-1- und QGP-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24h mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1 $\mu$ M Everolimus behandelt. Die gestrichelten Linien zeigen den Zeitpunkt der Injektion von Oligomycin (Endkonzentration 2  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M) und Rotenone/Antimycin A (0,5  $\mu$ M). Darstellung der Extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) in [mpH/min] nach einer 24-stündigen Behandlung mit 6 $\mu$ M Regorafenib, 10 $\mu$ M Sunitinib und 1  $\mu$ M Everolimus im Zeitverlauf in BON-1-Zellen (A) und QGP-1-Zellen (B).

In den Experimenten zur Charakterisierung des Effekts von Regorafenib *in vitro* konnte der Multityrosinkinase-Inhibitor in den humanen PNET-Zelllinien BON-1 und QGP-1 eine deutliche Inhibierung auf die Proliferation, die Proteintranslation und den Metabolismus aufzeigen. Die Effekte von Regorafenib waren außerdem deutlich ausgeprägter als von Sunitinib und Everolimus.

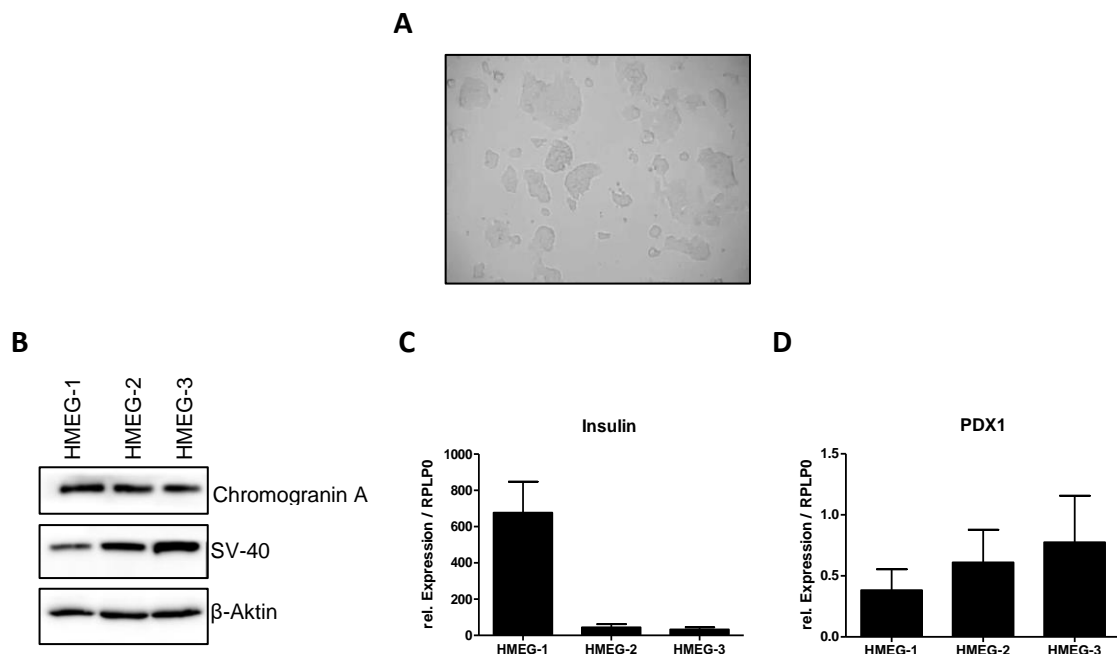
## 4.4 Isolation von murinen $\beta$ -Tumorzellen

Im Hinblick auf die Untersuchungen von Regorafenib in dem transgenen RIP1Tag2-Mausmodell, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei murine  $\beta$ -Tumorzelllinien aus der RIP1Tag2-Maus isoliert und für Zellkulturarbeiten etabliert. Die hier genannten HMEG-Zelllinien dienen dazu den Effekt von Regorafenib neben dem humanen auch im murinen System zu untersuchen und um Vorhersagen für die *in vivo* Untersuchungen treffen zu können.

### 4.4.1 Charakterisierung der HMEG-Zelllinien

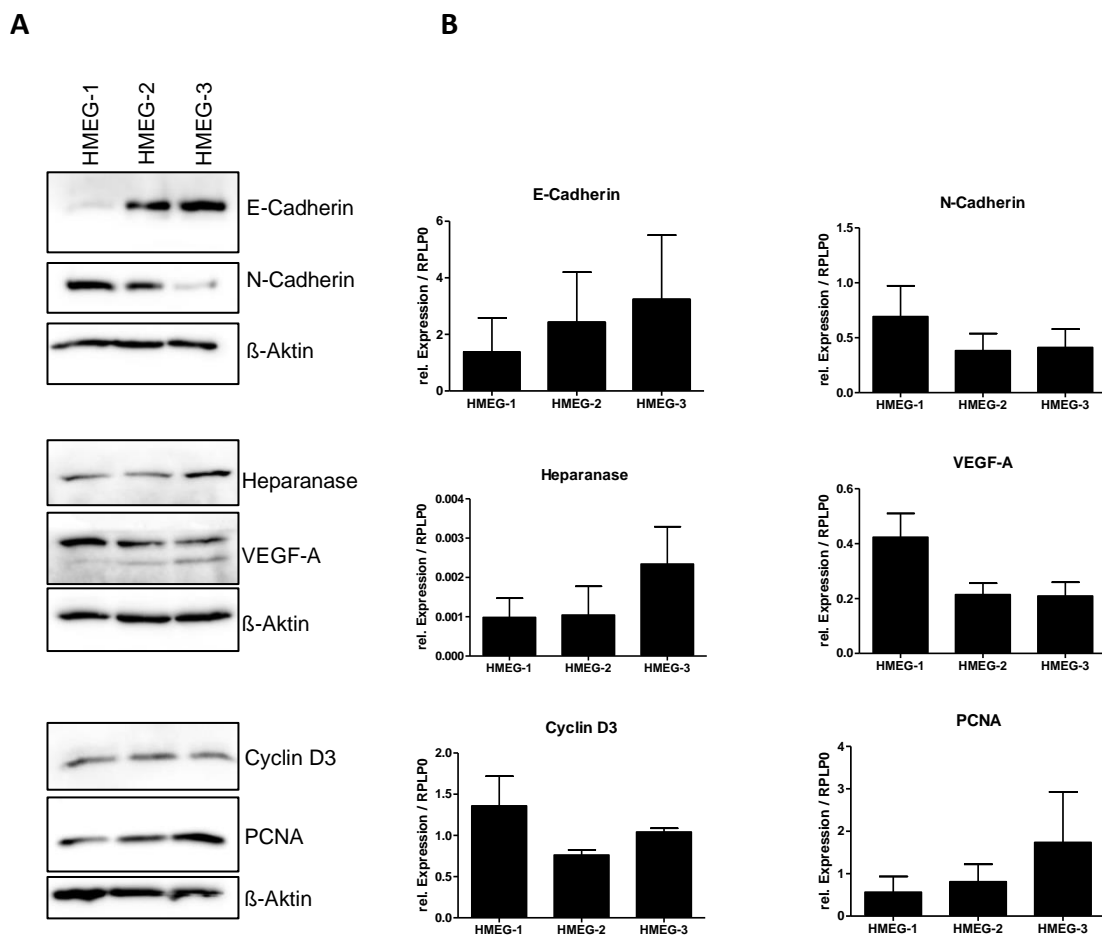
Nach der Isolation von Insulinomen aus dem Pankreas von zwei 15 und einer 17 Wochen alten RIP1Tag2-Maus wurden diese in Kultur gebracht. Durch mehrmaliges Passagieren und der Eliminierung von Fibroblasten konnten die drei murinen  $\beta$ -Tumorzelllinien HMEG-1, -2 und -3 erfolgreich etabliert werden. In Abbildung 13A ist exemplarisch und repräsentativ die lichtmikroskopische Aufnahme der HMEG-1-Zellen dargestellt.

Anhand der Expression des neuroendokrinen Markers Chromogranin A und SV-40 auf Proteinebene (Abbildung 13B) sowie der Expression von Insulin und PDX1 auf RNA-Ebene (Abbildung 13C+D) konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den etablierten Zellen um funktionelle  $\beta$ -Tumorzelllinien handelt.



**Abbildung 13: Etablierung von drei murinen  $\beta$ -Tumorzelllinien aus der RIP1Tag2-Maus.** Nach der Entnahme und Kultivierung der murinen  $\beta$ -Tumorzellen wurden **(A)** repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der HMEG-1-Zellen erstellt. **(B)** Repräsentative Western Blot-Analysen zum Nachweis von Chromogranin A und SV-40 von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle. Expressionsanalyse von Insulin **(C)** und PDX1 **(D)** auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR, normiert auf den Gehalt von RPLP0, mit Angabe der Standardabweichung ( $\pm$ SD) aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Im Anschluss folgten zur genaueren Charakterisierung der HMEG-Zelllinien weitere Western Blot-Analysen. Dabei lag der Fokus insbesondere auf dem Differenzierungsstatus, der Angiogenität und Invasivität, sowie der Proliferation. Im EMT-Status zeigte sich zwischen den drei Zelllinien ein großer Unterschied. Während die HMEG-1-Zellen keine Expression des epithelialen Markers E-Cadherin, aber eine erhöhte Expression des mesenchymalen Markers N-Cadherin aufwies, war dies konträr zu den HMEG 2- und HMEG-3-Zellen. Dies konnte auf RNA-Ebene bestätigt werden. In Hinsicht auf die Expression von Heparanase, VEGF-A und den Proliferationsmarkern CyclinD3 und PCNA konnten keine bedeutenden Unterschiede innerhalb der drei  $\beta$ -Tumorzelllinien festgestellt werden (Abbildung 14).

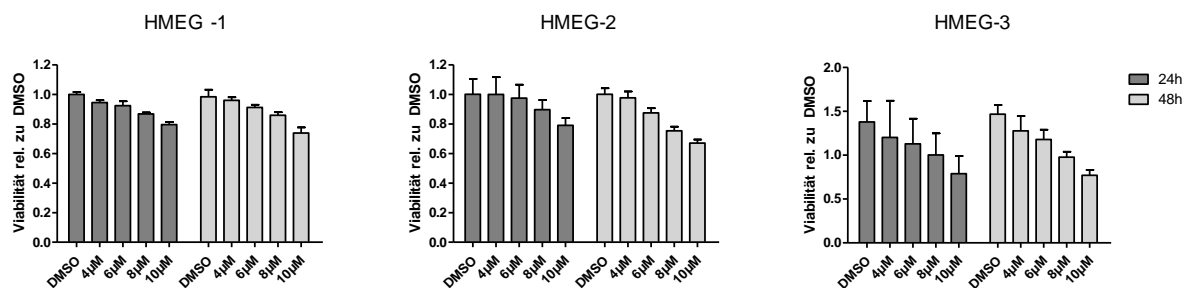


**Abbildung 14: Charakterisierung der murinen  $\beta$ -Tumorzelllinien.** Bestimmung der Expression von Differenzierungs-, Invasions- und Proliferationsmarkern mittels Western Blot-Analysen (**A**) und qRT-PCR-Analysen (**B**). Die Western Blot-Abbildungen stehen dabei repräsentativ für einen von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Daten, normiert auf den Gehalt von RPLP0, geben den Mittelwert mit den berechneten Standardfehlern ( $\pm$ SEM) aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten an.

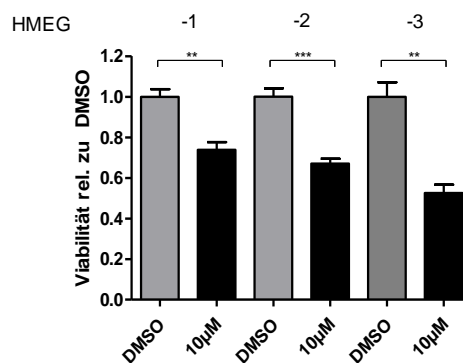
#### 4.4.2 Regorafenib senkt die Viabilität von $\beta$ -Tumorzellen zeit- und dosisabhängig

Im ersten Schritt sollte der Effekt von Regorafenib auf die Viabilität in den drei HMEG-Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit einer aufsteigenden Regorafenib-Konzentration von 4 $\mu$ M bis 10 $\mu$ M über 24h und 48h behandelt und die ATP-Konzentration mithilfe des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays* ermittelt. Regorafenib führte in allen drei Zelllinien zu einer dosis-abhängigen Reduktion der Viabilität, wobei die HMEG-1-Zellen nach 24h und 48h am schwächsten und die HMEG-3-Zellen am stärksten auf die Behandlung angesprochen haben (Abbildung 15A). Der Effekt von 10 $\mu$ M Regorafenib auf alle drei  $\beta$ -Tumorzelllinien, relativ zur DMSO-Kontrolle, ist in Abbildung 15B dargestellt. Diese Konzentration wurde für alle weiteren Versuche eingesetzt.

**A**



**B**

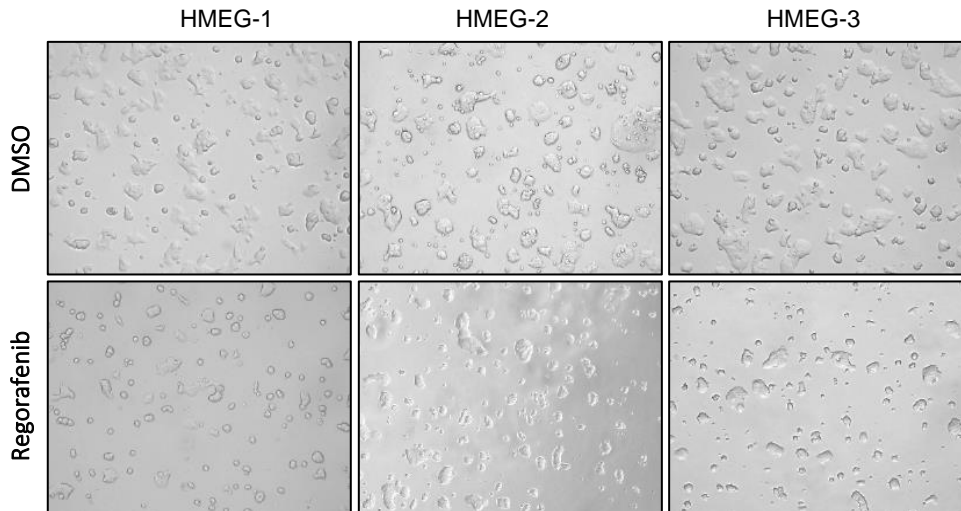


**Abbildung 15: Dosisabhängige Reduktion der Viabilität von Regorafenib in murinen  $\beta$ -Tumorzellen.**

Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24h und 48h mit 0,1% DMSO bzw. ansteigenden Regorafenib-Konzentrationen von 4 $\mu$ M – 10 $\mu$ M behandelt. **(A)** Darstellung der gemessenen Viabilität relativ zur DMSO-Kontrolle und **(B)** Vergleich der einzelnen Zelllinien untereinander nach einer 48-stündigen Inkubation mit 0,1% DMSO bzw. 10 $\mu$ M Regorafenib mit Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichungen ( $\pm$ SD) aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

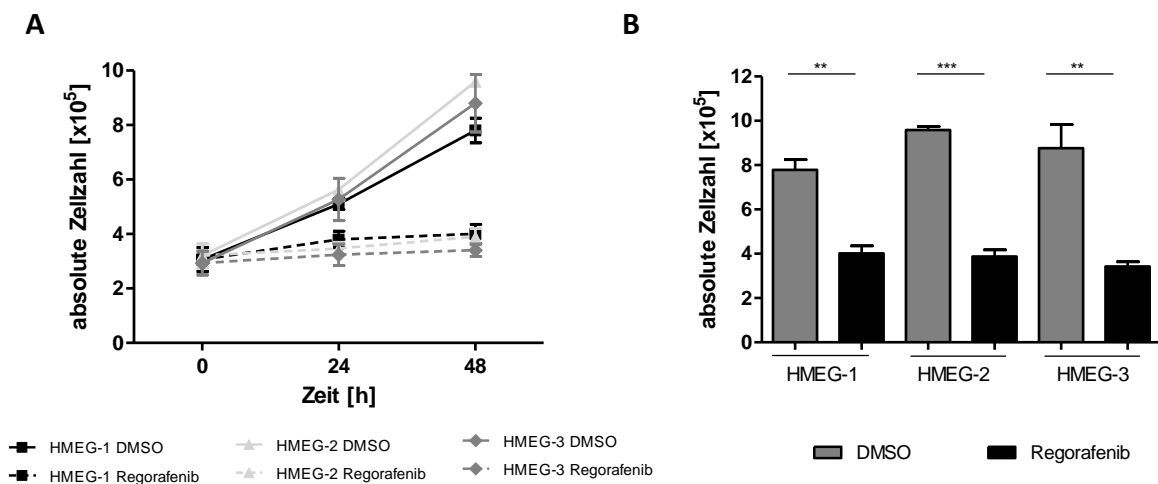
#### 4.4.3 Einfluss von Regorafenib auf die Proliferation

Anschließend sollte der Effekt von Regorafenib auf die Proliferation in den murinen  $\beta$ -Tumorzelllinien untersucht werden. Dazu wurden diese mit 10 $\mu$ M Regorafenib für 48h behandelt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Reduktion der Zellzahl ohne bedeutende Veränderungen der Zellmorphologie (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Effekt von Regorafenib auf die Proliferation der  $\beta$ -Tumorzellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und anschließend lichtmikroskopische Aufnahmen (20x Vergrößerung) nach einer Behandlung mit 0,1% DMSO bzw. 10 $\mu$ M Regorafenib für 48h erstellt.

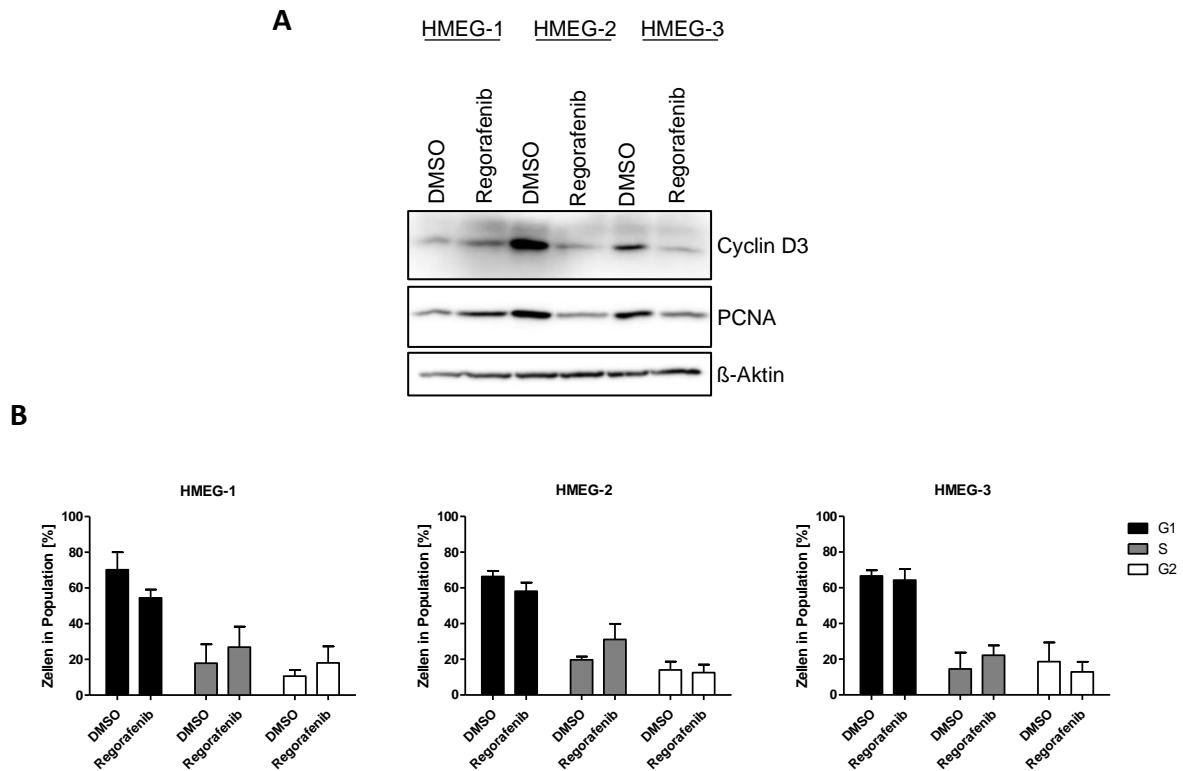
Um eine weitere Aussage über den Effekt von Regorafenib auf die Proliferation zu treffen, wurden die HMEG-Zellen für 24h und 48h mit 10 $\mu$ M Regorafenib behandelt und anschließend die Gesamtzellzahl mittels der Neubauer-Kammer bestimmt. Darin war zu erkennen, dass die Behandlung mit Regorafenib zu einer fast vollständigen Inhibition der Proliferation geführt hat (Abbildung 17). Die Gesamtzellzahl der HMEG-1-Zellen betrug nach einer 48-stündigen Behandlung unter Regorafenib  $4 \times 10^5$  im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle ( $8 \times 10^5$ ), in den HMEG-2-Zellen  $3,9 \times 10^5$  (DMSO:  $9,6 \times 10^5$ ) und in den HMEG-3-Zellen  $3,4 \times 10^5$  (DMSO:  $8,8 \times 10^5$ ).



**Abbildung 17: Zeit- und dosisabhängige Reduktion der Proliferation durch Regorafenib in den murinen  $\beta$ -Tumorzelllinien.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 12-Well-Platte ausgesät und mit DMSO bzw. 10 $\mu$ M Regorafenib für 24h und 48h behandelt. **(A)** Bestimmung der Zellzahl nach 24h und 48h im Zeitverlauf und **(B)** Angabe des 48h-Wertes im Balkendiagramm. Die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

In Western Blot-Experimenten wurde anschließend die Expression von Cyclin D3 und PCNA analysiert. Da beide Proliferationsmarker unter der Behandlung von Regorafenib deutlich reduziert waren, konnten die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung weiter bekräftigt werden (Abbildung 18A).

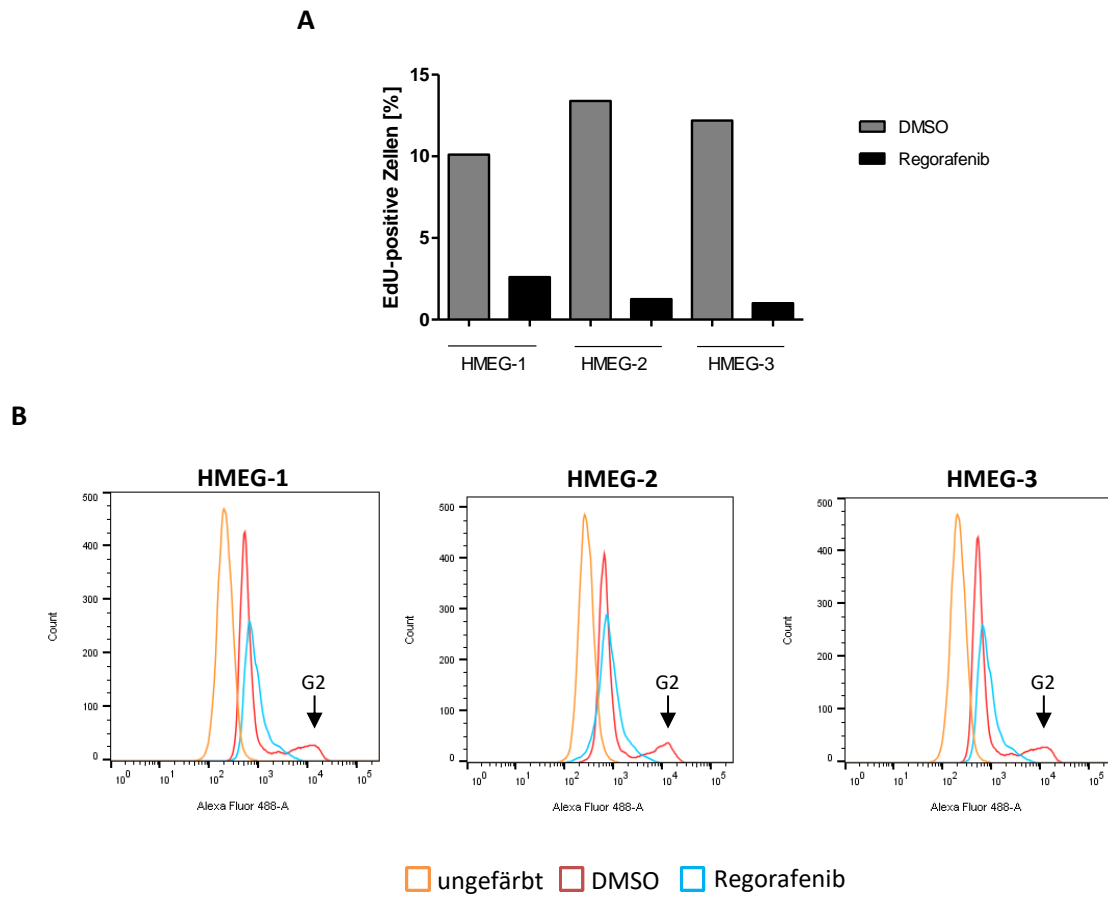
Die folgenden Zellzyklus-Analysen standen jedoch in Diskrepanz zu den zuvor ermittelten Daten. Die Behandlung mit 10 $\mu$ M Regorafenib führte nach 48h in allen drei  $\beta$ -Tumorzelllinien zu einem Anstieg der Zellen in der S-Phase im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, der jedoch nicht signifikant war (Abbildung 18B).



**Abbildung 18: Effekte von Regorafenib auf die Proliferation in den murinen  $\beta$ -Tumorzelllinien.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 48h mit DMSO bzw. 10 $\mu$ M Regorafenib behandelt. **(A)** Repräsentative Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Proliferation von HMEG-Zellen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. **(B)** Durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus mit Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen in der G1-, S- und G2-Phase und Angabe von Mittelwert und Standardabweichungen ( $\pm$ SD) aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

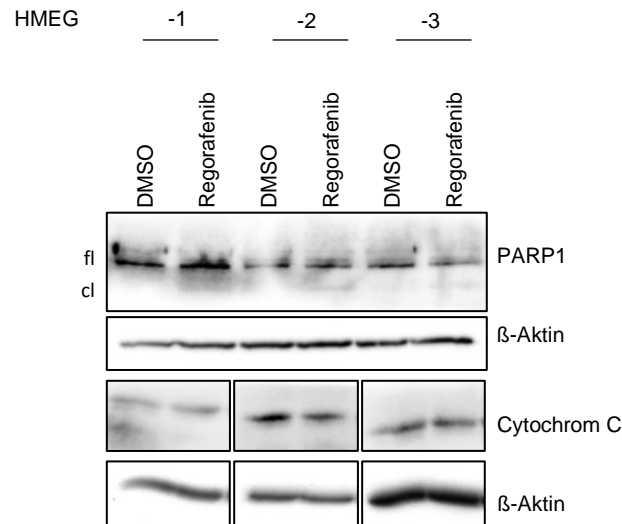
Aufbauend auf den gegensätzlichen Proliferationsdaten der Zellzahlbestimmung und der Zellzyklus-Analyse wurde eine weitere Methode angewendet, um eine eindeutigere Aussage über den Effekt von Regorafenib auf die Proliferation, insbesondere die S-Phase, der  $\beta$ -Tumorzelllinien zu treffen. Dazu wurde das Click-iT<sup>®</sup> EdU Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-Kit angewendet. Die durchflusszytometrische Auswertung ergab eine deutliche Reduktion des prozentualen Anteils der EdU-positiven und somit proliferierenden Zellen nach einer 48-stündigen Behandlung mit 10 $\mu$ M Regorafenib (Abbildung 19). Anhand der Überlagerung der Histogramm-Darstellungen war zu erkennen, dass die mit Regorafenib behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in der S-Phase akkumulieren und nicht in die G2-Phase übergehen konnten.





**Abbildung 19: Bestimmung der Proliferation von  $\beta$ -Tumorzellen mittels Click-iT<sup>®</sup> EdU.** Die HMEG-Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 48h mit DMSO bzw. 10 $\mu$ M Regorafenib behandelt. Nach einer zweistündigen Inkubation mit dem Thymidin-Analogon wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Repräsentative Darstellung des prozentualen Anteils EdU-positiver  $\beta$ -Tumorzellen im Balkendiagramm **(A)** und der gemessenen Alexa-488-Fluoreszenzsignale als Überlagerung im Histogramm **(B)**.

In der nachfolgenden Western Blot-Analyse zur Apoptosedetektion mittels PARP1 konnte nur eine andeutungsweise PARP1-Spaltung unter der Regorafenib-Behandlung in den  $\beta$ -Tumorzellen gezeigt werden. Es konnte ebenfalls keine erhöhte Cytochrom C-Freisetzung unter der Therapie festgestellt werden, sodass eine Regorafenib-induzierte Apoptose-Induktion ausgeschlossen werden kann (Abbildung 20).



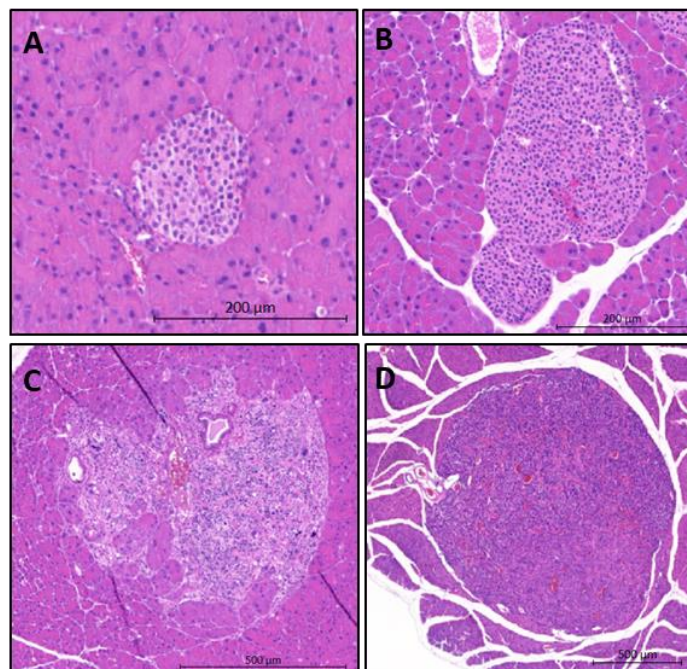
**Abbildung 20: Western Blot-Analyse zur Darstellung von PARP1 und Cytochrom C in murinen  $\beta$ -Tumorzelllinien.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 48h mit DMSO bzw. 10 $\mu$ M Regorafenib behandelt. Die Proteinlysate wurden hinsichtlich des Apoptosemarkers PARP1 und Cytochrom C untersucht (fl=full length, cl=cleaved).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Western Blot-Analyse stellt repräsentativ eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

#### 4.5 Effekte von Regorafenib im RIP1Tag2-Mausmodell

In den *in vitro*-Untersuchungen konnte der Multityrosinkinase-Inhibitor Regorafenib eine deutliche Inhibierung der Proliferation, Proteintranslation und des Metabolismus in den humanen PNET-Zelllinien BON-1 und QGP-1 erzielen. Regorafenib führte ebenfalls in den murinen  $\beta$ -Tumorzellen der RIP1Tag2-Maus zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Proliferation. Die Behandlung induzierte jedoch sowohl in den humanen als auch in den murinen Zelllinien keine Apoptose.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte anschließend der Effekt von Regorafenib in dem transgenen RIP1Tag2-Mausmodell untersucht werden, das die  $\beta$ -Zell-Karzinogenese von pankreatisch neuroendokrinen Tumoren rekapituliert. In diesem Mausmodell werden über das Onkogen SV40 large T-Antigen die Tumorsuppressoren p53 und Rb herunter reguliert. Dies führt zu einer schrittweisen Entstehung aus gesunden  $\beta$ -Zellen über hyperplastische, hochangiogene Inseln bis hin zu invasiven Tumoren.

Die Tumorprogression der RIP1Tag2-Maus ist anhand von repräsentativen Hämatoxylin-Eosin- (HE)- Färbungen in Abbildung 21 exemplarisch dargestellt. Die HE-Färbungen der RIP1Tag2-Mäuse zeigen neben einer deutlich veränderten Morphologie der Zellen in den Inseln einen Anstieg der Tumorgroße, eine erhöhte Blutgefäßdichte und das Aufbrechen der Inselkapsel als ein Anzeichen auf erhöhte Invasivität in den letzten Stadien der Tumorprogression.

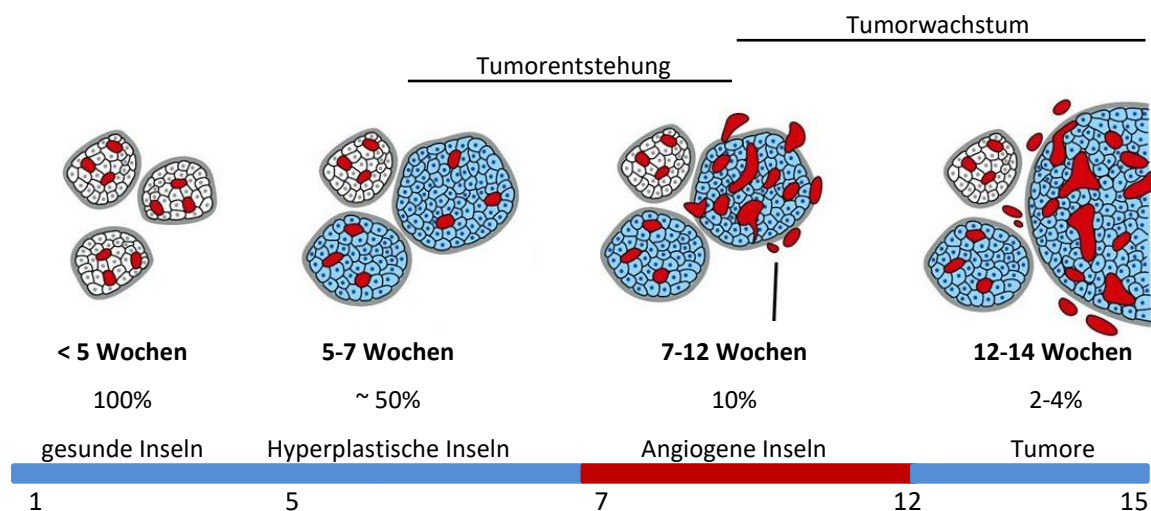


**Abbildung 21: Darstellung der Tumorprogression der RIP1Tag2-Maus.** Pankreata von RIP1Tag2-Tieren wurden entnommen und die verschiedenen Gewebestrukturen mithilfe von HE-Färbungen sichtbar gemacht. Die Tumorprogression von RIP1Tag2-Mäusen mit dem Alter von (A) 6 Wochen, (B) 9 Wochen, (C) 12 Wochen, (D) 15 Wochen ist anhand repräsentativer lichtmikroskopischer Aufnahmen (10x Vergrößerung) von gesunden Inselzellen bis hin zu invasiven Tumoren dargestellt.

#### 4.5.1 Therapieschema im RIP1Tag2-Mausmodell

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt des Multityrosinkinase-Inhibitors Regorafenib auf die Proliferation, die Angiogenese und auf Tumor-assoziierte Makrophagen im RIP1Tag2-Mausmodell untersucht werden.

Der Effekt von Regorafenib wurde in zwei verschiedenen Therapiezeiträumen untersucht. In der ersten Versuchsgruppe wurden RIP1Tag2-Mäuse von der 6. - 9. Lebenswoche behandelt. Diese Gruppe diente dazu, den Effekt von Regorafenib auf die Tumorentstehung zu untersuchen. Da von der 5. - 6. Woche der sog. „angiogene Switch“ maßgeblich zum Tumorwachstum führt, stellte sich die Frage, ob das frühe Eingreifen von anti-angiogenen Therapien die Bildung von neuen Blutgefäßen reduzieren oder gar verhindern und somit zu einer reduzierten Tumorprogression führen kann. In der zweiten Therapiegruppe wurden RIP1Tag2-Mäuse von der 9.- 15. Lebenswoche behandelt. Zu diesem Zeitpunkt haben sich bereits einige invasive Insulinome gebildet und die Tumorprogression ist deutlich fortgeschritten. Das Ziel bestand deshalb darin, zu überprüfen, ob ein spätes Eingreifen in Tumorwachstum, welches vergleichbar mit dem Stadium der Diagnose beim Menschen ist, noch einen Effekt auf die Tumorprogression sowie die Vaskularisierung und Angiogenese nimmt. Die Tumorprogression der RIP1Tag2-Mäuse und die darin eingezeichneten Therapiezeiträume sind in Abbildung 22 aufgeführt.



**Abbildung 22: Schematische Darstellung der Tumorprogression des transgenen RIP1Tag2-Mausmodells.**

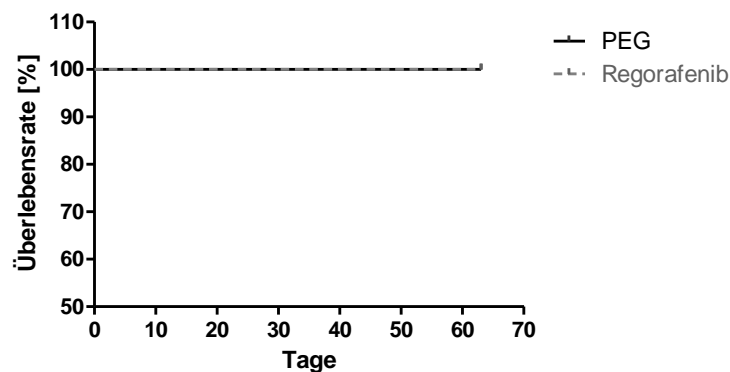
Stufenweiser Prozess der Tumorentstehung von gesunden Insulinomen (bis 5. Woche), über hyperplastische (5.- 7. Woche) und angiogene Inseln (7.-12. Woche) zu invasiven Karzinomen (12. - 14. Woche). Während der gesamten Tumorprogression steigt die Dichte der Blutgefäße (rot), wobei dieser Prozess maßgeblich durch den angiogenen Switch ab der 7. Woche (roter Balken) induziert wird. Die Studie zur Intervention der Tumorentstehung wurde von der 6. - 9. Woche und zur Intervention des Tumorwachstums von der 9. - 15. Woche durchgeführt (modifiziert nach Weinberg; Biology of Cancer 2013).

## 4.6 Effekte von Regorafenib auf die Tumorentstehung

In der Studie zum Einfluss von Regorafenib auf die Tumorentstehung wurden RIP1Tag2-Mäuse von der 6.-9. Lebenswoche behandelt. Die Regorafenib-Gruppe bestand aus 8 Mäusen (5 männlich, 3 weiblich). Regorafenib wurde über 4 Wochen lang in einer Konzentration von 10mg/kg KG/Tag in einem Volumen von 100µl über eine Schlundsonde verabreicht. Nach einer 5-tägigen Behandlungsdauer folgte eine zweitägige Pause. Die Kontrollgruppe bestand insgesamt aus 6 Mäusen (1 weiblich und 5 männlich). Sie erhielten in dem gleichen Therapieschema die Kontrollsubstanz PEG/Methansulfonsäure (Lösungsmittel von Regorafenib) ebenfalls in einem Volumen von 100µl. Die Mäuse wurden während der vollständigen Therapiedauer mithilfe des Score-Sheets überwacht und das Gewicht vor jeder Applikation ermittelt.

### 4.6.1 Überlebenskurve und Gewichtsverlauf

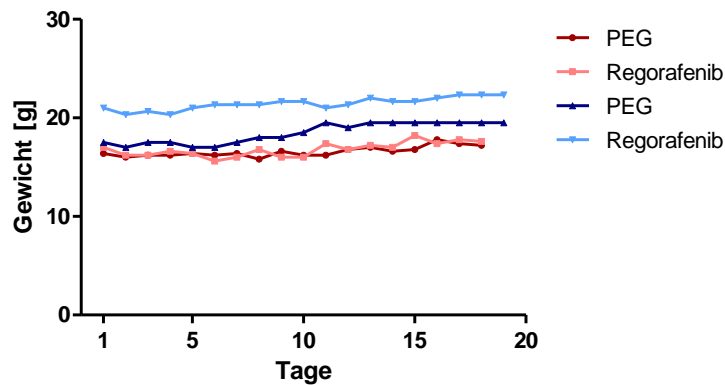
Der erste untersuchte Parameter stellte die Kaplan-Meier-Überlebenskurve dar. Die Behandlung mit Regorafenib wurde nach dem Erreichen der 9. Lebenswoche beendet. Zu diesem Zeitpunkt haben alle Tiere der Regorafenib-Gruppe bzw. PEG-Kontrollgruppe gelebt. Die Überlebensrate betrug somit in beiden Gruppen 100% (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Überlebenszeit-Analyse nach Kaplan-Meier in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.**

In dieser Studie wurden 8 Tiere mit Regorafenib und 6 Tiere mit PEG-Kontrolllösung für 4 Wochen von der 6.-9. Lebenswoche behandelt. Auf der Ordinate (y-Achse) wird der Anteil lebender Mäuse einer Behandlungsgruppe mit einer linearen Prozentskala beschrieben. Auf der Abszisse (x-Achse) wird die Überlebenszeit in Tagen angegeben.

Da über den gesamten Therapiezeitraum vor der Applikation von Regorafenib bzw. PEG das Gewicht der Mäuse dokumentiert wurde, konnte ein Gewichtsverlauf erstellt werden. Dieser zeigte ein konstantes Gewicht in beiden Behandlungsgruppen. Erwartungsgemäß waren die männlichen Mäuse etwas schwerer als die weiblichen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Gewichtsverlauf der Mäuse in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.** In dieser Studie wurden 6 Tiere mit PEG-Kontrolllösung und 8 Tiere mit Regorafenib für 4 Wochen von der 6.-9. Lebenswoche behandelt. Auf der Ordinate (y-Achse) ist die Behandlungsdauer in Tagen dargestellt, die Abszisse (x-Achse) zeigt das Gewicht der weiblichen (rot) und männlichen (blau) Mäuse in Gramm.

#### 4.6.2 Anzahl und Größe der Tumore

Ein weiterer wichtiger Parameter stellte die Anzahl und Größe der Insulinome in den RIP1Tag2-Mäusen unter der Regorafenib- bzw. PEG-Behandlung dar. Die Auswertung erfolgte anhand der HE-Färbungen und einer speziell für die Arbeitsgruppe geschriebenen Software von *TissueGnostics*. Diese Software ermöglichte es, den gesamten Gewebeschnitt zu analysieren. So konnten die Anzahl der Inseln und dessen gesamte Fläche bestimmt werden. Die Auswertung der Regorafenib- und Kontrolltiere zeigte, dass die Gesamtanzahl der Inseln in beiden Gruppen mit einer medianen Anzahl von 15,5 in der PEG-Kontrollgruppe und 16,8 in der Regorafenib-Gruppe annähernd gleich war. Es gab somit keinen signifikanten Unterschied in der Inselanzahl zwischen beiden Behandlungsgruppen ( $p=0,7$ ) (Abbildung 25).

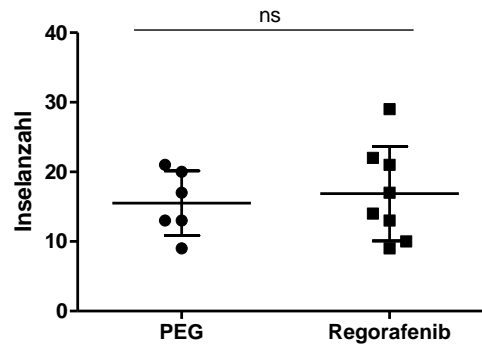


Abbildung 25: Quantifizierung der Inselanzahl in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung. Darstellung der ermittelten Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).

Im Anschluss wurde die Fläche der Inseln mithilfe der Software ermittelt. Dabei wurde deutlich, dass die Inselfläche in der Regorafenib-Gruppe mit  $1,9 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  im Vergleich zur PEG-Gruppe mit  $0,9 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  mehr als doppelt so groß war (Abbildung 26A). Da die Gesamtfläche jedes analysierten Pankreasgewebes variiert, wurde die Inselfläche auf die Gesamtfläche des Pankreas normiert. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied in der Inselfläche zwischen beiden Gruppen ermittelt werden (Abbildung 26B;  $p=0,04$ ).

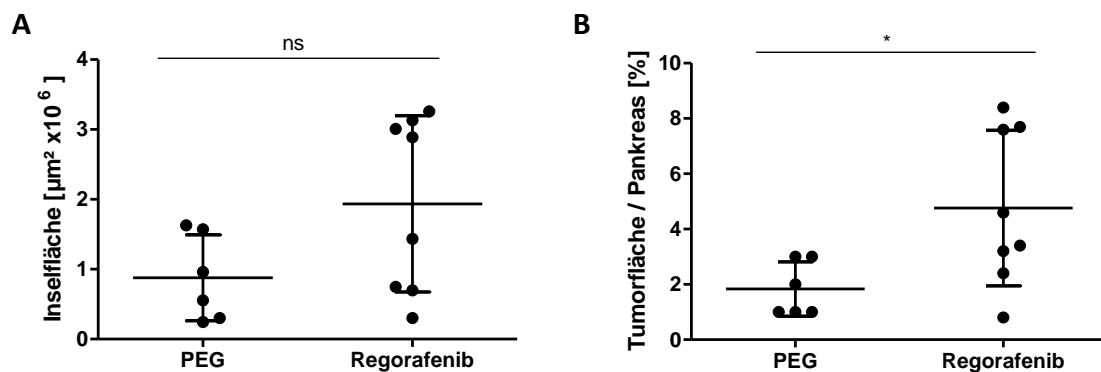


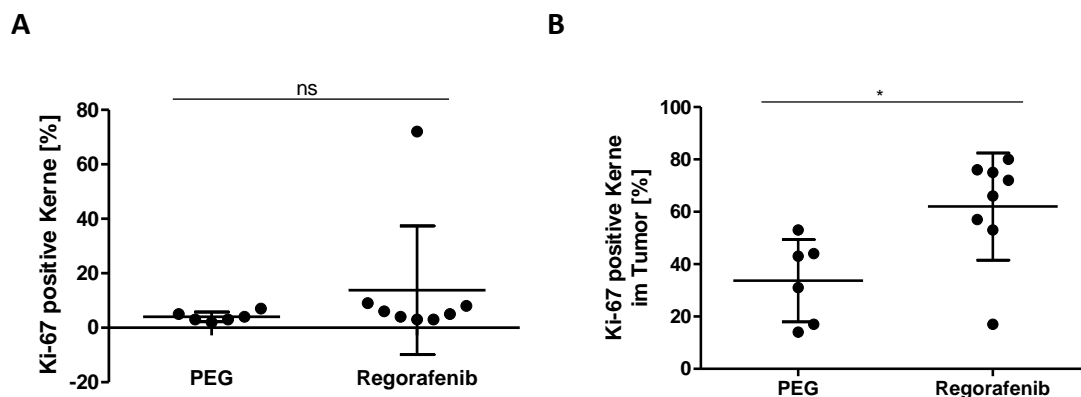
Abbildung 26: Quantifizierung der Inselfläche in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung. Darstellung der ermittelten Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und normiert auf die gesamte Gewebefläche (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (\* $p \leq 0,05$ ; ns nicht signifikant).

#### 4.6.3 Einfluss von Regorafenib auf die Proliferation von Insulinomen

Die Proliferation der Insulinome wurde mithilfe der immunhistochemischen Färbungen gegen das Ki-67-Antigen bestimmt. Da Ki-67 nur in der G1-, S-, M- und G2-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, hingegen aber nicht in der ruhenden G0-Phase, ist dies ein geeigneter Marker zum Nachweis proliferierender Zellen.

Mithilfe der Software für die Bestimmung der Ki-67-Färbung konnten zwei wesentliche Parameter ermittelt werden: die Gesamtanzahl aller Zellkerne und die Gesamtanzahl der Ki-67-positiven Zellkerne im gesamten Gewebeschnitt. Da zusätzlich auch zwischen dem gesunden exokrinen Gewebe und den Inseln (endokrines Gewebe) differenziert werden konnte, war es zusätzlich möglich die beiden Parameter ausschließlich für die Insulinome zu ermitteln.

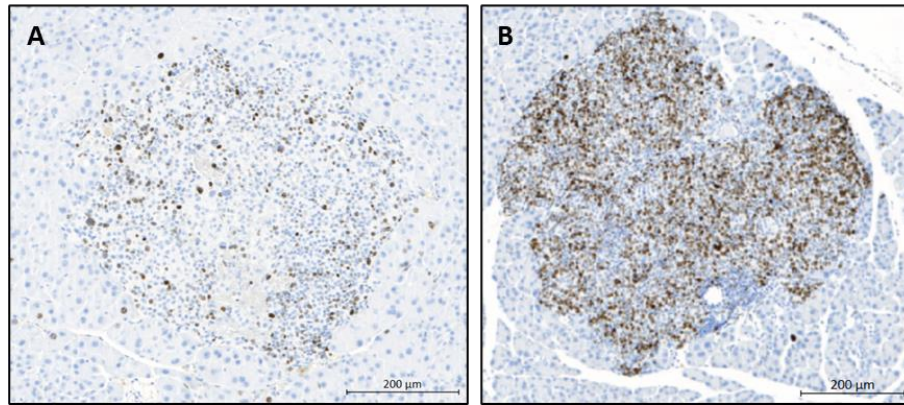
In Hinblick auf das gesamte Gewebe (Abbildung 27A) lag der prozentuale Anteil von Ki-67-positiven Zellen in der PEG-Gruppe durchschnittlich bei 4% und in der Regorafenib-Gruppe bei 13,8%. Innerhalb der Tumore konnte ein signifikant höherer Unterschied in der Anzahl der Ki-67-positiven Kernen in der Regorafenib-Gruppe (62%) im Vergleich zur PEG-Gruppe (33,7%) ermittelt werden (Abbildung 27B;  $p=0,02$ ).



**Abbildung 27: Quantifizierung der Proliferationsrate mittels Ki-67.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (**A**) und im Tumor (**B**) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (\* $p \leq 0,05$ ; ns nicht signifikant).

Die Ki-67-Färbungen in Abbildung 28 veranschaulichen diesen großen Proliferationsunterschied zwischen der PEG- und Regorafenib-Gruppe.

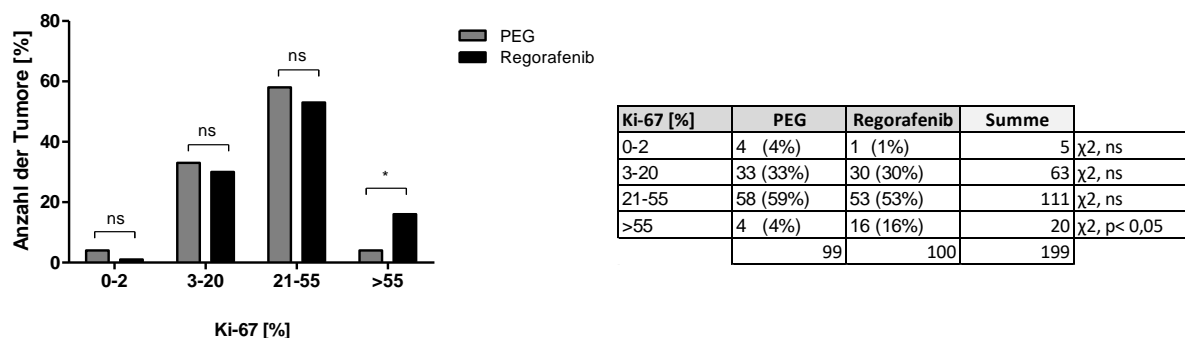




**Abbildung 28: Ki-67-Färbung von Insulinomen.** Immunhistochemische Darstellung von Ki-67 (braun) in einem repräsentativen Insulinom aus der PEG-Gruppe (A) und der Regorafenib-Gruppe (B) (10x Vergrößerung).

Auf Grundlage der WHO-Richtlinie zur Bestimmung des Differenzierungsgrades neuroendokriner Tumore aus dem Jahr 2010 wurden alle Tumore der Regorafenib- und PEG-Gruppe hinsichtlich ihres Proliferationsindex in Grade eingruppiert. Neben den G1-Tumoren (Ki-67-Index 0-2%), G2-Tumoren (3-20%) und G3-Tumoren (20-100%) wurden die G3-Tumore in dieser Arbeit weiter unterteilt. Anlass war die Nordic-NEC-Studie, die einen prognostischen Cut off-Wert bei 55% ausgemacht hat (Sorbye *et al.* 2013). Die Tumore der behandelten Tiere wurden somit neben dem G1- und G2-Grading pragmatisch zusätzlich in G3-Tumore (21-55%) und G4-Tumore (55-100%) eingeteilt.

Der prozentuale Anteil der G1- und G2-Tumore war unter der PEG- und Regorafenib-Behandlung vergleichbar. Die Auswertung ergab jedoch, dass in der Regorafenib-Gruppe 16% der Tumore einen Ki-67-Proliferationsindex von über 55% aufwiesen. In der PEG-Gruppe lag dieser nur bei 4% (Abbildung 29). Der durchgeführte Chi-Quadrat-Test konnte einen signifikanten Unterschied von Tumoren mit einem Ki-67-Index >55% in der Regorafenib-Gruppe im Vergleich zur PEG-Kontrollgruppe nachweisen.

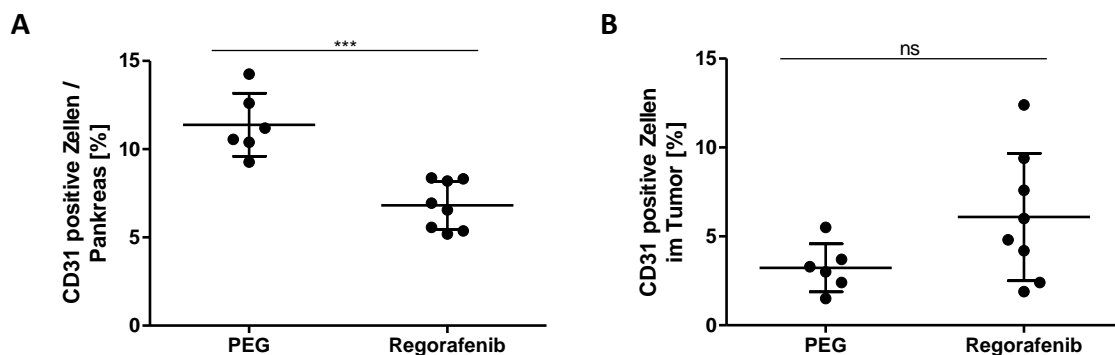


**Abbildung 29: Quantifizierung des Ki-67-Index in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.** Anhand der immunhistochemischen Ki-67-Färbungen wurde der Anteil proliferierender Ki-67-positiver Zellkerne der PEG und Regorafenib behandelten Tiere bestimmt und daraus der Ki-67-Index bestimmt. Darstellung des prozentualen Anteiles der Tumore des jeweiligen Grades (G1: 0-2%; G2: 3-20%, G3: 21-55% und G4: >55%) und Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Chi-Quadrat-Test (\*p<0,05; ns nicht signifikant).

#### 4.6.4 Einfluss von Regorafenib auf die Blutgefäße

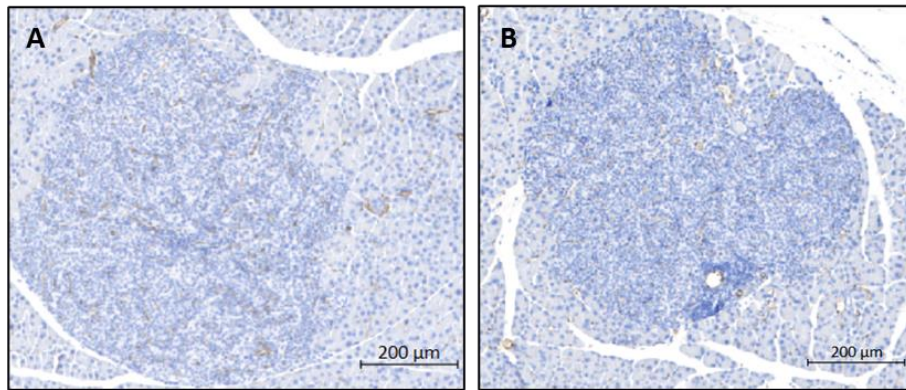
Um eine Aussage über den Effekt von Regorafenib auf die Blutgefäße zu treffen, wurden diese in den Gewebeschnitten der Pankreata mit einem Antikörper, der gegen das Antigen CD31 gerichtet ist, angefärbt. CD31 ist ein membranständiges integrales Glykoprotein, das konstitutiv auf der Oberfläche embryonaler und adulter Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und naiven T-Lymphozyten exprimiert wird. CD31, das auch unter PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) bekannt ist, übt zudem als Funktion eines Adhäsionsrezeptors eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten und der Angiogenese aus.

Mithilfe der Software für die Bestimmung der CD31-Färbung konnte, vergleichbar zu der Ki-67-Färbung, die Gesamtfläche der mit CD31-angefärbten Blutgefäßen auf dem gesamten Gewebe und im Tumor bestimmt werden. Zur Auswertung der Blutgefäße im Gesamtgewebe wurde die Fläche der mit CD31-angefärbten Blutgefäße auf die Gesamtfläche des Pankreas normiert. Dabei konnte eine deutliche Reduktion des prozentualen Anteils der Blutgefäße in der Regorafenib-Gruppe mit 6,8% im Vergleich zur PEG-Gruppe mit 11,4% ermittelt werden (Abbildung 30A;  $p=0,001$ ). Entgegen dieser Ergebnisse war der durchschnittliche prozentuale Anteil der Blutgefäße im Tumor in der Regorafenib-Gruppe mit 6,1% jedoch nahezu doppelt so hoch wie in der PEG-Gruppe (3,2%) (Abbildung 30B;  $p=0,1$ ).



**Abbildung 30: Quantifizierung der Blutgefäße mittels CD31.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (\*\* $p<0,001$ ; ns nicht signifikant).

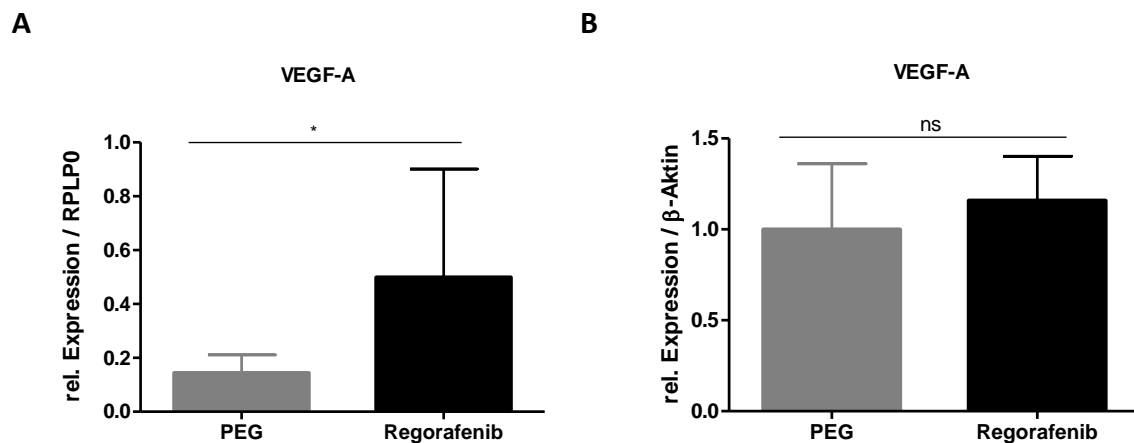
Repräsentative Aufnahmen der CD31-Färbungen der Regorafenib- und PEG-Kontrollgruppe sind in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31: CD31-Färbungen von Insulinomen.** Exemplarische Aufnahmen der CD31-Färbungen (braun) von Insulinomen aus der PEG-Gruppe (A) und der Regorafenib-Gruppe (B) (10x Vergrößerung).

#### 4.6.5 Effekte von Regorafenib auf den VEGF-A-Gehalt im Serum und Pankreasgewebe der RIP1Tag2-Mäuse

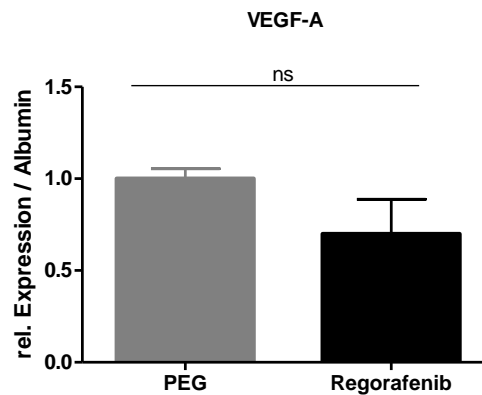
Im Anschluss sollte untersucht werden, ob Regorafenib neben den Blutgefäßen auch einen Einfluss auf das Expressionslevel von VEGF-A hat. Dazu wurde aus den in Paraffin eingebetteten Pankreata der PEG- und Regorafenib-Gruppe RNA und Protein isoliert. Die qRT-PCR-Daten zeigten eine deutliche Reduktion von VEGF-A auf RNA-Ebene (Abbildung 32A). Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Analysen erbrachte hingegen einen leichten, nicht signifikanten, Anstieg von VEGF-A unter Regorafenib-Therapie auf Proteinebene (Abbildung 32B; siehe ebenfalls Anhang Abbildung 74).



**Abbildung 32: Bestimmung der VEGF-A-Expression auf RNA- und Proteinebene.** Aus den Paraffinschnitten der Maus-Pankreata aus der PEG – und Regorafenib-Gruppe wurden RNA und Protein isoliert. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse, normiert auf den Gehalt von RPLPO, sind in (A) und die densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse, normiert auf die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin, hinsichtlich der Expression von VEGF-A sind in (B) dargestellt. Die ermittelten Werte sind mit Mittelwert und Standardabweichungen angegeben ( $\pm$ SD) (\* $p < 0,05$ ; ns nicht signifikant).

Nach der zervikalen Dislokation der Mäuse am Versuchsende erfolgten die Blutentnahme und die Gewinnung von Serum. Das Serum wurde 1:10 mit PBS verdünnt und im Western Blot hinsichtlich des

VEGF-A-Levels untersucht. Die densitometrische Auswertung ergab wiederholt eine Reduktion von VEGF-A im Serum der Mäuse nach Regorafenib-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 33; siehe ebenfalls Anhang Abbildung 75).



**Abbildung 33: Bestimmung des VEGF-A-Levels im Serum in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.** Nach der Behandlungsdauer von 4 Wochen wurde den Tieren Blut entnommen und der Gehalt von VEGF-A im gewonnenen Serum mittels Western Blot-Analyse ermittelt. Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse, normalisiert auf die Ladekontrolle Albumin, gibt den Mittelwert und die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) an (ns nicht signifikant).

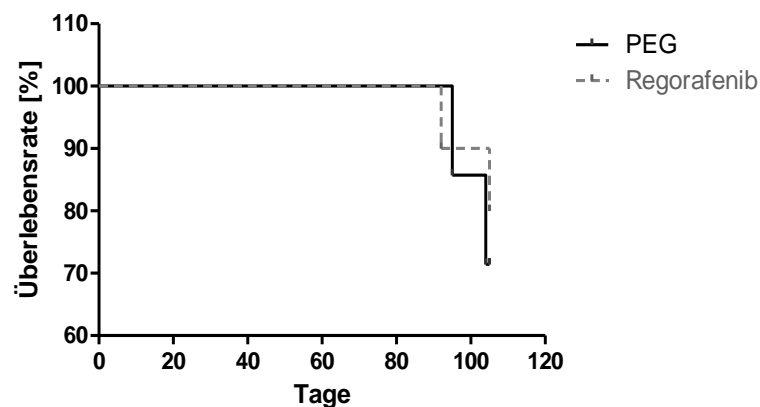
## 4.7 Effekte von Regorafenib auf das Tumorwachstum

In der Studie zur Intervention des Tumorwachstums wurden RIP1Tag2-Mäuse von der 9.-15. Lebenswoche behandelt. Die Regorafenib-Gruppe bestand aus 10 Mäusen (5 männlich, 5 weiblich). Regorafenib wurde dabei über 6 Wochen lang in einer Konzentration von 10mg/kg KG/Tag in einem Volumen von 100 $\mu$ l über die Schlundsonde verabreicht. Nach einer 5-tägigen Behandlungsdauer folgte eine zweitägige Pause. Die Kontrollgruppe bestand insgesamt aus 7 Mäusen (3 weiblich und 4 männlich). Sie erhielten in dem gleichen Therapieschema die Kontrollsubstanz PEG/Methansulfonsäure (Lösungsmittel von Regorafenib) ebenfalls in einem Volumen von 100 $\mu$ l. Die Mäuse wurden während der vollständigen Therapiedauer mithilfe des Score-Sheets überwacht und das Gewicht vor jeder Applikation ermittelt.

### 4.7.1 Überlebenskurve und Gewichtsverlauf

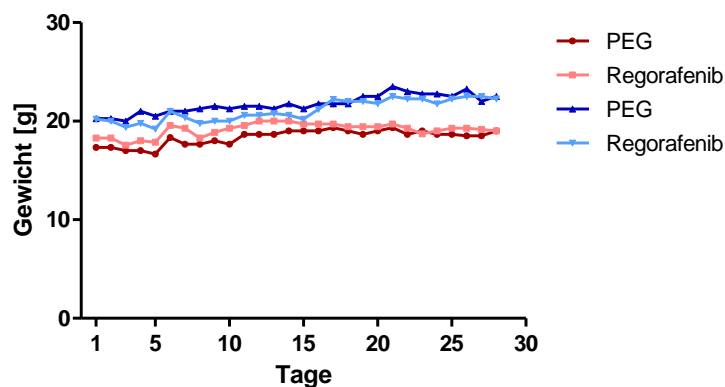
Der erste untersuchte Parameter stellte in der Studie zum Einfluss von Regorafenib auf das Tumorwachstum ebenfalls die Kaplan-Meier-Überlebenskurve dar. Die Behandlung mit Regorafenib wurde nach dem Erreichen der 15. Lebenswoche beendet. Die massive Insulinproduktion der hochproliferierenden  $\beta$ -Zellen zeichnet sich zum Ende dieser Studie durch eine Hypoglykämie aus, an der die Mäuse

spontan versterben können. Durch unsere tägliche Begutachtung konnte das vorzeitige Versterben von 4 Mäusen (jeweils zwei PEG-Tiere und zwei Regorafenib-Tiere) verhindert werden. Da diese Tiere das Versuchsende nicht erreicht hätten, sind sie in der Kaplan-Meier-Kurve als verstorben gekennzeichnet. Ausgehend von 10 behandelten Regorafenib-Mäusen und 7 behandelten PEG-Mäusen betrug die Überlebensrate in der Regorafenib-Gruppe 80% und in der PEG-Gruppe 71,4%. Die Überlebenskurve zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen (Abbildung 34). Die Organe und das Blut der vorzeitig getöteten Mäuse wurden dennoch entnommen und in die Auswertungen miteinbezogen.



**Abbildung 34: Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.** In dieser Studie wurden 7 Tiere mit PEG-Kontrolllösung und 10 Tiere mit Regorafenib für 6 Wochen von der 9. -15. Lebenswoche behandelt. Auf der Ordinate (y-Achse) wird der Anteil lebender Mäuse einer Behandlungsgruppe mit einer linearen Prozentskala beschrieben. Auf der Abszisse (x-Achse) wird die Überlebenszeit in Tagen angegeben.

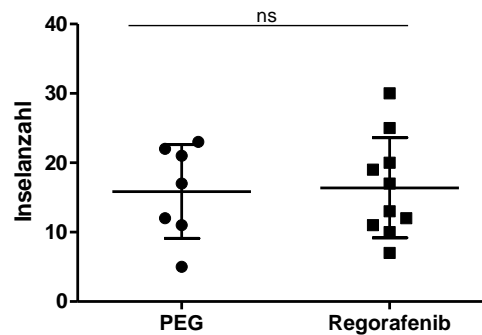
Aufgrund der Dokumentation des Gewichts der Mäuse vor jeder Applikation mit PEG bzw. Regorafenib, konnte ein Gewichtsverlauf erstellt werden (Abbildung 35). Dieser zeigte im Zeitverlauf einen leichten Anstieg in allen vier Therapiegruppen.



**Abbildung 35: Gewichtsverlaufs der Mäuse in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.** In dieser Studie wurden 7 Tiere mit PEG-Kontrolllösung und 10 Tiere mit Regorafenib für 6 Wochen von der 9. -15. Lebenswoche behandelt. Auf der Ordinate (y-Achse) ist die Behandlungsdauer in Tagen dargestellt, die Abszisse (x-Achse) zeigt das Gewicht der weiblichen (rot) und männlichen (blau) Mäuse in Gramm.

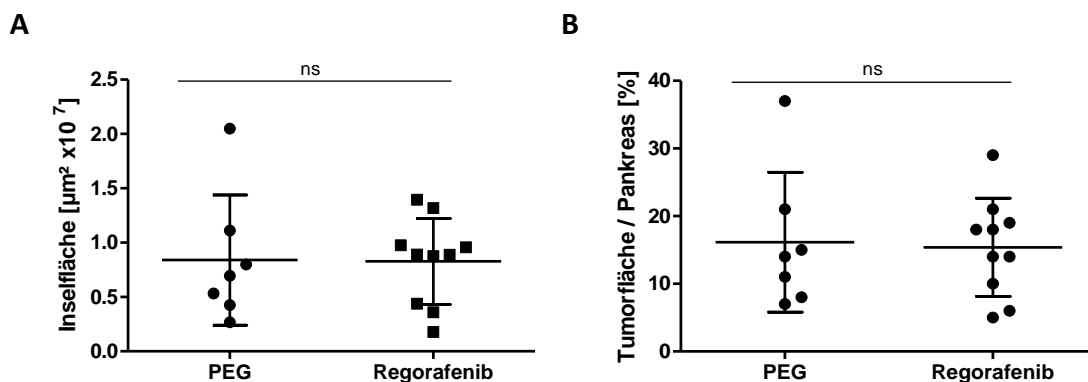
## 4.7.2 Anzahl und Größe der Tumore

Die Auswertung der Regorafenib- und Kontrolltiere im Hinblick auf die Gesamtanzahl der Inseln zeigte, dass es mit einer medianen Anzahl von 15,8 in der PEG-Gruppe und 16,4 in der Regorafenib-Gruppe keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtanzahl der Inseln zwischen den beiden Behandlungsgruppen gab (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Quantifizierung der Inselanzahl.** Darstellung der ermittelten Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).

Die daraufhin bestimmte Berechnung der Inselfläche ergab eine Fläche von  $0,84 \times 10^7 \mu\text{m}^2$  in der PEG-Gruppe und von  $0,83 \times 10^7 \mu\text{m}^2$  in der Regorafenib-Gruppe. Erneut zeigte sich, im Gegensatz zum Effekt auf die Tumorentstehung, kein signifikanter Unterschied (Abbildung 37A). Dies spiegelte sich ebenfalls im prozentualen Anteil der Tumourfläche in Bezug auf die gesamte Gewebefläche wider (Abbildung 37B).

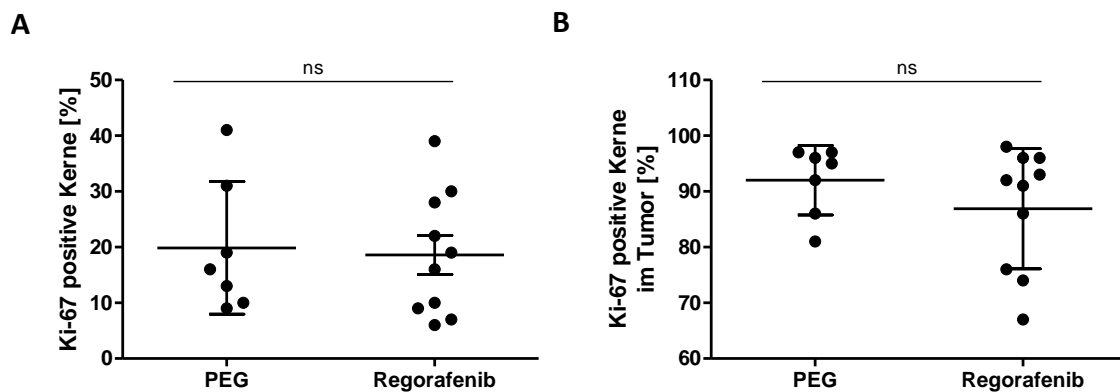


**Abbildung 37: Quantifizierung der Inselfläche.** Darstellung der ermittelten Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und normiert auf die gesamte Gewebefläche (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).

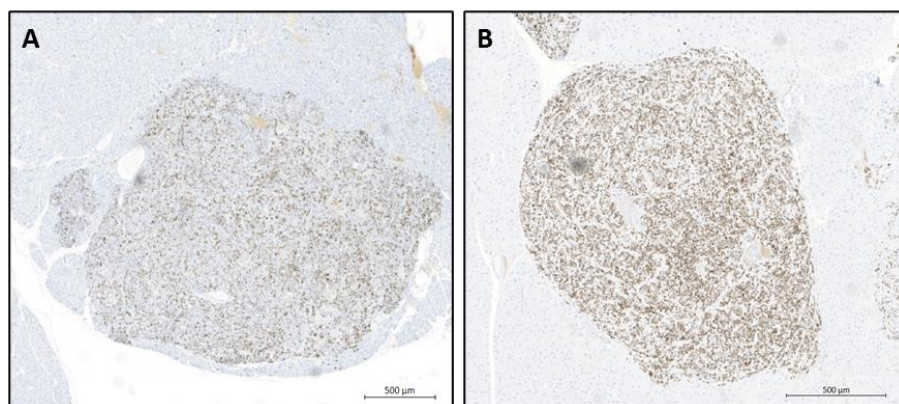
### 4.7.3 Einfluss von Regorafenib auf die Proliferation von Insulinomen

Die Auswertung der Proliferation fand über die immunhistochemische Färbung von Ki-67 statt. Auch hier wurde von der Gesamtanzahl der Kerne, der Anteil der Ki-67-positiven Kerne ermittelt und deren Verteilung im gesunden und im kranken Gewebe untersucht.

Während des Tumorwachstums konnte weder ein Unterschied im prozentualen Anteil der Ki-67-positiven Kerne in Bezug auf das gesamte Gewebe noch auf den Tumor selbst ermittelt werden. Der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellen im gesamten Gewebe lag in der PEG-Gruppe durchschnittlich bei 19,9% und in der Regorafenib-Gruppe bei 18,6 % (Abbildung 38A). Innerhalb der Tumore betrug dieser 92% in der PEG-Gruppe und 87% in der Regorafenib-Gruppe (Abbildung 38B). Repräsentative Aufnahmen der Ki-67-Färbungen aus der Regorafenib- und PEG-Kontrollgruppe sind in Abbildung 39 dargestellt.

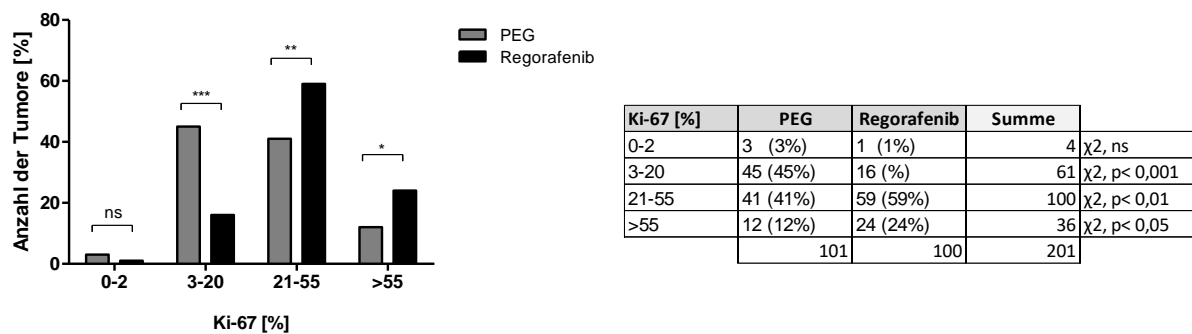


**Abbildung 38: Quantifizierung der Proliferationsrate mittels Ki-67.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).



**Abbildung 39: Ki-67-Färbung von Insulinomen.** Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen (10x Vergrößerung) der Ki-67-Färbungen (braun) von Insulinomen aus der PEG-Gruppe (A) und der Regorafenib-Gruppe (B).

Nachdem sich keine Unterschiede zwischen Regorafenib und der PEG-Kontrollsubstanz auf die Proliferation während des Tumorwachstums ergaben, wurden die Tumore hinsichtlich ihres Ki-67-Index in G1-G4-Tumore eingruppiert (Abbildung 40). Dabei zeigten sich zwei deutliche Unterschiede. Der prozentuale Anteil der G1- und G2-Tumore lag in der PEG-Gruppe mit 3% bzw. 45% deutlich höher als in der Regorafenib-Gruppe mit 1% und 16%. Im Gegensatz dazu konnten in der Regorafenib-Gruppe 59% der Tumore einem G3- und 24% der Tumore einem G4-Stadium zugeordnet werden. In der PEG-Gruppe betrug der prozentuale Anteil von G3-Tumoren lediglich 41% und der von G4-Tumoren 12%. Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests konnte ein signifikanter Unterschied in allen Tumor-Graden, bis auf die G1-Tumore, ermittelt werden.

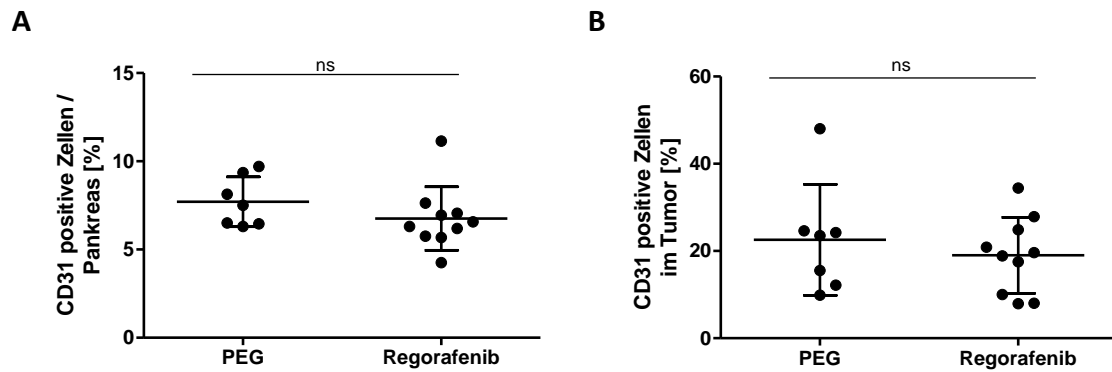


**Abbildung 40: Quantifizierung des Ki-67-Index in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.** Anhand der immunhistochemischen Ki-67-Färbungen wurde der Anteil Ki-67-positiver Zellkerne der PEG - und Regorafenib behandelten Tiere ermittelt und daraus der Ki-67-Index bestimmt. Darstellung des prozentualen Anteils der Tumore des jeweiligen Grades (G1: 0-2%; G2: 3-20%, G3: 21-55% und G4: >55%) und Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Chi-Quadrat-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns nicht signifikant).

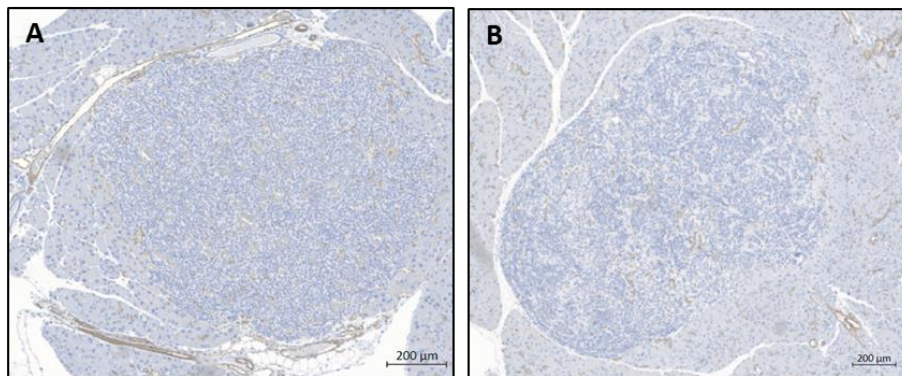
#### 4.7.4 Einfluss von Regorafenib auf die Blutgefäße

Um den Effekt von Regorafenib auf die Blutgefäße zu untersuchen, wurden die CD31-immunhistochemischen Färbungen anhand der vorliegenden Software ausgewertet. Aus dem Verhältnis der Fläche der CD31-positiven Blutgefäße und der Gesamtfläche des Gewebeschnittes wurden der prozentuale Anteil der Blutgefäße und der Anteil von CD31-positiven Blutgefäßen im Tumor bestimmt. Dabei konnte im Gesamtgewebe kein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils der Blutgefäße in der Regorafenib-Gruppe (7,7%) im Vergleich zur PEG-Gruppe (6,8%) ermittelt werden (Abbildung 41). Ebenso ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen in dem Anteil von Blutgefäßen im Tumor (Regorafenib: 19%, PEG: 22,6%;  $p = 0,7$ ). Repräsentative Aufnahmen der CD31-Färbungen der Regorafenib- und PEG-Kontrollgruppe sind in Abbildung 42 dargestellt.





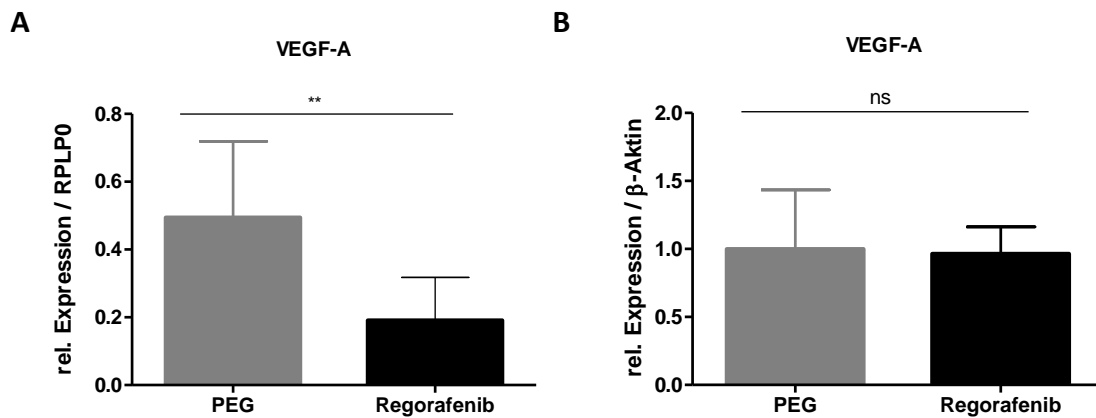
**Abbildung 41: Quantifizierung der Blutgefäße mittels CD31.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).



**Abbildung 42: CD31-Färbungen von Insulinomen.** Exemplarische Aufnahmen der CD31-Färbungen (braun) von Insulinomen aus der PEG-Gruppe (A) und der Regorafenib-Gruppe (B) (10x Vergrößerung).

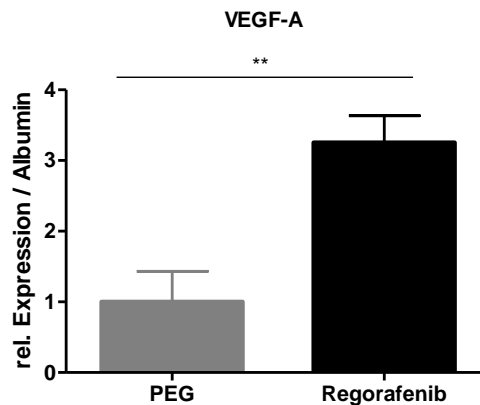
#### 4.7.5 Effekte von Regorafenib auf den VEGF-A-Gehalt im Serum und Pankreasgewebe der RIP1Tag2-Mäuse

Entsprechend der Studie zum Einfluss auf die Tumorentstehung wurde das Expressionslevel von VEGF-A auf RNA- und Proteinebene im Gewebe und im Serum der zwei Behandlungsgruppen bestimmt. Die qRT-PCR-Daten zeigten eine deutliche signifikante Reduktion von VEGF-A auf RNA-Ebene im gesamten Pankreasgewebe (Abbildung 43A). Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Analysen erbrachte hingegen keinen signifikanten Unterschied der VEGF-A-Expression unter Regorafenib-Therapie auf Proteinebene (Abbildung 43B; siehe ebenfalls Anhang Abbildung 76).



**Abbildung 43: Bestimmung der VEGF-A-Expression auf RNA- und Proteinebene.** Aus den Paraffinschnitten der Maus-Pankreata aus der PEG – und Regorafenib-Gruppe wurden RNA und Protein isoliert. **(A)** Darstellung der qRT-PCR-Analyse, normiert auf den Gehalt von RPLP0, und **(B)** der densitometrischen Auswertung der Western Blot-Analyse, normiert auf die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin, hinsichtlich der Expression von VEGF-A. Es sind die ermittelten Werte mit Mittelwert und Standardabweichungen angegeben ( $\pm$ SD) (\*\* $p < 0,01$ ; ns nicht signifikant).

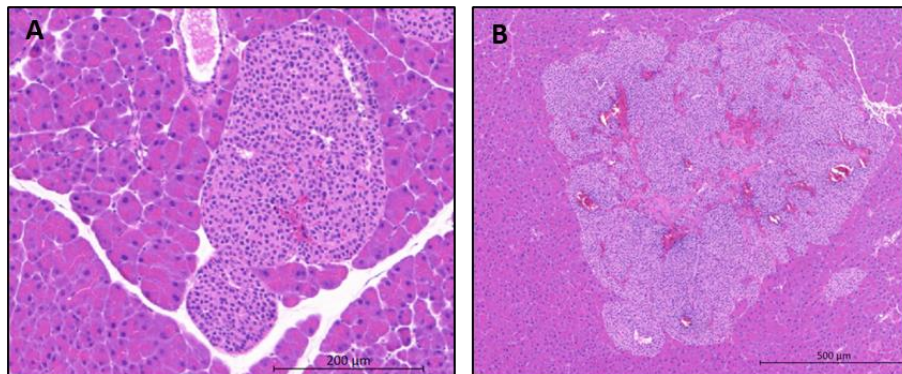
Der VEGF-A-Gehalt im Serum zeigte hingegen ein gegenteiliges Ergebnis. Die densitometrische Bestimmung der Western Blot-Analyse von VEGF-A im Serum der Mäuse zeigte einen signifikanten Anstieg unter der Regorafenib-Therapie im Vergleich zur PEG-Kontrollgruppe (Abbildung 44;  $p = 0,002$ ), siehe ebenfalls Anhang Abbildung 77).



**Abbildung 44: Bestimmung des VEGF-A-Gehalts im Serum in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.** Nach der Behandlungsdauer von 4 Wochen wurde den Tieren Blut entnommen und der Gehalt von VEGF-A im gewonnenen Serum mittels Western Blot-Analyse ermittelt. Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse, normalisiert auf die Ladekontrolle Albumin, gibt den Mittelwert und die Standardabweichungen ( $\pm$ SD) an (\*\* $p < 0,01$ ).

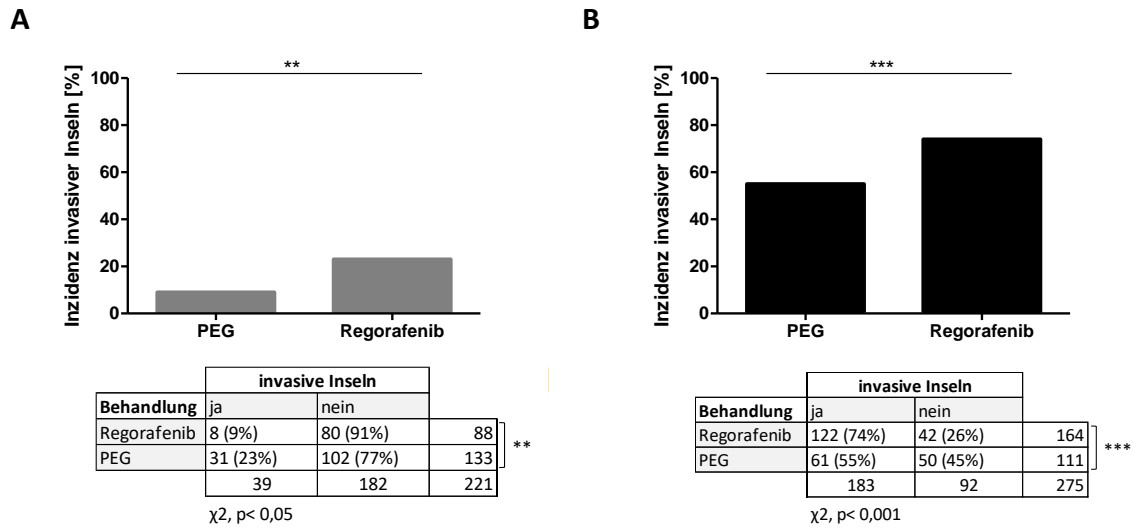
#### 4.8 Einfluss von Regorafenib auf die Invasivität der Insulinome in der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum

Insulinome sind in der Regel von einer bindegewebsartigen Kapsel umschlossen. Beim Fortschreiten der Tumorprogression kann es zu einem Aufbrechen dieser Kapsel kommen, wodurch Zellen in das umliegende Gewebe einwandern und metastasieren können. Um zu untersuchen, ob sich ein Unterschied in der Anzahl von invasiven Inseln zwischen den beiden Therapiegruppen ergibt, wurden alle Inseln hinsichtlich ihrer Invasivität ausgewertet. Sobald die Kapsel an einer Stelle aufgebrochen war, wurde sie als invasiv eingestuft. Exemplarische Bilder von invasiven und nicht-invasiven Insulinomen sind in Abbildung 45 dargestellt.



**Abbildung 45: Repräsentative Darstellung eines nicht-invasiven Insulinoms (A) und eines invasiven Insulinoms (B).** HE-Färbungen von Pankreata nicht-behandelter RIP1Tag2-Mäuse (10x Vergrößerung).

Die Auswertung ergab, dass die Anzahl der invasiven Inseln sowohl in der Tumorentstehung als auch in dem Tumorwachstum unter der Regorafenib-Behandlung signifikant höher war als in der PEG-Kontrollgruppe. Während in der Studie zum Einfluss auf das Tumorwachstum 23% der Insulinome aus der Regorafenib-Gruppe invasive Eigenschaften aufwiesen, betrug dies in der PEG-Kontrollgruppe lediglich 14% (Abbildung 46A). Die gleiche Tendenz zeigte sich während des Tumorwachstums. Dort lag der prozentuale Anteil von invasiven Insulinomen in der Regorafenib-Gruppe mit 74% knapp 20% höher als in der PEG-Kontrollgruppe (55%) (Abbildung 46B).

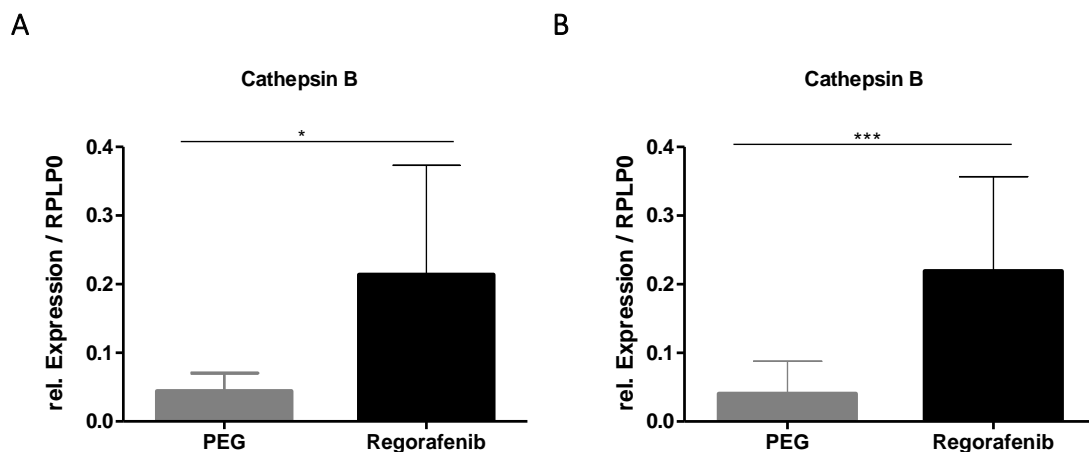


**Abbildung 46: Anstieg von invasiven Insulinomen unter Regorafenib-Therapie.** Anhand der HE-Färbungen der Pankreata der PEG- und Regorafenib-behandelten Mäuse wurden die Gesamtanzahl der Insulinome und der Anteil invasiver Insulinome bestimmt. Sobald die Kapsel an einer Stelle aufgebrochen war, wurde sie als invasiv eingestuft. Darstellung des prozentualen Anteils der invasiven und nicht-invasiven Insulinome während der Tumorentstehung (**A**) und des Tumorwachstums (**B**) unter der Behandlung von Regorafenib und der PEG-Kontrollsubstanz. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.8.1 Einfluss von Regorafenib auf die Cathepsin B-Expression

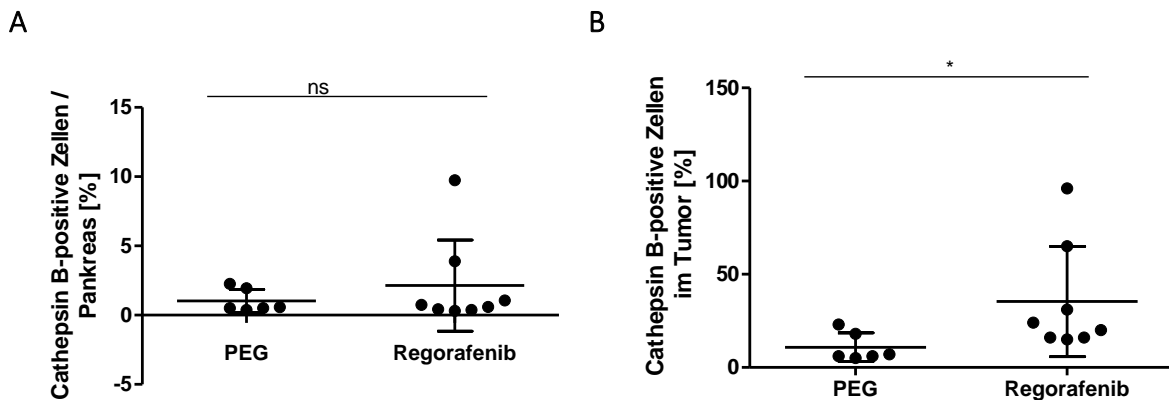
Aufbauend auf dem Erkenntnis, dass Regorafenib die Invasivität von Insulinomen steigert, stellte sich die Frage, welche Faktoren daran maßgeblich beteiligt sind. Die Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein wegweisender Prozess, durch den Zellen von dem Haupttumor abwandern und metastasieren können. Der Aufbruch der extrazellulären Matrix durch Metalloproteinasen (z.B. MMP9) und Proteasen der Cathepsin-Familie tragen dabei entscheidend zur Invasivität von Tumoren bei. In verschiedenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Cathepsine während der Tumorentstehung von RIP1Tag2-Mäusen erhöht sind und deren gezieltes „Ausschalten“ bzw. die Inhibition zu einer gesenkten Proliferation, Angiogenese und Invasivität der Insulinome führte (Gocheva *et al.* 2006, Bell-Mc Guinn *et al.* 2007). Auf dieser Grundlage sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Regorafenib-Behandlung während der Tumorentstehung und des Tumorwachstums zu einer erhöhten Cathepsin-Expression führt.

Im ersten Schritt wurde die Expression von Cathepsin B auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich während der Tumorentstehung und des Tumorwachstums ein deutlicher Anstieg von Cathepsin B unter der Regorafenib-Behandlung (Abbildung 47).



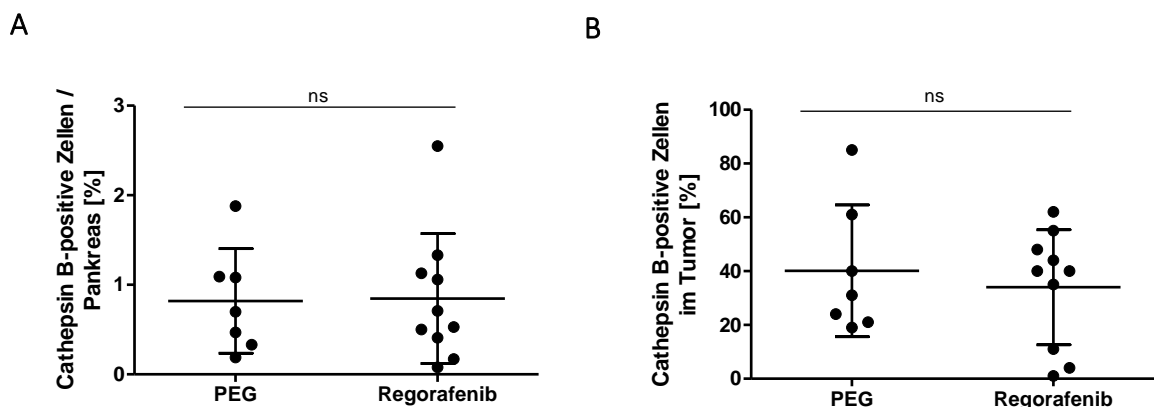
**Abbildung 47: Regorafenib steigert die Cathepsin B-Expression auf RNA-Ebene.** Aus den Paraffinschnitten der Maus-Pankreata aus der PEG – und Regorafenib-Gruppe wurde wie vorher beschrieben RNA isoliert und diese hinsichtlich der Expression von Cathepsin B, normiert auf den Gehalt von RPLP0, mittels qRT-PCR untersucht. Es ist der errechnete Mittelwert der Studie zum Effekt auf die Tumorentstehung (A) und das Tumorwachstum (B) mit Angabe der Standardabweichung ( $\pm$ SD) dargestellt (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Im Anschluss an die qRT-PCR-Analysen erfolgte die Auswertung der immunhistochemischen Cathepsin B-Färbungen der beiden Therapiestudien. Dabei wurde der prozentuale Anteil von Cathepsin B im Gesamtgewebe und im Tumor ermittelt. In der Tumorentstehung zeigte sich unter Regorafenib-Behandlung ein leichter, nicht signifikanter, Anstieg von Cathepsin B im Gesamtgewebe (PEG: 1%; Regorafenib: 2,1%), jedoch aber ein signifikanter Anstieg im Tumor (PEG: 10,8%; Regorafenib: 35,4%) (Abbildung 48;  $p=0,03$ ).



**Abbildung 48: Quantifizierung der immunhistochemischen Cathepsin B-Färbung in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (\* $p\leq 0,05$ ; ns nicht signifikant).

Die Auswertung der Cathepsin B-Färbung ergab während des Tumorwachstums wiederholt zwischen der Regorafenib-Behandlung und der PEG-Kontrollsubstanz sowohl im Gesamtgewebe als auch im Tumor keinen Unterschied (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Quantifizierung der immunhistochemischen Cathepsin B-Färbung in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).

Die dargestellten Daten machen ein schlechtes Ansprechen der Tumorzellen auf die Regorafenib-Therapie in den RIP1Tag2-Mäusen deutlich. Trotz der unterschiedlichen Effekte von Regorafenib auf das Tumorstadium und die Blutgefäße in den untersuchten Zeiträumen, führte es in beiden Studien zu einem Anstieg von undifferenzierten und invasiven Inseln. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, welche Mechanismen maßgeblich zu der Resistenz gegenüber der Regorafenib-Therapie beigetragen haben.

Dazu wurden folgende Hypothesen aufgestellt und untersucht:

1. Führt die Hochregulation von überlebensfördernden Proteinen zur Apoptose-Resistenz?
2. Trägt das Tumormikromilieu zur Entstehung von stark proliferierenden und schlecht differenzierten Tumoren bei?

## 4.9 Entwicklung von Resistenzmechanismen unter der Regorafenib-Therapie *in vitro* und *in vivo*

Die *in vitro* Untersuchungen konnten einen deutlichen Effekt von Regorafenib auf die Proliferation der humanen und murinen Zelllinien zeigen. Dennoch ergab sich in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung eine erhöhte Proliferation der Insulinome mit einem Anstieg des Anteils undifferenzierter Tumore unter der Regorafenib-Therapie. In der Studie hinsichtlich des Effekts auf das Tumorwachstum war der Effekt auf die Proliferation hingegen fast aufgehoben. Daraufhin stellte sich die Frage, ob Resistenzmechanismen gegenüber der Therapie ein Grund für das schlechte Ansprechen sind.

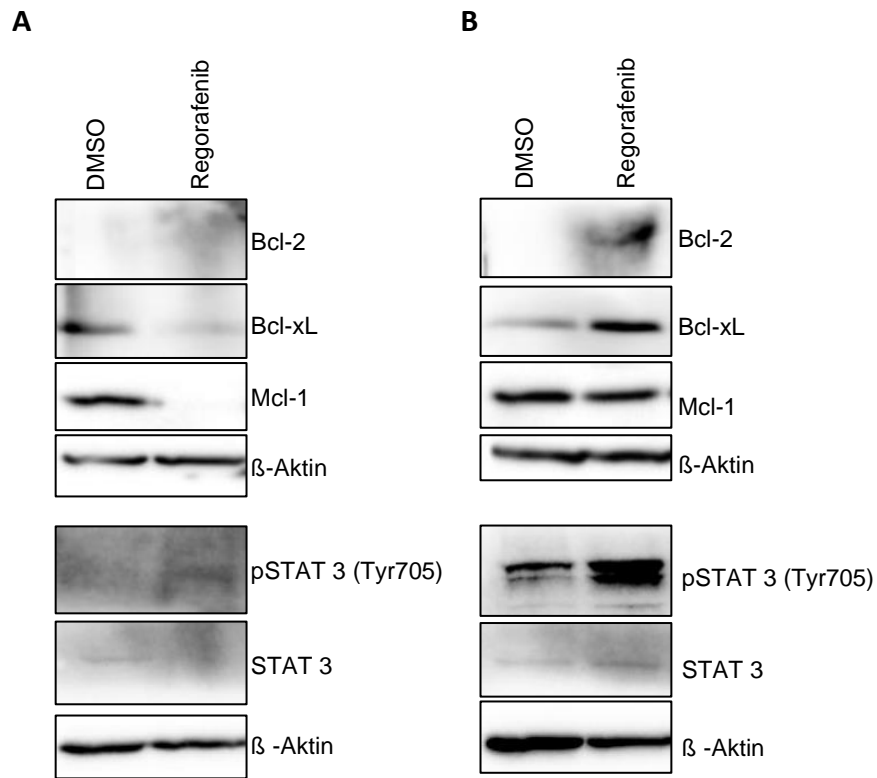
### 4.9.1 Expressionsanalyse von überlebensfördernden Proteinen unter dem Einfluss von Regorafenib in BON-1- und QGP-1- Zellen *in vitro*

Um mögliche Resistenzmechanismen zu identifizieren, die das schlechte Ansprechen *in vivo* erklären, lag das Augenmerk zunächst auf der Charakterisierung der anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie. Dazu wurden Western Blot-Analysen hinsichtlich der Expression von Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 durchgeführt.

In den QGP-1-Zellen konnte die Hypothese, dass die Induktion von überlebensfördernden Proteinen die Apoptose-Resistenz verstärkt, bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Hochregulation von Bcl-2 und Bcl-XL nach einer 48-stündigen Regorafenib-Behandlung. Die Expression von Mcl-1 war hingegen leicht reduziert (Abbildung 50B). Allerdings war diese Regulation Zelltyp-spezifisch: In den BON-1-Zellen war die Expression von Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 nach der 48-stündigen Regorafenib-Behandlung deutlich reduziert (Abbildung 50A).

Die Expression der Bcl-2-Proteinfamilie wird in einem großen Umfang über den JAK-STAT-Signalweg reguliert. Eine erhöhte Expression von phosphoryliertem STAT3 an Tyrosin 705 konnte anhand von weiterführenden Western Blot-Analysen in den QGP-1-Zellen beobachtet werden (Abbildung 50B). In den BON-1-Zellen, die keine erhöhte Bcl-2-Expression unter der Regorafenib-Therapie aufwiesen, war dies nur andeutungsweise zu erkennen (Abbildung 50A).

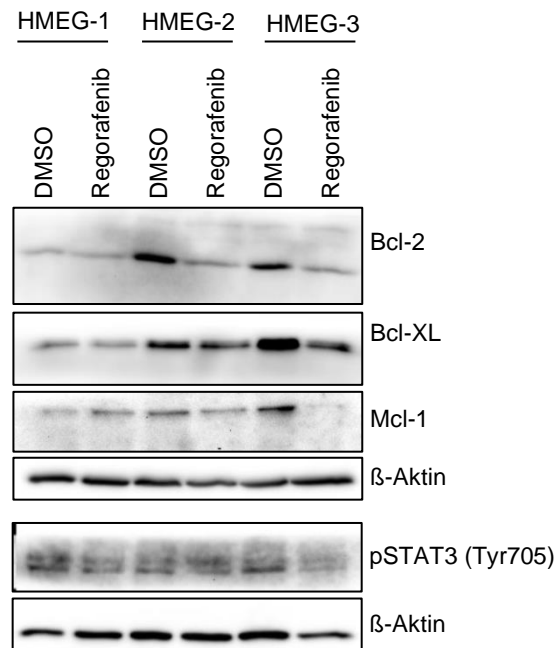




**Abbildung 50: Western Blot-Analysen der anti-apoptotischen BCL-2-Proteinfamilie und STAT3.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib für 48h behandelt. Die Proteinlysate von BON-1- **(A)** und QGP-1-Zellen **(B)** wurden hinsichtlich der Expression der anti-apoptotischen BCL-2-Proteinfamilie und STAT3 untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen stehen repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.9.2 Expression von Bcl-2 in den murinen  $\beta$ -Tumorzellen

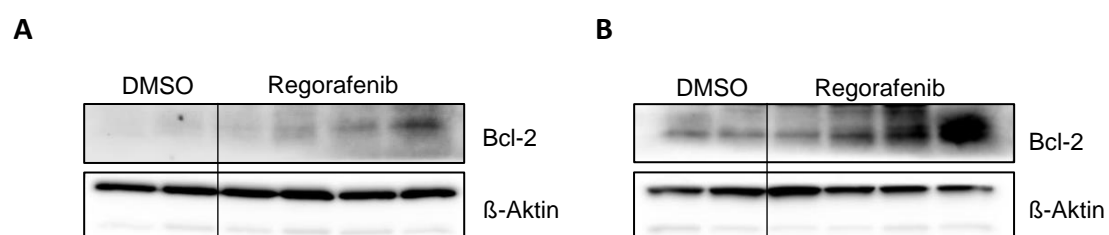
Aufbauend auf den Daten der humanen BON-1- und QGP-1-Zelllinie sollte anschließend die Expression von Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 in den murinen  $\beta$ -Tumorzellen untersucht werden. Dabei ergab sich, vergleichbar zu den BON-1-Zellen, dass die Regorafenib-Therapie zu einer Herunterregulation der antiapoptischen Proteine führte. In diesem Fall war die Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 reduziert (Abbildung 51).



**Abbildung 51: Western Blot-Analysen der anti-apoptischen Bcl-2-Proteinfamilie und STAT3.** Die HMEG-Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 10 $\mu$ M Regorafenib und der äquivalenten Menge DMSO als Kontrolle für 48h behandelt. Die Proteinlysate der  $\beta$ -Tumorzellen wurden hinsichtlich der Expression der anti-apoptischen Bcl-2-Proteinfamilie und STAT3 untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen stehen repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Um weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von Bcl-2 im murinen System zu erlangen und mögliche Vorhersagen für das RIP1Tag2-Mausmodell unter der Regorafenib-Therapie zu treffen, wurden aus den Pankreata von 15 Wochen alten RIP1Tag2-Mäusen Insulinome über einen Kollagenaseverdau isoliert. Nachdem die Insulinome hinsichtlich ihrer Größe und Angiogenität in zwei Gruppen eingeteilt wurden, erfolgte eine 48-stündige Behandlung mit 10 $\mu$ M Regorafenib.

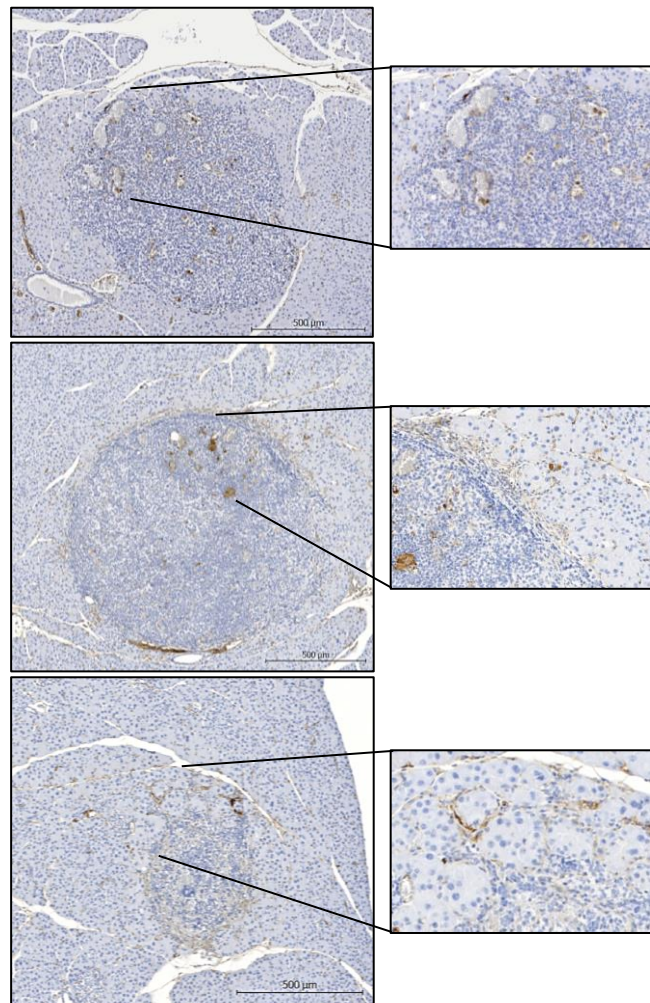
In den Western Blot-Analysen hinsichtlich der Bcl-2 Expression konnte in beiden Gruppen ((A) kleinschwach angiogen bzw. (B) groß-stark angiogen) eine Induktion von Bcl-2 unter Regorafenib-Therapie im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Western Blot-Analyse zur Expression von Bcl-2 in den Insulinomen der RIP1Tag2-Mäuse *ex-vivo*.** Die Insulinome wurden nach der Entnahme aus 15 Wochen alten RIP1Tag2-Mäusen zunächst für 24h in Zellkulturmedium kultiviert und anschließend mit 10 $\mu$ M Regorafenib und der äquivalenten Menge von DMSO für 48h behandelt. Die gewonnenen Proteinlysate aus **(A)** klein-schwach angiogenen und **(B)** groß-stark angiogenen Insulinomen wurden mithilfe von Western Blot-Experimenten hinsichtlich der Bcl-2-Expression analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

#### 4.9.3 Einfluss von Regorafenib auf die Bcl-2-Expression in der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum

Im Anschluss an die *in vitro* und *ex vivo* Experimente wurden die immunhistochemischen Bcl-2-Färbungen aus den Studien zum Einfluss von Regorafenib auf die Tumorentstehung und das Tumorwachstum ausgewertet. Die exemplarischen Färbungen in Abbildung 53 weisen auf unterschiedliche Lokalisationen der Bcl-2-positiven Zellen hin. Dabei war eine positive Färbung in Zellen innerhalb des Tumors (A), in der Insulinomkapsel am Randbereich des Tumors (B) und in Zellen, die sich bereits vom Tumor absiedeln (C), zu erkennen.



**Abbildung 53: Bcl-2-Färbungen von Insulinomen.** Exemplarische Aufnahmen (10x Vergrößerung) der immunhistochemischen Bcl-2-Färbungen von Insulinomen in RIP1Tag2-Mäusen. Die positive Färbung (braun) ist in den Zellen innerhalb des Tumors (A), in der Insulinomkapsel am Randbereich des Tumors (B) und in den Zellen, die sich bereits vom Tumor absiedeln (C), zu erkennen.

Aus dem Verhältnis der Fläche der Bcl-2-positiven Zellen und der Gesamtfläche des Gewebeschnittes wurde der prozentuale Anteil von Bcl-2 im Gesamtgewebe und im Tumor bestimmt. In der Studie zur Intervention der Tumorentstehung konnte zwischen den beiden Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils von Bcl-2 im Gesamtgewebe ermittelt werden. In der PEG-Gruppe betrug dieser 5,2% und in der Regorafenib-Gruppe 4,5%. Analog zur Auswertung der Proliferation und der Blutgefäße zeigte sich aber auch hier ein signifikanter Anstieg von Bcl-2 im Tumor unter Regorafenib (16,4%) im Vergleich zur PEG-Kontrollgruppe (6,8%) (Abbildung 54;  $p=0,04$ ).

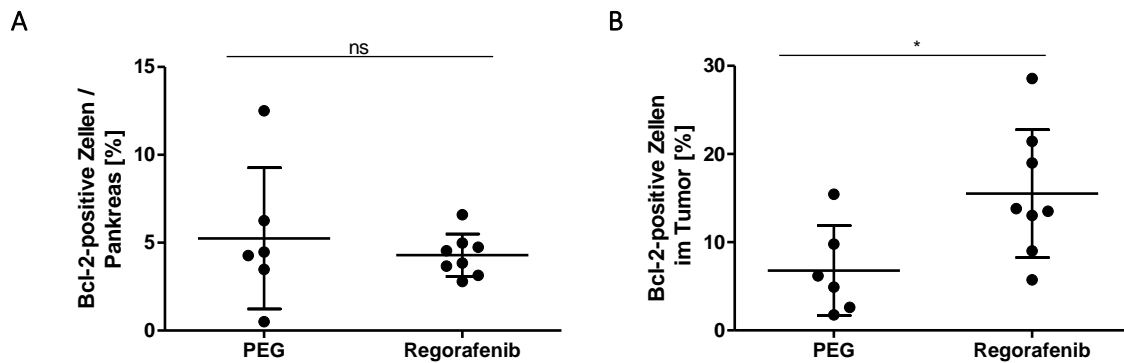


Abbildung 54: Quantifizierung der Bcl-2-positiven Zellen in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung. Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (\* $p\leq 0,05$ ; ns nicht signifikant).

Während des Tumorwachstums konnte hingegen im Gesamtgewebe und im Tumor kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ermittelt werden. Dennoch lag der prozentuale Anteil von Bcl-2-positiven Zellen im Gesamtgewebe in der Regorafenib-Gruppe mit 13 % höher als in der PEG-Gruppe (5,7%) (Abbildung 55).

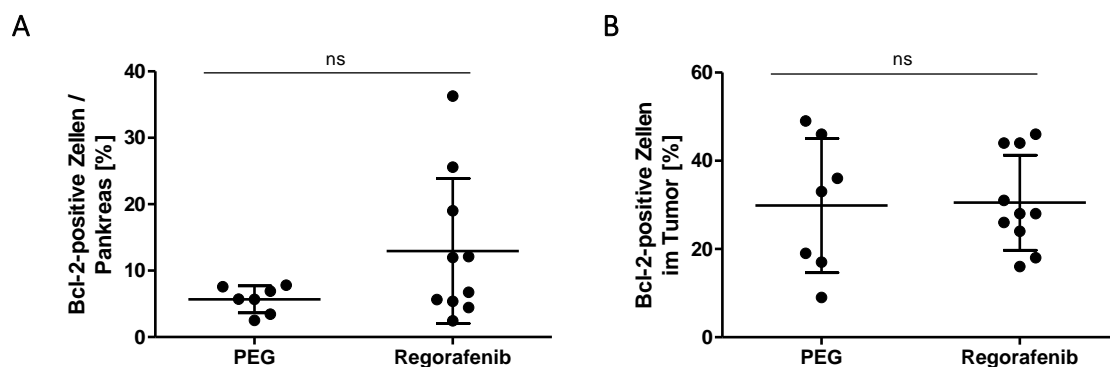
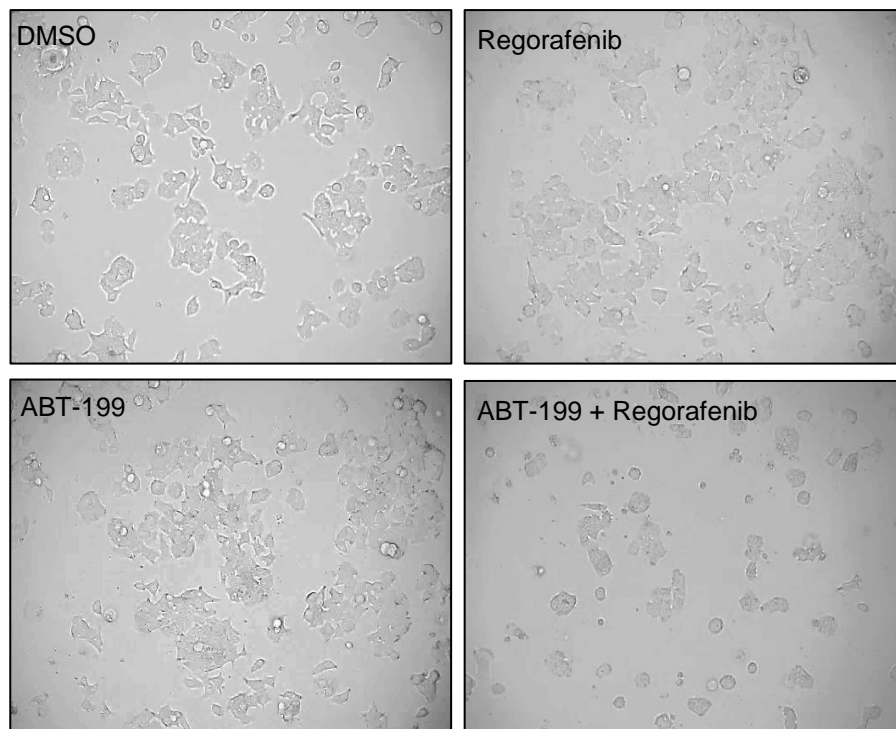


Abbildung 55: Quantifizierung der Bcl-2-positiven Zellen in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums. Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).

#### 4.9.4 Effekte der Kombinationstherapie von Regorafenib und dem Bcl-2-Inhibitor ABT-199 *in vitro*

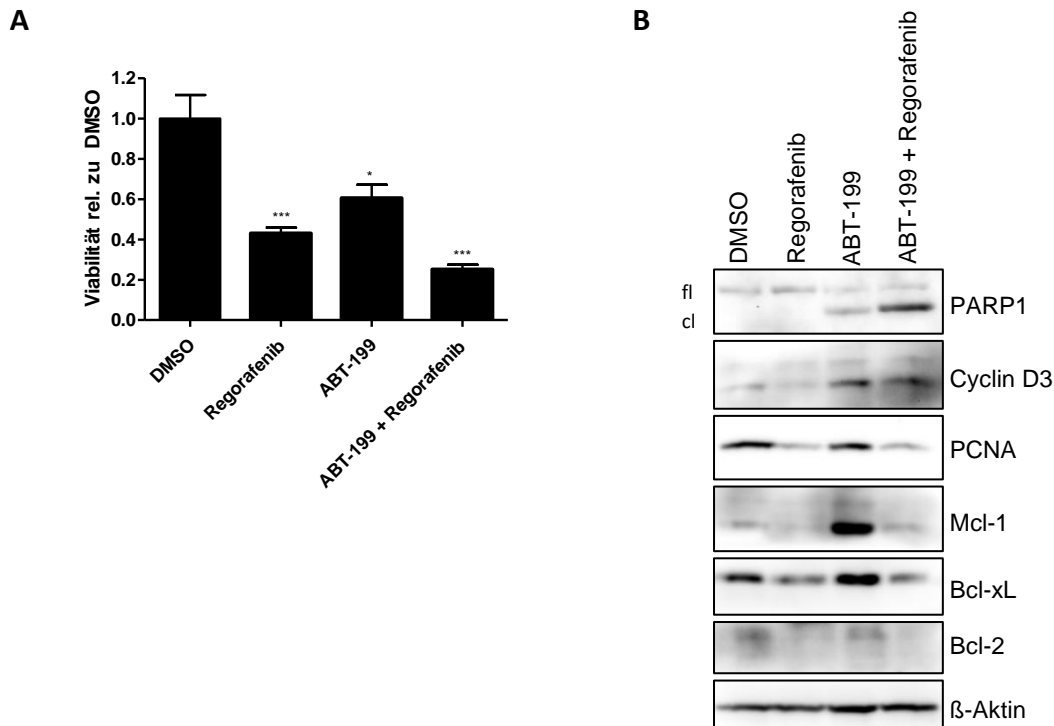
Durch das vermehrte Auftreten einer erhöhten Bcl-2-Expression in der Behandlung von Tumoren wurden in den letzten Jahrzehnten diverse Bcl-2-Inhibitoren entwickelt. Einige davon finden bereits Anwendung in der Klinik: Eine selektive pharmakologische Inhibition mit sog. „BH3-Mimetika“ stellt bei der Therapie der Chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) bereits einen neuen vielversprechenden Ansatz dar. Um zu überprüfen, ob eine simultane Hemmung des hochregulierten Bcl-2 im Tumor *in vivo* die Resistenz gegenüber Regorafenib aufhebt, wurden Kombinationstherapien mit Regorafenib und dem Bcl-2-Inhibitor ABT-199 (Venetoclax) *in vitro* durchgeführt.

Nach einer 48-stündigen Behandlung von BON-1-Zellen mit 6 $\mu$ M Regorafenib und 4 $\mu$ M ABT-199 wurden zunächst lichtmikroskopische Aufnahmen erstellt, anhand dessen eine Reduktion der Zellzahl und ein vermehrtes Auftreten von apoptotischen Zellen in der Kombinationstherapie im Vergleich zur Regorafenib-Monotherapie zu erkennen war (Abbildung 56).



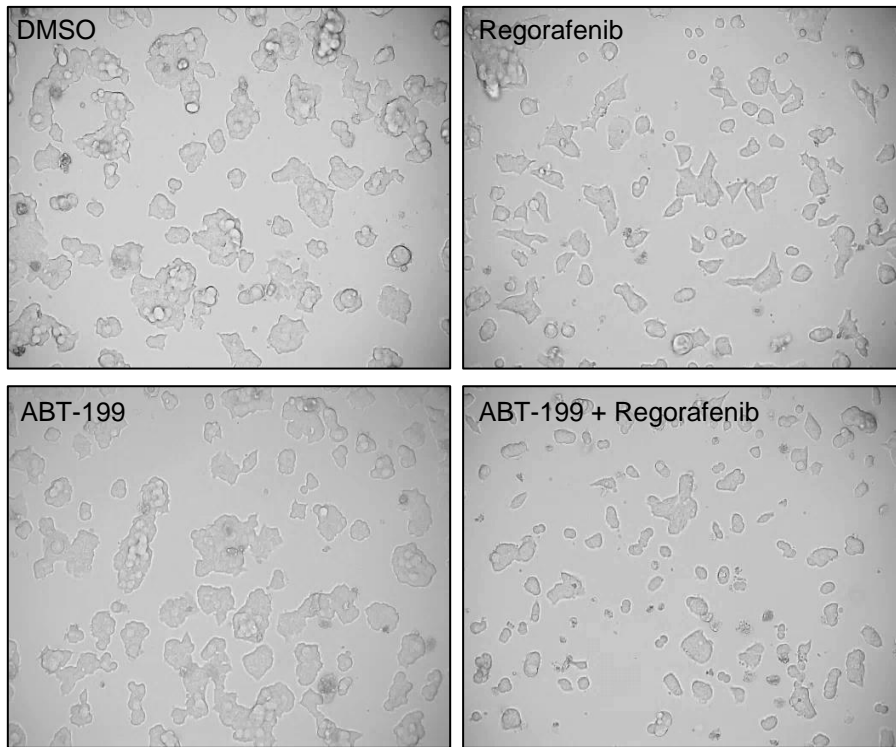
**Abbildung 56: Effekt von Regorafenib auf die Proliferation der BON-1-Zellen.** Die BON-1-Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 4 $\mu$ M ABT-199 alleine oder in Kombination behandelt. Nach einer Inkubation von 48h wurden repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen (20x Vergrößerung) erstellt.

Darauf aufbauend wurden Viabilitäts- Analysen durchgeführt. In den BON-1-Zellen ergab sich dabei ein synergistischer Effekt von Regorafenib und ABT-199 im Vergleich zur Einzelgabe (Abbildung 57A). In Western Blot-Analysen konnte eine deutliche Apoptose-Induktion in der Kombinationstherapie anhand von gespaltenem PARP1 nachgewiesen werden (Abbildung 57B). Des Weiteren fiel eine stark erhöhte Expression von MCL-1 unter der ABT-199-Monotherapie auf.



**Abbildung 57: Synergistischer Effekt von Regorafenib und ABT-199 in BON-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 4 $\mu$ M ABT-199 alleine oder in Kombination bzw. der äquivalenten Menge DMSO für 48h behandelt. **(A)** Die Ergebnisse des ATP-basierten Assays stellen die gemessene Viabilität relativ zur DMSO-Kontrolle mit dem errechneten Mittelwert und der Standardabweichung ( $\pm$ SD) aus drei unabhängigen Experimenten dar (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). **(B)** In den Western Blot-Analysen wurden die Proteinlysate hinsichtlich der Expression der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinfamilie und des Apoptosemarkers PARP1 untersucht (fl=full length, cl=cleaved).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen stehen repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

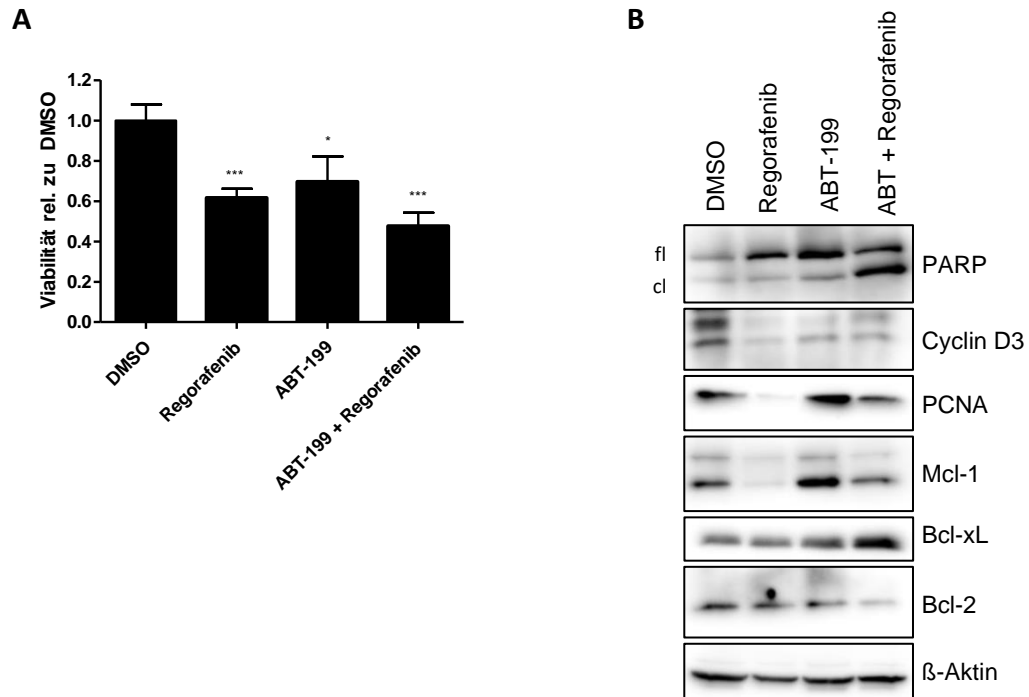
Analog zur Behandlung von BON-1-Zellen wurden ebenfalls QGP-1-Zellen mit Regorafenib und ABT-199 alleine und in Kombination behandelt. Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen waren unter der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Einzeldosis eine geringere Zellzahl und vermehrt apoptotische Zellen zu erkennen (Abbildung 58).



**Abbildung 58: Effekt von Regorafenib auf die Proliferation der QGP-1-Zellen.** Die QGP-1-Zellen wurden wie vorher beschrieben in der 6-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO, 6 $\mu$ M Regorafenib, 4 $\mu$ M ABT-199 alleine oder in Kombination behandelt. Nach einer Inkubation von 48h wurden repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen (20x Vergrößerung) erstellt.

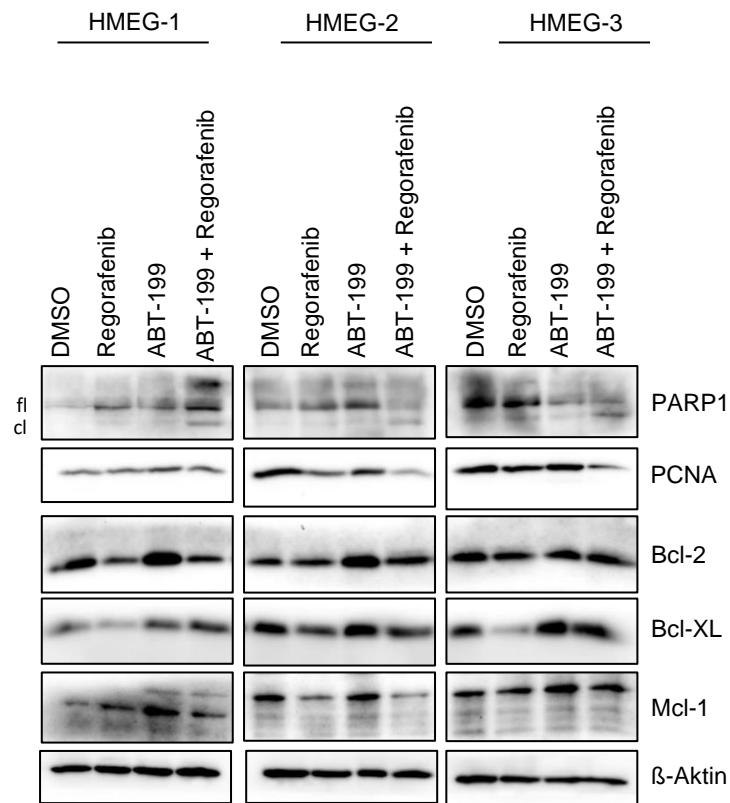
In den QGP-1-Zellen konnten nach der 48-stündigen Behandlung mit 6 $\mu$ M Regorafenib und 4 $\mu$ M ABT-199 vergleichbare Ergebnisse zu den BON-1-Zellen erzielt werden. Auch hier zeigte sich im Viabilitäts-Assay ein synergistischer Effekt von der Kombinationstherapie im Vergleich zur Einzelgabe (Abbildung 59A). Die Induktion der Apoptose konnte anschließend ebenfalls in Western Blot-Analysen anhand des Nachweises des PARP1-Spaltprodukts nachgewiesen werden. Die Hochregulation von Mcl-1 unter ABT-199-Monotherapie war auch in den QGP-1-Zellen zu erkennen, wenngleich sie nicht so stark ausgeprägt war, wie in den BON-1-Zellen (Abbildung 59B).





**Abbildung 59: Synergistischer Effekt von Regorafenib und ABT-199 in QGP-1-Zellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben ausgesät und mit 6µM Regorafenib, 4µM ABT-199 alleine oder in Kombination bzw. der äquivalenten Menge DMSO für 48h behandelt. **(A)** Die Ergebnisse des ATP-basierten Assays stellen die gemessene Viabilität relativ zur DMSO-Kontrolle mit dem errechneten Mittelwert und der Standardabweichung ( $\pm$ SD) aus drei unabhängigen Experimenten dar (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). **(B)** In den Western Blot-Analysen wurden die Proteinlysate hinsichtlich der Expression der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinfamilie und des Apoptosemarkers PARP1 untersucht (fl=full length, cl=cleaved).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen stehen repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente.

Neben dem Effekt in den humanen PNET-Zelllinien konnte die Kombinationstherapie von Regorafenib und ABT-199 auch in den murinen  $\beta$ -Tumorzellen eine gesenkte Viabilität und Apoptose induzieren. In Western Blot-Analysen konnte dies wiederholt an dem gespalteten PARP1 gezeigt werden. Die Hochregulation von Mcl-1 unter der ABT-199-Monotherapie war in diesen Zellen nicht so stark ausgeprägt (Abbildung 60).



**Abbildung 60: Synergistischer Effekt von Regorafenib und ABT-199 in den murinen  $\beta$ -Tumorzellen.** Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 0,1% DMSO, 10 $\mu$ M Regorafenib, 4 $\mu$ M ABT-199 alleine oder in Kombination für 48h behandelt. In den Western Blot-Analysen wurden die Proteinlysate hinsichtlich der Expression der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinfamilie und des Apoptosemarkers PARP1 untersucht (fl=full length, cl=cleaved).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen stehen repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

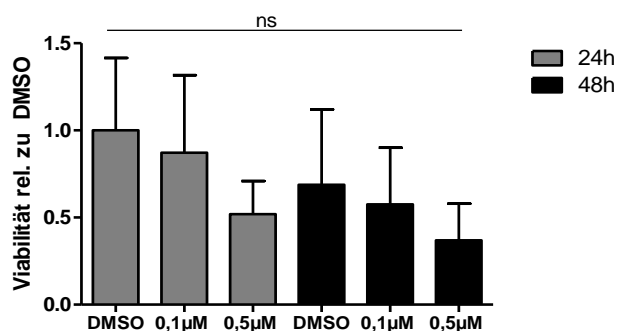
Die *in vitro* Daten deuten darauf hin, dass die alleinige Gabe von Regorafenib durch die Überexpression von Bcl-2 zu einem gesteigerten Überleben führt, welches durch die Apoptose-Induktion in der Kombinationstherapie aufgehoben werden konnte. Die Kombination des Multityrosinkinase-Inhibitors Regorafenib und des Bcl-2-Inhibitors stellt daher einen möglichen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung von PNETs *in vitro* und auch *in vivo* dar. Weiterführende Experimente im RIP1Tag2-Mausmodell wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

#### 4.10 Einfluss von Regorafenib auf Makrophagen und das Tumormikromilieu *in vitro* und *in vivo*

Der Einfluss des Tumormikromilieus stellt einen weiteren Mechanismus dar, der zu einem gesteigerten Tumorwachstum und einer erhöhten Invasivität von Tumoren führen kann. Auch aufgrund der gezeigten Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass Regorafenib Effekte auf Zellen des Tumormikromilieus ausübt, welche wiederum die Resistenz durch parakrine Effekte auf die Tumorzellen vermitteln. Da auch in pankreatisch neuroendokrinen Tumoren die Infiltration von Makrophagen mit einer schlechten Prognose des Patienten verbunden ist, stellen Tumor-assoziierte Makrophagen einen wichtigen Zelltyp des Tumormikromilieus in dieser Tumorentität dar. Der CSF1R-Rezeptor von Makrophagen ist bereits als eine Zielstruktur von Regorafenib beschrieben. In den folgenden Experimenten sollte daher der Effekt von Regorafenib auf Makrophagen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

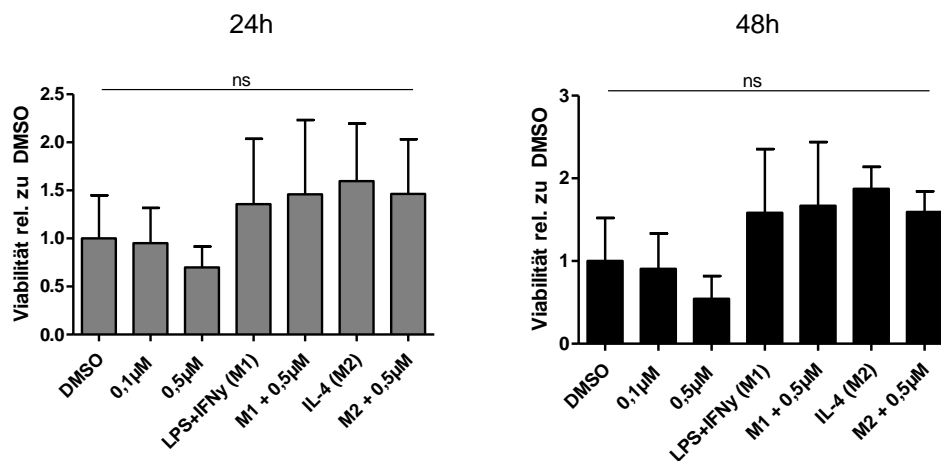
##### 4.10.1 Einfluss von Regorafenib auf die Viabilität von primären murinen Makrophagen *in vitro*

Im ersten Schritt sollte der Effekt von Regorafenib auf die Viabilität in primären murinen Makrophagen untersucht werden. Dazu wurden Monozyten aus dem Knochenmark von WT/BL6-Mäusen isoliert, mit mMCSF für 7 Tage zu Makrophagen differenziert und anschließend für 24 und 48 Stunden mit 0,1 $\mu$ M und 0,5 $\mu$ M Regorafenib behandelt. Die gewählten Regorafenib-Konzentrationen wurden, vergleichbar zu den PNET-Zelllinien, anhand des ermittelten IC<sub>50</sub>-Werts ausgewählt. Im ATP-basierten Viabilitäts-Assay zeigte sich ein zeit- und dosisabhängiger Effekt von Regorafenib auf die Makrophagen (Abbildung 61).



**Abbildung 61: Regorafenib senkt die Viabilität von Makrophagen zeit- und dosisabhängig.** Dargestellt ist die gemessene Lumineszenz nach einer Behandlung mit 0,1% DMSO, 0,1 $\mu$ M und 0,5 $\mu$ M Regorafenib für 24 und 48 Stunden relativ zur DMSO-Kontrolle. Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichung ( $\pm$ SD) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (ns nicht signifikant).

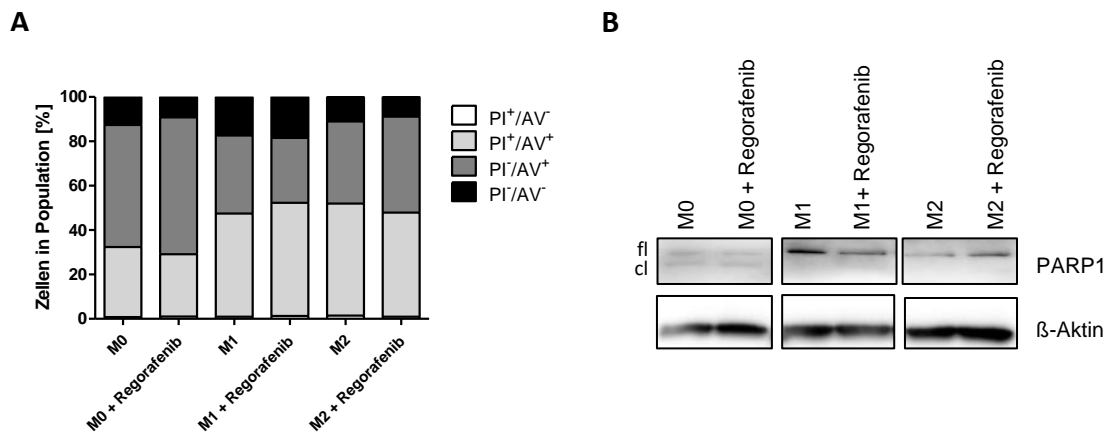
Da sich in dem Tumormikromilieu neben M0-Makrophagen ebenfalls Tumor-fördernde M2-polarisierte Makrophagen und pro-inflammatorische M1-Makrophagen befinden, sollte außerdem der Effekt auf diese drei Subpopulationen untersucht werden. Dazu wurden die primären Makrophagen zunächst mit LPS+IFN $\gamma$  und IL-4 in M1- bzw. M2-Makrophagen polarisiert und anschließend mit 0,5 $\mu$ M Regorafenib für weitere 24 und 48 Stunden behandelt. Die Polarisation wurde mittels qRT-PCR anhand von jeweils zwei charakteristischen M1- und M2-Markern bestätigt (siehe Anhang Abbildung 80). Die Auswertung des Viabilitäts-Assays zeigte zum einen, dass polarisierte Makrophagen eine deutlich höhere Viabilität haben, als die unpolarisierten M0-Makrophagen. Außerdem wurde deutlich, dass der beschriebene inhibierende Effekt von Regorafenib auf M0-Makrophagen in den polarisierten M1 – und M2-Makrophagen fast aufgehoben war (Abbildung 62). Somit scheint Regorafenib in dieser gewählten Konzentration insbesondere die M0-Makrophagen, weniger jedoch die polarisierten Makrophagen zu inhibieren.



**Abbildung 62: Effekt von Regorafenib auf die Viabilität von polarisierten Makrophagen.** Darstellung der gemessenen Lumineszenz nach einer Behandlung mit 0,5 $\mu$ M Regorafenib für 24 und 48 Stunden relativ zur DMSO-Kontrolle. Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichung ( $\pm$ SD) von 5 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (ns nicht signifikant).

4.10.2 Einfluss von Regorafenib auf die Viabilität in primären Makrophagen *in vitro*

Um zu untersuchen, ob Regorafenib in den primären Makrophagen zur Induktion von Apoptose führt und ob diese in den drei Subpopulationen unterschiedlich stark ausfällt, wurden Annexin V / Propidium (PI)-Iodid-Färbungen durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Dabei stellen die PI<sup>-</sup>/Annexin V<sup>-</sup>-Zellen die früh-apoptotischen Zellen und die PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup>-Zellen die spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen dar. In dieser Auswertung konnte gezeigt werden, dass Regorafenib in keinen der drei Subpopulationen (M0, M1 und M2) zu einer gesteigerten Apoptose im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führte. Neben der erhöhten Viabilität, gemessen im ATP-Assay (Abbildung 62), lag der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen der M1- und M2-Makrophagen niedriger als in den unpolarisierten M0-Makrophagen (Abbildung 63A). Western Blot-Experimente konnten dieses Ergebnis durch das Fehlen eines gespaltenen PARP1 unterstützen (Abbildung 63B).

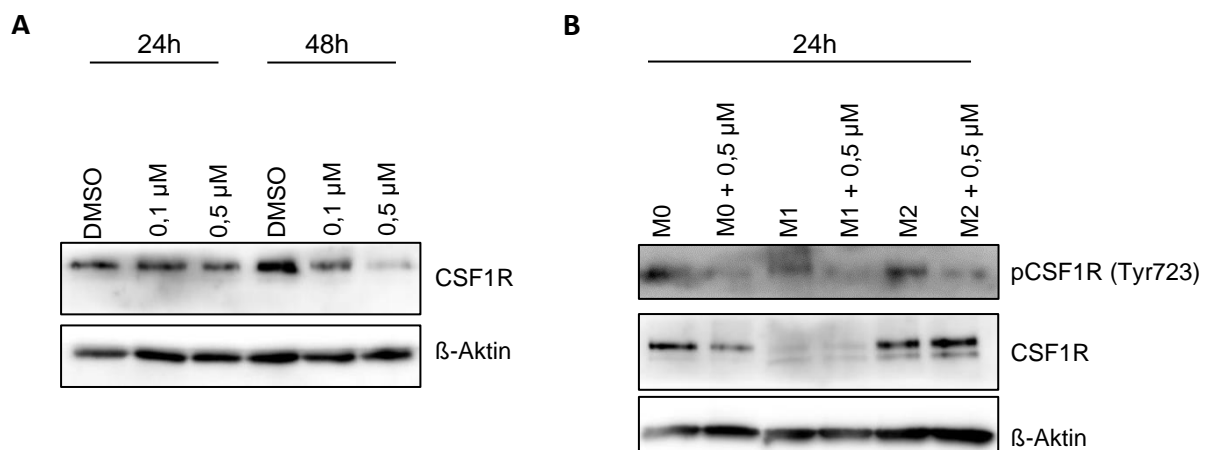


**Abbildung 63: Effekt von Regorafenib auf die Apoptose-Induktion in M0-, M1- und M2-Makrophagen.** Die primären Makrophagen aus nicht transgenen Mäusen wurden wie zuvor beschrieben für 4h durch die Zugabe von LPS+IFN $\gamma$  bzw. IL-4 zu M1 – und M2-Makrophagen polarisiert oder unbehandelt gelassen (M0). **(A)** Nach einer weiteren 24-stündigen Behandlung mit 0,5 $\mu$ M Regorafenib wurden der prozentuale Anteil von Propidium-Iodid (PI) und Annexin V (AV) durchflusszytometrisch bestimmt und früh-apoptotische Zellen (PI<sup>-</sup>/Annexin V<sup>+</sup>) von nekrotischen Zellen (PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup>) unterschieden. **(B)** Die Proteinlysate wurden in Western Blot-Experimenten hinsichtlich des Apoptose-Markers PARP1 untersucht (fl=full length, cl=cleaved).

#### 4.10.3 Der CSF1-Rezeptor als eine mögliche Zielstruktur von Regorafenib in Makrophagen

Im nächsten Schritt sollte der Frage nachgegangen werden, welche Mechanismen zur gesenkten Viabilität der Makrophagen führen. Da der CSF1-Rezeptor bereits in der Literatur als eine beschriebene Zielstruktur von Regorafenib aufgeführt wird und eine wichtige Rolle in der Differenzierung und dem Überleben von Makrophagen spielt, stellte dieser Makrophagen-spezifische Rezeptor einen interessanten Angriffspunkt dar.

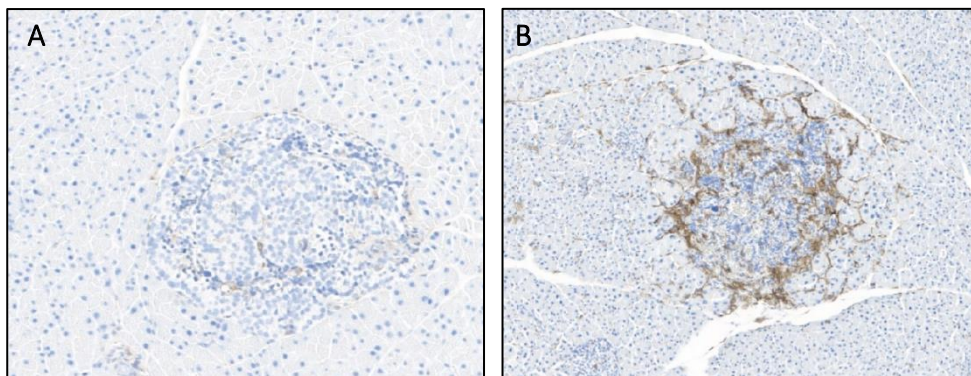
Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden zuerst primäre M0-Makrophagen für 24h und 48h mit Regorafenib behandelt und die CSF1R-Expression mittels Western Blot analysiert. Anhand dieser Ergebnisse konnte eine deutliche Reduktion des CSF1-Rezeptors in den primären M0-Makrophagen unter Regorafenib zeit- und dosisabhängig gezeigt werden (Abbildung 64A). In weiteren Western Blot-Analysen mit Regorafenib behandelten M0-, M1- und M2-Makrophagen konnte die Reduktion des CSF1-Rezeptors in den M0-Makrophagen bestätigt werden. Allerdings haben die Ergebnisse auch gezeigt, dass M1-Makrophagen eine nur sehr geringe CSF1R-Expression aufwiesen und diese durch Regorafenib nicht weiter inhibiert werden konnte. Die M2-Makrophagen wiesen im Vergleich zu den M0-Makrophagen eine etwas höhere CSF1R-Expression auf, die jedoch durch Regorafenib ebenfalls nicht beeinflusst wurde (Abbildung 64B). Ergänzend zu diesen Ergebnissen konnte eine Aktivität des CSF1R in M0-, M1- und M2 Makrophagen nachgewiesen werden, welche in den M1-Makrophagen erneut am geringsten ausfiel. Allerdings führte hierbei die Regorafenib-Behandlung in allen drei Makrophagen-Subtypen zu einer deutlich gesenkten CSF1R-Aktivität und einer damit verbundenen reduzierten Signaltransduktion.



**Abbildung 64: Effekt von Regorafenib auf das CSF1R-Expressionslevel in murinen primären Makrophagen.** Die unpolarisierten M0-makrophagen wurden wie vorher beschrieben in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24h und 48h mit 0,1% DMSO, 0,1 und 0,5 μM Regorafenib (**A**) oder zunächst in M1- und M2-Makrophagen polarisiert und für 24h mit 0,5μM Regorafenib behandelt (**B**). Die Proteinlysate wurden in Western Blot-Experimenten auf das Expressionslevel des CSF1R und pCSF1R (Tyr723) untersucht. Die Western Blot-Analyse stellt repräsentativ eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

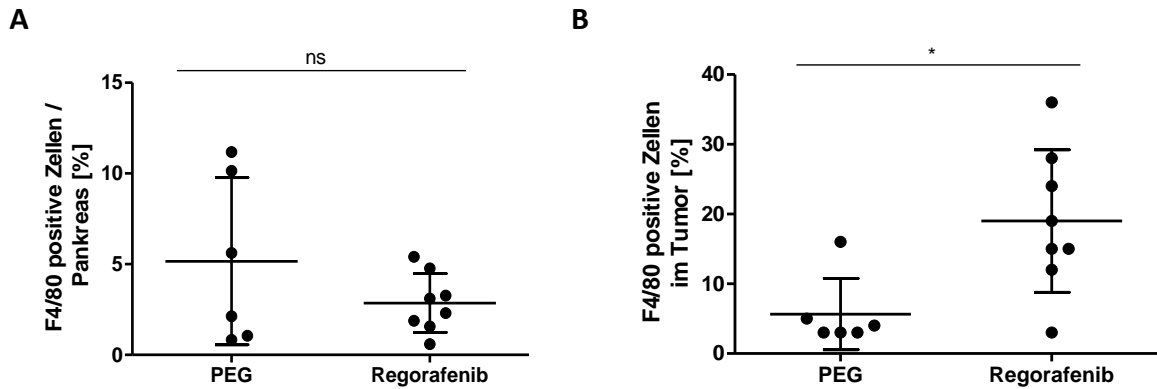
#### 4.11 Einfluss von Regorafenib auf Makrophagen in der Tumorentstehung

Aufbauend auf den *in vitro* Ergebnissen sollte der Effekt von Regorafenib auf Makrophagen untersucht werden. Zum Nachweis der Makrophagen in den Pankreata der behandelten RIP1Tag2-Mäuse wurden immunhistochemische Färbung gegen das Antigen F4/80 durchgeführt. F4/80 ist ein Glykoprotein und auf der Zelloberfläche von murinen Makrophagen exprimiert. Exemplarische F4/80-Färbungen aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe sind in Abbildung 65 dargestellt.



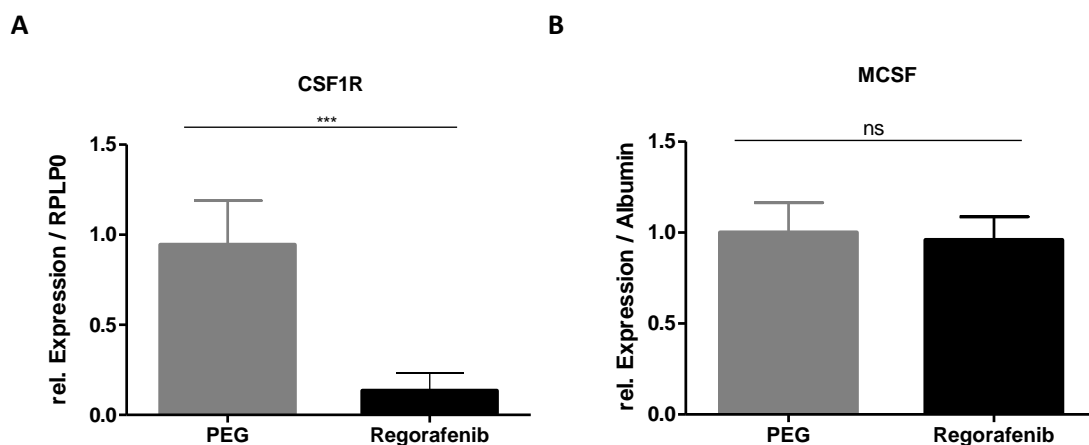
**Abbildung 65: F4/80-Färbungen von Insulinomen der RIP1Tag2-Mäuse in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.** Exemplarische Aufnahmen der F4/80-Färbungen (braun) von Insulinomen aus der PEG-Gruppe (A) und der Regorafenib-Gruppe (B).

Aus dem Verhältnis der Fläche der F4/80-positiven Zellen und der Gesamtfläche des Gewebeschnittes wurde der prozentuale Anteil von F4/80 im Gesamtgewebe und im Tumor bestimmt. Im Gesamtgewebe konnte eine erkennbare, wenn auch nicht signifikante, Reduktion der F4/80-positiven Zellen durch die Regorafenib-Behandlung ermittelt werden. Dabei lag der prozentuale Anteil der F4/80-positiven Zellen in der PEG-Kontrollgruppe bei 5,2% und in der Regorafenib-Gruppe bei 2,9% (Abbildung 66A). Innerhalb des Tumors zeigte sich allerdings ein signifikanter Anstieg der F4/80-positiven Zellen in der Regorafenib-Gruppe im Vergleich zur PEG-Gruppe: mit einem prozentualen Anteil von 19% in der Regorafenib-Gruppe war dieser fast vierfach so hoch wie in der PEG-Kontrollgruppe mit 5,7% (Abbildung 66B;  $p=0,04$ ).



**Abbildung 66: Quantitative Ermittlung der Makrophagen mittels F4/80.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe **(A)** und im Tumor **(B)** mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (\* $p < 0,05$ ; ns nicht signifikant).

Basierend auf den *in vitro* Ergebnissen, in denen sich ein inhibierender Effekt von Regorafenib auf den CSF1-Rezeptor der Makrophagen gezeigt hatte, sollte untersucht werden, ob sich dies auch in den Behandlungsgruppen der RIP1Tag2-Mäuse wiederholte. Dazu wurde die Expression des CSF1-Rezeptors auf RNA-Ebene untersucht und der Gehalt von MCSF im Serum der Tiere bestimmt. Dabei zeigte sich mithilfe der densitometrischen Bestimmung der Western Blot-Experimente eine signifikante Reduktion des Rezeptors unter der Regorafenib-Behandlung im Vergleich zur PEG-Kontrollgruppe. MCSF, der Ligand des CSF1R blieb hingegen nahezu unverändert (Abbildung 67; siehe ebenfalls Anhang Abbildung 78).



**Abbildung 67: Bestimmung des CSF1-Rezeptors und MCSF in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.** Aus den Paraffinschnitten der Pankreata wurde wie vorher beschrieben RNA isoliert und diese mittels qRT-PCR hinsichtlich der CSF1-Rezeptor-Expression, normiert auf den Gehalt von RPLP0, untersucht **(A)**. Der Gehalt von MCSF im Serum wurde mittels Western Blot und densitometrischer Auswertung, normiert auf Albumin, ermittelt **(B)**. Es sind die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen ( $\pm$ SD) der PEG – und Regorafenib-Gruppe dargestellt (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



Im Anschluss wurden die immunhistochemischen CSF1R-Färbungen der Pankreata ausgewertet. Dabei wurde erneut der prozentuale Anteil des CSF1R im Gesamtgewebe und im Tumor ermittelt. In der Tumorentstehung zeigte sich unter Regorafenib-Behandlung ein signifikanter Anstieg des Rezeptors im Gesamtgewebe (PEG: 4%; Regorafenib: 7%) und im Tumor (PEG: 23%; Regorafenib: 49%) (Abbildung 68)

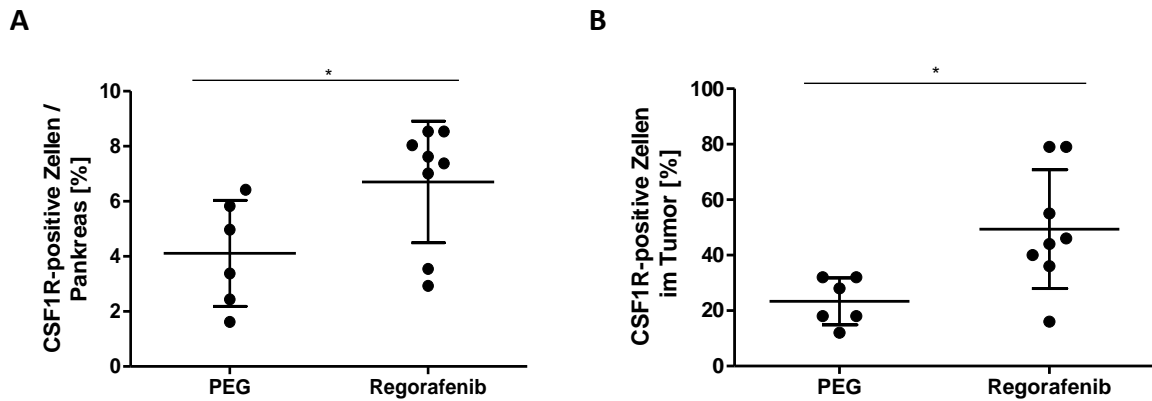
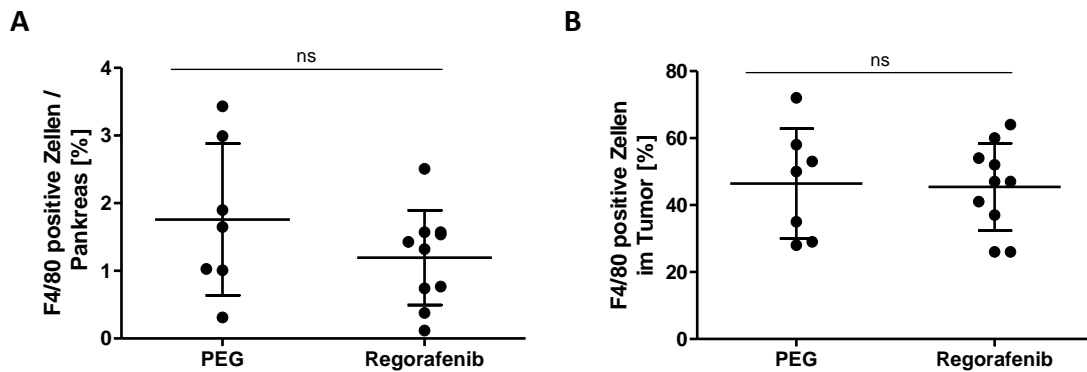


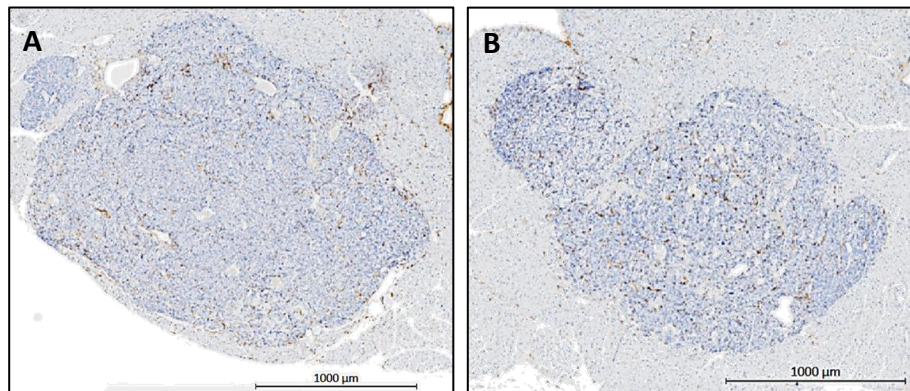
Abbildung 68: Quantifizierung der immunhistochemischen CSF1R-Färbung in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung. Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (\* $p < 0,05$ ).

## 4.12 Einfluss von Regorafenib auf Makrophagen während des Tumorwachstums

Die Auswertung der immunhistochemischen F4/80-Färbungen ergab während des Tumorwachstums eine leichte, jedoch nicht signifikante, Reduktion der Makrophagen unter Regorafenib-Behandlung im Gesamtgewebe (Regorafenib: 1,2%; PEG:1,8%). Innerhalb des Tumors war kein Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen zu erkennen (Regorafenib: 45,4%; PEG: 46,4%) (Abbildung 69).

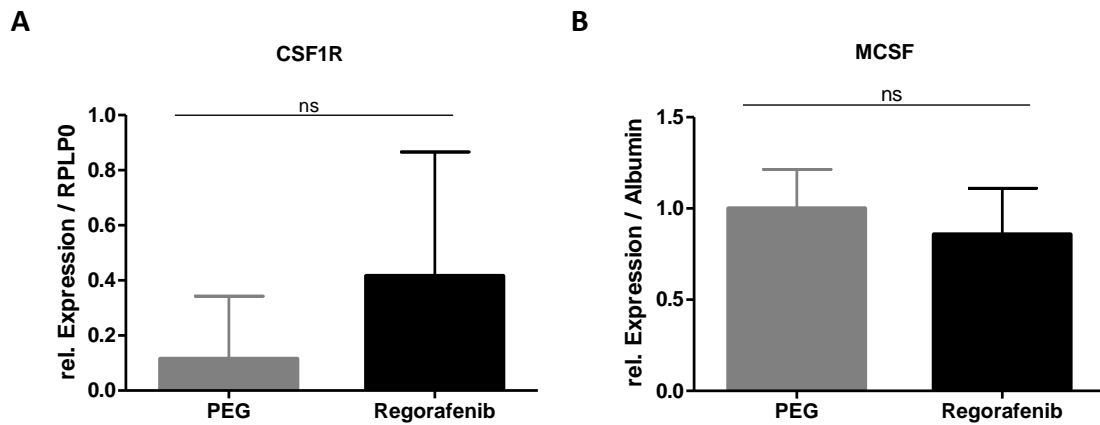


**Abbildung 69: Quantitative Ermittlung der Makrophagen mittels F4/80.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe **(A)** und im Tumor **(B)** mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).



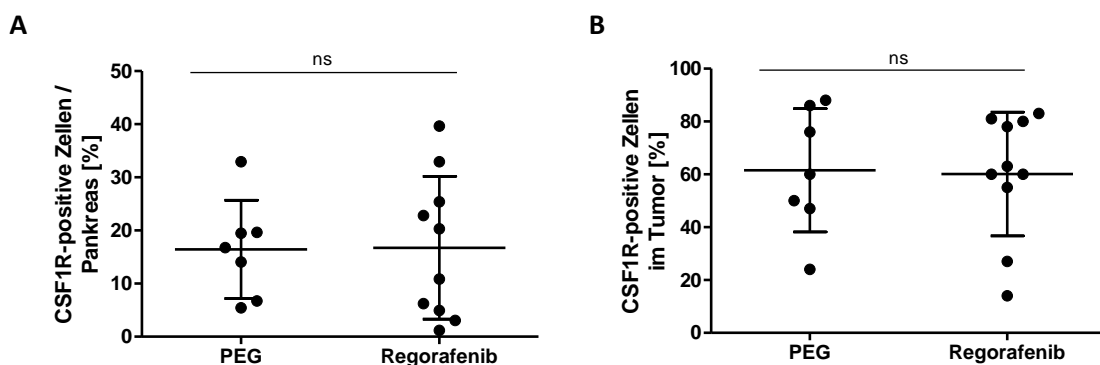
**Abbildung 70: F4/80-Färbung von Insulinomen.** Exemplarische Aufnahmen der F4/80-Färbungen (braun) von Insulinomen aus der PEG-Gruppe **(A)** und der Regorafenib-Gruppe **(B)** (10x Vergrößerung).

Analog zur Tumorentstehung wurde die CSF1R-Expression auf RNA-Ebene und der Gehalt von MCSF im Serum der beiden Behandlungsgruppen während des Tumorwachstums bestimmt. Dabei konnte keine signifikante Änderung des CSF1R im Gewebe und MCSF im Serum unter der Regorafenib-Therapie detektiert werden (Abbildung 71, siehe ebenfalls Anhang Abbildung 79).



**Abbildung 71: Bestimmung des CSF1-Rezeptors und MCSF in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.** Aus den Paraffinschnitten der Pankreata wurde wie vorher beschrieben RNA isoliert und diese mittels qRT-PCR hinsichtlich der CSF1-Rezeptor-Expression, normiert auf den Gehalt von RPLPO, untersucht (A). Der Gehalt von MCSF im Serum wurde mittels Western Blot und densitometrischer Auswertung, normiert auf Albumin, ermittelt (B). Es sind die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen ( $\pm$ SD) der PEG – und Regorafenib-Gruppe dargestellt (ns nicht signifikant).

Im Anschluss wurden die immunhistochemischen CSF1R-Färbungen der Pankreata aus der Interventionsstudie des Tumorwachstums ausgewertet. Dabei zeigte sich wie in den bisherigen Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen kein Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen. Der prozentuale Anteil von CSF1R-positiven Zellen war im gesamten Gewebe und im Tumor annähernd gleich.



**Abbildung 72: Quantifizierung der immunhistochemischen CSF1R-Färbung in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.** Darstellung der prozentualen Einzelwerte der Mäuse aus der PEG- und Regorafenib-Gruppe im Gesamtgewebe (A) und im Tumor (B) mit der Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ( $\pm$ SD) (ns nicht signifikant).

### 4.13 Einfluss von Regorafenib auf die Entstehung eines tumorfördernden Mikromilieus

Neben den bisher untersuchten myeloischen Zellen, wie tumorassoziierte Makrophagen (TAMs), spielen regulatorische T-Zellen (Tregs) ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung des Tumormikromilieus. Durch ihre immunsupprimierenden Eigenschaften können sie die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort blockieren und darüber das Tumorwachstum fördern.

Um zu untersuchen, ob diese Subpopulation von T-Lymphozyten zu dem schlechten Ansprechen auf die Regorafenib-Therapie in den RIP1Tag2-Mäusen beiträgt, wurden weitere qRT-PCR-Analysen anhand der aus den Paraffinschnitten gewonnenen RNA durchgeführt (Abbildung 73).

In der Studie zum Effekt auf die Tumorentstehung konnte dabei ein signifikanter Anstieg von FOXP3<sup>+</sup>-Zellen infolge der Regorafenib-Therapie ermittelt werden. Dies war ebenfalls mit einer erhöhten Expression von CD69 und Granzyme B verbunden. Durch die Reduktion des PD-1-Markers und einer gleichzeitigen Erhöhung des PD-1-Liganden wird die aufgestellte Hypothese eines immunsupprimierenden Milieus gestärkt.

In der Studie zum Effekt auf das Tumorwachstum ist dieser Trend insbesondere an dem signifikanten Anstieg von CD69 und Granzyme B unter der Regorafenib-Therapie zu beobachten. Die Expression von FOXP3<sup>+</sup>-Zellen war in dieser Spätphase ohne signifikanten Unterschied.

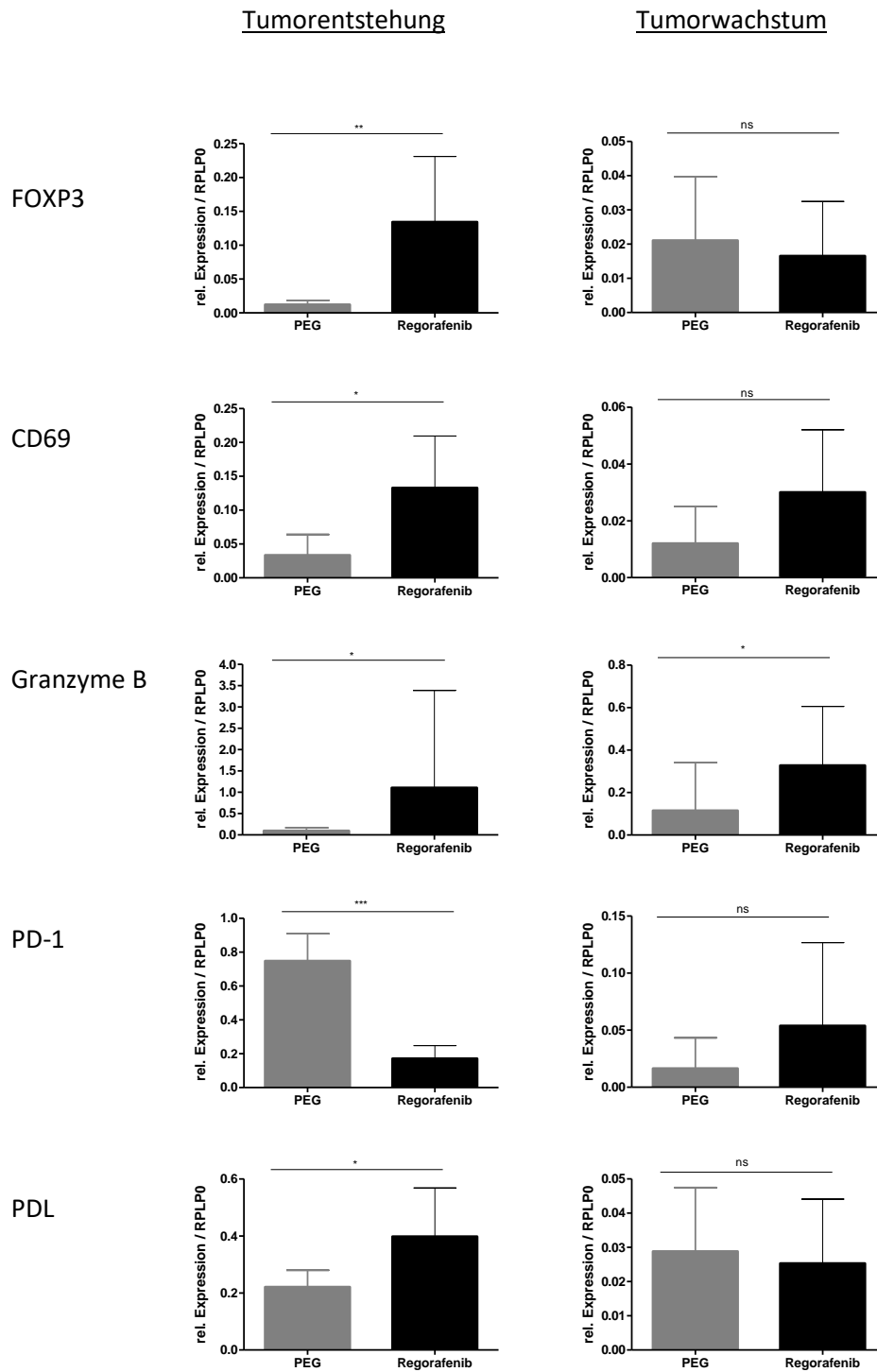


Abbildung 73: Regorafenib induziert ein immunsupprimierendes Tumormikromilieu während der Tumorentstehung und des Tumorstadiums. Aus den Paraffinschnitten der Pankreata wurde wie vorher beschrieben RNA isoliert und diese mittels qRT-PCR, normiert auf den Gehalt von RPLP0, untersucht. Es sind die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen ( $\pm$ SD) der PEG – und Regorafenib-Gruppe dargestellt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns nicht signifikant).

## 5 Diskussion

Pankreatisch neuroendokrine Tumore stellen eine seltene Tumorentität dar, die nur etwa 1-2% aller pankreatischen Neoplasien ausmacht. Aufgrund der verbesserten Diagnosemöglichkeiten hat sich die Inzidenzrate in den letzten 10 Jahren jedoch nahezu verdoppelt (Liu *et al.* 2013, Maxwell *et al.* 2016). Wenn die Tumore in einem bereits fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden, kann eine vollständige Heilung durch eine chirurgische Entfernung des Tumors oft nicht mehr erfolgen. Gezielte Therapien, wie der Einsatz von Sunitinib und Everolimus, können das Tumorwachstum senken. Häufig kommt es jedoch primär oder im Krankheitsverlauf zu einer Therapieresistenz. Aus diesem Grund ist es notwendig, relevante Signalwege und Faktoren, die das Tumorwachstum begünstigen, besser zu verstehen, um neue therapeutische Ansätze zu identifizieren und zu entwickeln.

Durch die Inhibierung diverser Proteinkinasen, die für das Tumorwachstum, die Angiogenese, Metastasierung und die Regulation des Tumormikromilieus eine bedeutende Rolle spielen, konnte der Multityrosinkinase-Inhibitor Regorafenib bereits in anderen Tumormodellen einen deutlichen Erfolg erzielen (Wilhelm *et al.* 2011, Abou-Elkacem *et al.* 2013, Schmieder *et al.* 2014). Auf Basis dieser Vordaten stellt Regorafenib für die Behandlung von PNETs einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar, dessen molekulare Wirkmechanismen und Effektivität in pankreatisch neuroendokrinen Tumoren in der vorliegenden Arbeit *in vitro* und *in vivo* untersucht werden sollten.

### 5.1 Effekte von Regorafenib *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Regorafenib in humanen und murinen pankreatischen neuroendokrinen Zelllinien zu einer reduzierten Viabilität und einem gehemmten Wachstum führte. Dies konnte anhand einer verringerten Zellzahl, einem gesenktem ATP-Gehalt, einer reduzierten Proteinexpression von PCNA und Cyclin D3 sowie einer gesenkten S-Phase in Zellzyklus-Analysen verdeutlicht werden. Da unter den gleichen Versuchsbedingungen in Western Blot-Analysen keine Apoptose-Induktion nachgewiesen werden konnte, ist die Zellzahlreduktion ausschließlich auf ein vermindertes Wachstumsverhalten, nicht jedoch auf das Absterben von Zellen, zurückzuführen.

In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte Regorafenib in Blasen-, Leber- und Kolorektalkarzinomzelllinien ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation ausüben. Entgegen der hier dargestellten Ergebnisse konnte jedoch zusätzlich die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden (Tai *et al.* 2014, Hsu *et al.* 2017, Tsai *et al.* 2017). Das Potential von Regorafenib auf zelluläre und molekulare Prozesse in den Zellen einzuwirken, scheint daher stark von dem zellulären Kontext abzuhängen, der

u.a. die Tumorbiologie, den Mutationsstatus, Proliferationseigenschaften und die Rezeptor-Ausstattung der einzelnen Zelllinien einschließt. Da die gewählten Regorafenib-Konzentrationen bereits dem  $IC_{50}$ -Wert entsprachen, wurden keine höheren, als die hier genannten Konzentrationen, eingesetzt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Experimente unter möglichst physiologisch relevanten Versuchsbedingungen durchgeführt und zudem die zytotoxischen Eigenschaften von DMSO gering gehalten wurden.

Regorafenib und die bereits für die Therapie von PNET zugelassenen Inhibitoren Sunitinib und Everolimus weisen ein unterschiedliches Spektrum inhibierter Kinasen auf. Nach derzeitigem Wissensstand werden durch Regorafenib, als ein Multityrosinkinase-Inhibitor, sowohl Rezeptoren an der Zellmembran als auch intrazelluläre Kinasen inhibiert, wohingegen durch Sunitinib lediglich membranständige Rezeptoren gehemmt werden. Hervorzuheben ist darunter der inhibierende Effekt von Regorafenib auf Raf, Braf sowie die p38-MAPK, die für Sunitinib nicht beschrieben sind (Wilhelm *et al.* 2011, Boichuk *et al.* 2013). Dies kann erklären, warum Regorafenib einen stärkeren Effekt auf die Proliferation und Proteintranslation ausgeübt hat als Sunitinib. Im Einklang mit unseren Erwartungen wurde durch Everolimus, als ausschließlicher mTOR-Inhibitor, lediglich eine reduzierte Proteinexpression des gesamten Ribosomalen Proteins S6 und dessen aktiver Form nachgewiesen. Dies resultierte in einer gehemmten Proteintranslation und leicht gesenkten Proliferation.

Die geschilderten Ergebnisse lassen vermuten, dass die behandelten Zellen in einen Wachstumsarrest übergehen ohne abzusterben. Daher wurde der Effekt auf den Metabolismus mittels Seahorse-Analysen untersucht. Es konnten dabei deutliche Unterschiede innerhalb der drei eingesetzten Inhibitoren Regorafenib, Sunitinib und Everolimus beobachtet werden. Obwohl alle drei Inhibitoren die mitochondriale Atmung senkten, führte Regorafenib zu einer vollständigen Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung.

Eine häufig beschriebene Nebenwirkung, die im Rahmen der Regorafenib-Therapie beim Patienten auftritt, ist die Medikamenten-induzierte Leberschädigung. Dies war Anlass für eine Studie von Zhang *et al.*, worin der Effekt von 31 Kinaseinhibitoren auf isolierte Mitochondrien aus Leberzellen untersucht wurde. Nur drei von 31 untersuchten Kinaseinhibitoren, darunter Regorafenib und das strukturverwandte Sorafenib, übten in dieser Studie eine signifikante Toxizität auf Mitochondrien aus (Zhang *et al.* 2016). Diese Daten werden durch Arbeiten von Weng *et al.* bekräftigt, in denen gezeigt wurde, dass Regorafenib zu einer Entkopplung von isolierten Mitochondrien aus Rattenleberzellen führte (Weng *et al.* 2015). Paech *et al.* konnten den inhibierenden Effekt von Regorafenib in HepG2-Zellen auf die Komplexe II, III und IV der mitochondrialen Atmungskette eingrenzen (Paech *et al.* 2018).

Diese Daten stehen somit im Einklang mit den von uns ermittelten Daten hinsichtlich des Effekts von Regorafenib auf Mitochondrien. Es wären jedoch zusätzliche Untersuchungen notwendig, um eine

exakte Wirkungsweise von Regorafenib bezüglich der Inhibition der verschiedenen Komplexe der Atmungskette beschreiben zu können. Offen bleibt beispielsweise die Frage, warum trotz des deutlichen Effekts von Regorafenib auf die Mitochondrien unter diesen Versuchsbedingungen keine erhöhte Freisetzung von Cytochrom C oder reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise hätte eine längere Behandlungsdauer und die gleichzeitige Reduktion des Serums im Zellkulturmedium ein solches Ergebnis zeigen können.

Im Rahmen der Seahorse-Analysen konnte ein weiterer Unterschied beobachtet werden. Während die Zellen, die mit Sunitinib und Everolimus behandelt wurden, in der Lage waren die maximale Atmung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutlich zu erhöhen, blieb die oxidative Phosphorylierung unter Regorafenib-Therapie stetig auf einem niedrigen Level.

Eine erhöhte maximale Atmung deutet auf eine vermehrte Bereitstellung von Energie hin, welche beispielsweise durch Autophagie erfolgen kann. Die Autophagie beschreibt einen zellulären Prozess, der zum Abbau und zur Beseitigung von geschädigten Organellen sowie fehlgefalteten Proteinen beiträgt. Er dient außerdem als Anpassung an eine mangelnde Energieversorgung. Unter Stressbedingungen werden während des intrazellulären Abbauwegs zytoplasmatische Komponenten zunächst in Doppelmembranvesikeln, sogenannte Autophagosomen, und anschließend in Lysosomen recycelt. Über diesen Mechanismus kann die Energiehomöostase aufrechterhalten und das Überleben der Zellen gefördert werden.

In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit Sunitinib und Everolimus Autophagie induziert, worunter die Inhibierung des mTOR-Signalwegs in vielen Studien als Induktor der Autophagie identifiziert wurde (Giuliano 2015, Wiedmer *et al.* 2017, Avniel-Polak *et al.* 2018, Paquette *et al.* 2018). Der Nachweis von Autophagie-Prozessen erfolgt häufig über LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B*). Der lysosomale Umsatz von LC3-I zu LC3-II spiegelt die induzierte Aktivität der Autophagie wider und stellt somit ein zuverlässiges Verfahren zur Untersuchung von Autophagie dar. In den hier präsentierten Daten konnte die Autophagie-Induktion insbesondere für Sunitinib anhand des Autophagiemarkers LC3B bestätigt werden, welche eine Erklärung für die erhöhte maximale Atmung in den Metabolismus-Studien darstellt. Die Zugabe eines Autophagie-Inhibitors (Bafilomycin A1 bzw. Chloroquin) induzierte in den Sunitinib- und Everolimus-behandelten Zellen Apoptose, sodass die Autophagie-Induktion als ein Überlebensmechanismus identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Experimente bezüglich der Rolle von Autophagie unter der Therapie mit Sunitinib und Everolimus in PNET-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Des Weiteren reagierten die mit Sunitinib und Everolimus behandelten Zellen auf die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette mit einer Erhöhung der Glykolyse-Rate. Über diesen Mechanismus können Zellen auf einen anderen, wenn auch weniger effizienten, Energiestoffwechsel ausweichen und darüber



weiterhin Energie gewinnen. Dieser kompensatorische Mechanismus war unter der Regorafenib-Behandlung nicht zu erkennen.

Zur Erforschung des Insulinoms *in vitro* stehen nur sehr wenige adäquate murine Zelllinien zur Verfügung, worunter die transformierten Insulinomzelllinien  $\beta$ TC3 und MIN6 die häufigste Anwendung in der Diabetes-Forschung finden (Skelin *et al.* 2010, Babu *et al.* 2013). Da es jedoch nur wenige geeignete murine Zelllinien zur Erforschung von PNETs gibt, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit eigenständig Zelllinien aus RIP1Tag2-Mäusen isoliert und etabliert. Diese haben den großen Vorteil, dass sie äquivalente Charakteristiken zu den untersuchten Tierkohorten aufweisen.

Die hier benannten HMEG-Zelllinien wurden zunächst anhand der von uns festgestellten Expression des Transkriptionsfaktors PDX1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*), Chromogranin A sowie des SV40 large T-Antigen und Insulin, die spezifisch und ausschließlich in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert werden, als pankreatisch neuroendokrine Zellen charakterisiert.

Die hier vorgestellten Daten zeigten, dass Regorafenib neben den humanen Zelllinien BON-1 und QGP-1 auch die Viabilität und die Proliferationsrate der drei murinen  $\beta$ -Tumorzelllinien senkt.

In den Viabilitäts-Experimenten konnte dabei ein dosisabhängiger Effekt von Regorafenib nachgewiesen werden, welcher in den HMEG-1-Zellen am schwächsten und in den HMEG-3-Zellen am stärksten ausgeprägt war. Weiterführende Western Blot-Experimente haben gezeigt, dass Regorafenib auch in diesem Zellsystem unter den gewählten Konzentrationen nur zu einer sehr schwachen Induktion von Apoptose geführt hat, wodurch die reduzierte Zellzahl ebenfalls nicht durch das Absterben der Zellen durch Regorafenib zu begründen ist.

Neben einer verringerten Zellzahl und einem reduzierten Expressionslevel von PCNA und Cyclin D3 konnte in den murinen Zelllinien im Gegensatz zu den humanen Zelllinien eine Zunahme der S-Phase ermittelt werden. Es handelt sich dabei um einen S-Phase-Arrest, der u.a auch schon in der Behandlung mit Doxorubicin und Resveratrol in Folge von DNA-Schäden beschrieben wurde (Joe *et al.* 2002, Trapé *et al.* 2012). In EdU-Experimenten wurde die gehemmte Proliferation der HMEG-Zellen trotz des S-Phase-Anstiegs unter Regorafenib-Therapie bestätigt.

Innerhalb der drei isolierten HMEG-Zelllinien wiesen die HMEG-1-Zellen eine hohe Expression des mesenchymalen Markers N-Cadherin und eine gleichzeitige Abwesenheit von E-Cadherin auf. In den HMEG-2- und 3-Zelllinien konnte das Gegenteil beobachtet werden. Die untersuchten Differenzierungsmarker weisen daher auf einen deutlich aggressiveren Phänotyp der HMEG-1-Zellen hin. In den *in vitro* Untersuchungen wurde deutlich, dass die Effekte von Regorafenib auf die Zellviabilität in diesen Zellen am geringsten ausfielen. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass eine erhöhte N-Cadherin-Expression mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie verbunden ist. Ein gezieltes Ausschalten von transkriptionellen Suppressoren mittels siRNA konnte den „Cadherin-Switch“ rückgängig machen und

die Sensitivität auf eine Therapie erhöhen. Der ermittelte Cadherin-Status der HMEG-Zellen könnte somit das unterschiedliche Ansprechen auf die Regorafenib-Behandlung erklären (Li *et al.* 2001, Kajita *et al.* 2004, Wheelock *et al.* 2008, Arumugam *et al.* 2009, Yamauchi *et al.* 2011). In Hinblick auf die weiteren von uns untersuchten Parameter, wie Proliferationseigenschaften und Apoptose-Induktion, schien der EMT-Status jedoch keinen bedeutenden Einfluss zu nehmen.

## 5.2 Regorafenib steigert die Proliferation und Invasivität *in vivo*

Die bereits dargestellten und diskutierten Ergebnisse konnten erstmals einen deutlichen Effekt von Regorafenib auf die Zellviabilität, Proliferation und den Metabolismus in humanen und murinen PNET-Zelllinien *in vitro* nachweisen. Doch da Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten alleine nicht ausreichen, um Aussagen über einen gesamten Organismus zu treffen, wurde der Effekt von Regorafenib in dem transgenen RIP1Tag2-Mausmodell untersucht.

Eine der wichtigsten Kriterien in der Bewertung von Tumorthapeutika liegt in dem Einfluss auf die Überlebensdauer und die Tumormasse des Patienten.

In der Studie von der 6.-9. Lebenswoche (Tumorentstehung) hat die Kaplan-Meier-Überlebenskurve in beiden Behandlungsgruppen eine 100%ige Überlebensrate ergeben. Dies stand im Einklang mit unseren Erwartungen, da die Tumormasse und die mit der Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen verbundene Hypoglykämie zu diesem Zeitpunkt noch nicht zum Tod führt. Ein positiver Einfluss von Regorafenib auf die Überlebensdauer wäre daher zu diesem Zeitpunkt nicht aufgefallen.

Anhand des Gewichtsverlaufs konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen identifiziert werden. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Regorafenib-Behandlung weder zu einer Gewichtsabnahme, wie auftretende Medikamenten-Unverträglichkeit oder Leberschäden, noch das Tumorwachstum zu einer Gewichtszunahme geführt hat.

Obwohl in den *in vitro* Untersuchungen ein deutlicher Effekt auf das Wachstum der gewählten Zelllinien ermittelt werden konnte, führte Regorafenib in der frühen Tumorentstehung unerwarteterweise zu einem deutlichen Anstieg der Tumorgroße. Während der Anteil von Ki-67-positiven Zellen im gesamten Gewebe noch nicht signifikant erhöht war, war diese im Tumor nahezu verdoppelt. Diese Daten wurden durch den signifikant höheren Anteil von stark proliferierenden Tumoren in der Regorafenib-Gruppe mit einem Ki-67-Index über 55% bekräftigt.

In der zweiten Studie (Tumorwachstum) wurden die Mäuse von der 9.-15. Lebenswoche behandelt. Zum Ende dieser Behandlungsdauer führt die massive Insulinproduktion der  $\beta$ -Zell-Tumore zu einer Hypoglykämie, infolge dessen die Mäuse spontan versterben können. Anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve konnte kein signifikanter Überlebensunterschied der Regorafenib-Gruppe gegenüber der

PEG-Gruppe ermittelt werden. In dieser Studie wurden alle Mäuse nach einer festgelegten Behandlungsdauer von 6 Wochen getötet. Der Einfluss von Regorafenib auf das Überleben ließe sich hingegen nur eindeutig beantworten, wenn der Gesundheitszustand der Mäuse als Abbruchkriterium gewählt worden wäre. Es kann daher nicht abschließend geklärt werden, ob sich im Rahmen einer Überlebensstudie Unterschiede in der Überlebensdauer ergeben hätten.

In den hier gezeigten Ergebnissen zeigte sich ebenfalls kein Unterschied in der Tumorphäche und im Anteil proliferierender Zellen im Tumor sowie im gesamten Pankreasgewebe. Allerdings führte Regorafenib, wie in der Tumorentstehung, zu einem signifikant höheren Anteil von hochproliferierenden Tumoren mit einem Ki-67-Index über 55% im Vergleich zur PEG-Kontrollgruppe.

Diese Daten waren unerwartet und im Widerspruch zu einigen bereits beschriebenen Effekten von Regorafenib: In einem Xenograftmodell mit Kolonkarzinom-Zelllinien konnte Regorafenib das Tumolvolumen um 75% reduzieren (Wilhelm *et al.* 2011). In Xenograft-Experimenten mit Tumormaterial aus Patienten („*patient-derived xenograft*“, PDX) konnte Regorafenib hingegen nur noch einen moderaten Effekt erzielen (Schmieder *et al.* 2014).

Die Wahl des Mausmodells stellt einen großen und möglicherweise entscheidenden Faktor bei der Erklärung der Unterschiede zwischen der hier vorgestellten Studie und den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Regorafenib auf einen Tumor untersucht, der sich stufenweise innerhalb eines komplexen Netzwerks aus verschiedenen Zelltypen des Tumorstromas bildet. Zudem ist im RIP1Tag2-Mausmodell im Gegensatz zu den Xenograft-Modellen ein intaktes Immunsystem vorhanden. In den Xenograft-Modellen hingegen, in denen die entgegengesetzten Daten erhoben worden waren, wurde der Effekt auf einen xenogenen Tumor, der durch eine injizierte Zellsuspension oder ein implantiertes Tumormaterial induziert wurde, ohne funktionales Immunsystem untersucht. Auf Grundlage dieser Unterschiede lässt sich bereits vermuten, dass die Wahl des Mausmodells einen entscheidenden Einfluss auf die Aussage eines Experiments nehmen und ebenso zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

Zusammenfassend legen die hier präsentierten Daten nahe, dass Regorafenib trotz seiner multiplen Angriffspunkte auf diverse Signalwege in der Tumorzelle das Wachstum von Tumoren *in vivo* während der Tumorentstehung durch eine komplexe Stroma-Interaktion bzw. die Induktion von Resistenzmechanismen signifikant fördert, anstatt es zu hemmen. Diese mehrfach beschriebenen „Escape“-Mechanismen von Tumorzellen können zur verstärkten Invasion und Metastasierung beitragen.

Die Invasivität von Tumoren und die damit verbundene Metastasierung von Tumorzellen in das umliegende Gewebe und in ferne Körperbereiche ist eine häufige Ursache für die hohe Mortalität von Krebspatienten. Zu den komplexen Mechanismen der Invasivität zählen insbesondere der Verlust von Zell-

Zell-Kontakten und Zell-Adhäsionsmolekülen sowie die Degradation der Extrazellulären Matrix durch Matrixmetalloproteinasen oder Cathepsinen.

Sowohl in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung als auch des Tumorwachstums führte die Regorafenib-Behandlung zu einer gesteigerten Invasivität der Tumore.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Studien von Ebos *et al.* beobachtet werden, in denen die VEGF-Inhibition mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab zu einer gesteigerten Invasivität der Tumore in Glioblastom-Patienten führte (Ebos *et al.* 2009).

Weitere Studien im RIP1Tag2-Mausmodell konnten einen Anstieg der Cathepsin-Expression im Verlauf der Tumorprogression nachweisen (Gocheva *et al.* 2006). Auch die hier vorgestellten Daten zeigten einen leichten Anstieg von Cathepsin B in den mit Regorafenib behandelten Tieren anhand von immunohistochemischen Färbungen. Da der gesamte prozentuale Anteil von Cathepsin B-positiven Zellen im Pankreasgewebe mit 2% jedoch sehr niedrig war, wird davon ausgegangen, dass neben den proinvasiven Eigenschaften von Cathepsin B weitere Faktoren die Invasivität der Inseln begünstigt haben.

So konnte bereits in diversen präklinischen und klinischen Studien gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Matrixmetalloproteinasen (MMP), einschließlich MMP-9, sowie deren proteolytische Aktivität mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden war. Es wurde außerdem beschrieben, dass durch MMP-9 in dem RIP1Tag2-Mausmodell der angiogene Switch gefördert wird und darüber die invasiven Eigenschaften der Insulinome gefördert werden (Bergers *et al.* 2000, Giraudo *et al.* 2004, Sillanpaa *et al.* 2014, Shchors *et al.* 2013). Es wäre daher in Nachfolge-Experimenten sinnvoll zu untersuchen, ob eine gesteigerte MMP-9-Aktivität im Tumor und im umliegenden Gewebe unter der Regorafenib-Therapie die gesteigerte Invasivität der Insulinome erklären könnte.

### 5.3 Regorafenib übt einen geringen Einfluss auf Blutgefäße aus

Die Erkenntnis, dass Tumore für das Wachstum auf die Zufuhr von Nährstoffen über Blutgefäße angewiesen sind, führte zur Entwicklung und dem Einsatz verschiedener anti-angiogener Therapien.

Bevacizumab, der alle Isoformen von VEGF-A inhibiert, wurde als erstes Medikament von der FDA (*Food and Drug Administration*) im Jahr 2004 zugelassen. Daraufhin erfolgte die Zulassung von Multi-Kinase-Inhibitoren, die durch die Inhibition der VEGF- und PDGF-Rezeptoren in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms sowie des fortgeschrittenen metastasierten Kolorektalkarzinoms, Gastrointestinalen Tumoren als auch nicht-kleinzelligen Lungentumoren eingesetzt werden (National Cancer Institute, 2018).

Im Verlauf der Tumorprogression des RIP1Tag2-Mausmodells entstehen infolge des angiogenen Switch ab der 6. Woche stark vaskularisierte  $\beta$ -Zelltumore (Folkmann *et al.* 1989). Da dieses Modell somit sehr gute Voraussetzungen zur Untersuchung von Angiogenese-Inhibitoren erfüllt, diente es bereits in diver-

sen Studien als Modellsystem. Darunter konnten in Studien von Bergers *et al.* vier verschiedene Angiogenese-Inhibitoren im Rahmen einer Präventionsstudie den angiogenen Switch verhindern und das Tumorstadium zu späteren Zeitpunkten der Tumorprogression senken. Jedoch konnte keiner der eingesetzten Inhibitoren das Tumorstadium vollständig hemmen (Bergers *et al.* 1999). Der Einsatz des Kinase-Inhibitors Nintedanib im RIP1Tag2-Mausmodell hat bei der Behandlung der Mäuse ab der 9. Woche zu einer Hemmung der Angiogenese geführt, die sogar mit einer reduzierten Tumormasse und einer längeren Überlebensdauer verbunden war (Bill *et al.* 2015).

Auf Grundlage dieser und weiterer Studien wurde der Effekt von Regorafenib auf bereits bestehende sich neu ausbildende Blutgefäße im RIP1Tag2-Mausmodell untersucht.

Die Auswertungen der immunhistochemischen CD31-Färbungen der Studie hinsichtlich des Effekts auf die Tumorentstehung haben dabei eine deutliche signifikante Reduktion der Blutgefäße im gesamten Pankreasgewebe, aber gleichzeitig einen Anstieg der Blutgefäße innerhalb des Tumors selbst gezeigt. Die hier vorgestellten Daten zeigen somit, dass die vierwöchige Therapie mit Regorafenib die Gefäßbildung im umgebenden Pankreasgewebe hemmt, aber keinen signifikanten inhibierenden Effekt auf die Neubildung der Blutgefäße in den hyperplastischen Inseln hat.

Diese Ergebnisse weisen auf ein in der Literatur häufig diskutiertes Problem von anti-angiogenen Therapien hin. Denn obwohl anti-angiogene Therapien, wie zum Beispiel Bevacizumab in der Behandlung von HER2-negativen Brustkrebspatienten, das Tumorstadium zunächst hemmen und das progressionsfreie Überleben steigern konnten, folgte daraufhin häufig ein rapider Anstieg von Blutgefäßen und des Tumorstadiums. Das vorerst gute Ansprechen auf die Therapie konnte aufgrund auftretender Metastasen und stark proliferierender Tumoren nicht zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamtüberlebens führen. In Mausmodellen wurde die Hochregulation von alternativen pro-angiogenen Faktoren, wie FGF und PDGF als Resistenzmechanismus bereits beschrieben (Casanovas *et al.* 2005, Fernando *et al.* 2008, Giuliano und Pagès 2013). Möglicherweise ist im RIP1Tag2-Modell einer dieser Resistenzmechanismen bereits in der Frühphase der Angiogenese vorhanden.

Als weiterer kompensatorischer Mechanismus infolge von anti-angiogenen Inhibitoren wird auch häufig der Prozess der Lymphangiogenese genannt. Diese tumor-induzierte Lymphangiogenese erfolgt durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren wie VEGF-A und VEGF-C am äußeren Bereich des Tumors, wodurch die Bildung der Lymphgefäße induziert und eine Metastasierung über diese Gefäße gefördert wird (Kopfstein *et al.* 2007, Christiansen und Detmar 2011). Dieser Prozess wurde bereits in Studien mit Sunitinib über die Hochregulation von VEGF-C im Nierenzellkarzinom beschrieben (Dufies *et al.* 2017).

Zusätzlich wird als möglicher Resistenzmechanismus die verstärkte Auskleidung der Blutgefäße mit Perizyten diskutiert (Bergers 2008). Blutgefäße setzen sich aus zwei miteinander agierenden Zelltypen zusammen. Während die Endothelzellen die innere Gefäßwand auskleiden, umfassen die Perizyten die

Oberfläche des Gefäßes. In den Anfängen der Studien mit Angiogenese-Inhibitoren lag der Fokus hauptsächlich auf den Endothelzellen. Der Einfluss von Perizyten auf das Tumorstadium und die Metastasierung, welcher in Arbeiten von Pietras und Hanahan bereits belegt werden konnte, gewinnt jedoch stetig an Bedeutung. Darin wird geschlussfolgert, dass eine effektive Tumorreduktion in RIP1Tag2-Tieren erst durch die wechselnde Gabe eines gezielten PDGFR-Inhibitors und/oder Chemotherapie und eines VEGFR-Inhibitors erfolgen kann. Dadurch wird die protektive Funktion der Perizyten gestört und gleichzeitig neben der toxischen Wirkung der Chemotherapeutika die bestehende Tumorstromatisierung inhibiert (Bergers und Song 2005, Pietras und Hanahan 2005).

In Hinblick auf die in der Arbeit erzielten Ergebnisse wäre es denkbar, dass die Behandlung mit Regorafenib durch eine gesteigerte Auskleidung der Blutgefäße mit Perizyten zu einer Verstärkung der Blutgefäße führt. In der Studie zum Effekt auf das Tumorstadium (9.-15. Woche) konnte im gesamten Gewebe und im Tumor kein signifikanter Effekt von Regorafenib auf die Blutgefäße ermittelt werden. Der angiogene Switch ist zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen und Blutgefäße sind ausreichend für die Versorgung des Tumors gebildet worden. Es wäre vorstellbar, dass die dafür relevanten Signalwege daher nicht mehr aktiv sind und eine Hemmung zu dem späten Zeitpunkt keinen bedeutenden Einfluss auf die herrschenden zellulären Prozesse hat.

Die Daten machen zusammenfassend deutlich, dass der Kinaseinhibitor somit weder auf früh entstehende noch auch auf vollständig ausgebildete Blutgefäße im untersuchten RIP1Tag2-Mausmodell einen signifikanten Effekt ausübt. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass eine direkte Verbindung zwischen der Anzahl von Blutgefäßen und dem Tumorstadium besteht. Denn nur in der Behandlungsgruppe mit einer höheren Anzahl von Blutgefäßen wurde auch eine erhöhte Proliferation ermittelt. In der Studie zur Intervention des Tumorstadiums waren hingegen beide Parameter unverändert.

Die ermittelten Expressionswerte von VEGF-A im Serum der behandelten RIP1Tag2-Mäuse stehen in Diskrepanz zu den immunhistochemischen CD31-Färbungen. Dabei konnte in der Studie von der 6.-9. Woche (Tumorentstehung) eine leichte Reduktion von VEGF-A im Serum detektiert werden. In der Studie von der 9.-15. Woche (Tumorstadium) war der VEGF-A Gehalt im Serum in der Regorafenib-Gruppe signifikant höher als in der Vergleichsgruppe.

Die ermittelten Ergebnisse der Studie zum Effekt auf das Tumorstadium sind vergleichbar mit Studien von Otrrock *et al.*, in denen der VEGF-Gehalt im Plasma und im Serum von Patienten während der Sunitinib-Therapie ebenfalls anstieg (Otrrock *et al.* 2011). In diesem Kontext werden folgende Gründe in Betracht gezogen: (1) durch die Hemmung des Rezeptors wird frei zirkulierendes VEGF von dem Rezeptor freigesetzt, (2) VEGF wird aus internen Speichern von Immunzellen, wie Thrombozyten, und zirkulierenden Tumorzellen kompensatorisch sezerniert oder (3) VEGF steigt in Folge von Hypoxie an. Der letztgenannte Punkt wird in dieser Studie vermutlich keine bedeutende Rolle spielen, da die Blutgefäße selbst

nicht reduziert waren und in histologischen Gewebeschnitten keine erhöhten Apoptose- und Nekrose-raten im Tumor festgestellt werden konnten. Interessanterweise konnte in einer Studie von Ebos *et al.* ein VEGF-Anstieg im Plasma unter anti-angiogenen Therapien auch in nicht-tumortragenden Mäusen nachgewiesen werden, sodass der Mechanismus ebenfalls tumorunabhängig stattfinden könnte (Ebos *et al.* 2007).

#### 5.4 Regorafenib fördert die Entstehung eines tumorfördernden Mikromilieus

Das tumorfördernde Potential des Mikromilieus und dessen therapeutische Inhibition wurden in der Literatur bereits intensiv beschrieben, diskutiert und stehen gegenwärtig im Fokus vieler präklinischer und klinischer Studien. Zu den wichtigsten tumor-fördernden Funktionen zählen darunter der Anstieg der Tumervaskularisierung, die Förderung der Invasion und die Inhibition der anti-tumoralen Immunantwort. Auch in PNETs und in vielen weiteren Tumorentitäten konnte eine Korrelation zwischen der Infiltration von Makrophagen und einer erhöhten Invasion und Metastasierung des Tumors sowie einer schlechteren Prognose des Patienten getroffen werden (Pyonteck *et al.* 2012, Mantovani *et al.* 2017, Zhu *et al.* 2017, Zhao *et al.* 2017). Weitere Studien konnten zudem zeigen, dass die Abwesenheit des CSF-1 als wichtigen Makrophagen-Attraktant in RIP1Tag2-Mäusen das Tumorwachstum signifikant reduzieren konnte. Dieser Effekt war auf einen verminderten angiogenen Switch und einer daraus resultierenden gehemmten Entwicklung des Tumors zurückzuführen (Pyonteck *et al.* 2012, Mantovani *et al.* 2017, Zhu *et al.* 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten neben Tumorzellen auch einen Effekt von Regorafenib auf Makrophagen nachweisen. In den *in vitro* Experimenten übte Regorafenib einen zeit- und dosisabhängigen Effekt auf primäre Makrophagen aus dem Knochenmark von nicht-transgenen Mäusen aus. Im Vergleich zu diesen unpolarierten M0-Makrophagen wiesen die M1- und M2-polarisierte Makrophagen eine höhere Viabilität auf und zeigten sich gleichzeitig deutlich unempfindlicher gegenüber der Regorafenib-Therapie. Da Makrophagen nach der Einwanderung in das Tumorgewebe unter den dort vorherrschenden Faktoren zu verschiedenen Phänotypen differenzieren, spielt der beschriebene Effekt von Regorafenib auf M0-Makrophagen *in vitro* unter physiologischen Bedingungen vermutlich eine untergeordnete Rolle.

Die niedrigere basale Viabilität der M0-Makrophagen konnte aufgrund eines höheren Anteils von Annexin V/Propidium-Iodid-positiven Zellen und einer leichten PARP1-Spaltung im Western Blot bestätigt werden.

Der CSF1R auf Makrophagen ist als Target von Regorafenib beschrieben worden (Kissel *et al.* 2017). Die Western Blot-Ergebnisse konnten eine CSF1-Rezeptor-Expression ausschließlich in M0- und M2-Makrophagen nachweisen. Dies steht im Einklang mit der aktuellen Literatur, in der der CSF1R dem M2-Phänotyp zugeordnet wird (Ries *et al.* 2015, Cannarile *et al.* 2017). Eine reduzierte CSF1R-Expression konnte unter Regorafenib-Therapie jedoch nur in M0-Makrophagen festgestellt werden, in den M2-Makrophagen war diese nahezu unverändert.

Weiterführende durchflusszytometrische Analysen und Western Blot-Experimente konnten infolge der Regorafenib-Behandlung in keiner der Makrophagen-Subtypen eine signifikante Apoptose-Induktion nachweisen. Die Inhibition des CSF1-Rezeptors hat somit keinen direkten Einfluss auf eine mögliche Apoptose-Induktion der Makrophagen.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Studie von der 6. -9. Woche (Tumorentstehung) haben eine Reduktion von F4/80-positiven Zellen durch Regorafenib im gesamten azinären Pankreasgewebe gezeigt, wohingegen im Tumor die Zahl F4/80-positiver Zellen nach Regorafenib-Behandlung deutlich erhöht waren. Neben dieser Erkenntnis konnte außerdem ein höherer Anteil von CSF1R-positiven Zellen sowohl im umliegenden Gewebe als auch im Tumor unter Regorafenib-Therapie im Vergleich zur PEG-Kontrollgruppe ermittelt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Regorafenib die Infiltration von Makrophagen in den Tumor fördert und diese Makrophagen möglicherweise über die Expression des CSF1R, der als M2-assoziiert gilt, tumorfördernde Eigenschaften ausüben (Ries *et al.* 2015, Cannarile *et al.* 2017).

In den *in vitro* Untersuchungen konnte Regorafenib in den drei Makrophagen-Subtypen keine Apoptose induzieren. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Anstieg von M2-Makrophagen nicht aus einem vermehrten Absterben von M1-Makrophagen resultiert. Aufgrund der beschriebenen Plastizität von Makrophagen ist es wahrscheinlich, dass die im Tumorgewebe lokalisierten M0- und M1-Makrophagen unter dem Einfluss des Tumormikromilieus in M2-Makrophagen polarisiert werden.

Um diese Hypothesen eindeutig zu belegen, müssten jedoch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Dazu wäre es sinnvoll, das Pankreas unmittelbar nach der Regorafenib-Behandlung zu entnehmen, das exokrine und endokrine Gewebe über einen Kollagenase-Verdau zu separieren und das Gewebe hinsichtlich spezifischer M1- und M2-Makrophagenmarker wie iNOS und Arginase-1 durchflusszytometrisch zu untersuchen. Neben dieser Methode kämen außerdem Doppel- oder Mehrfachfärbungen mittels Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz in Betracht. In einer Studie von Georgoudaki *et al.* konnte die Expression des Pathogen-Recognition Rezeptors MARCO („*macrophage receptor with collagenous structure*“) auf TAMs nachgewiesen werden, nicht jedoch auf Immunzellen, wie dendritischen Zellen, M1-Makrophagen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen. Der Nachweis von MARCO<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>-Zellen im Pankreasgewebe könnte somit eine eindeutige Unterscheidung von immun-supprimierenden M2- Makrophagen, M0- und M1-Makrophagen ermöglichen (Georgoudaki *et al.*



2016). Anhand dieser Daten könnten anschließend detailliertere Aussagen über bestimmte Makrophagen-Phänotypen und deren Lokalisation im Pankreas getroffen werden.

Regorafenib wurde auf der Grundlage von klinischen Studien zur Behandlung des Kolorektalkarzinoms zugelassen. In Xenograftmodellen konnte zusätzlich ein Effekt auf Makrophagen nachgewiesen werden (Abou-Elkacem *et al.* 2013). Ein großer Unterschied zwischen dieser Studie und den hier gezeigten Ergebnissen liegt darin, dass die Infiltration von Makrophagen im Kolorektalkarzinom im Gegensatz zu den meisten anderen Tumoren mit einer positiven Prognose für die Patienten verbunden ist. Es wäre daher vorstellbar, dass der Effekt von Regorafenib auf die Makrophagen im Kolorektalkarzinom eine anti-tumorale Immunantwort induziert, wohingegen der Effekt im RIP1Tag2-Mausmodell den gegenteiligen Effekt hervorruft und das Tumorwachstum verstärkt.

Zusätzlich wurde in der Arbeit von Abou-Elkacem nur ein Xenograft-Mausmodell mit T-Zell-defizienten Mäusen verwendet. Modulierende Einflüsse anderer, insbesondere T-Zell-basierter Immunmechanismen können in solchen Modellen nicht untersucht werden.

## 5.5 Resistenzmechanismen und mögliche Kombinationstherapien

Resistenzmechanismen stellen weiterhin eines der größten und limitierenden Probleme in der Tumorthherapie dar. Zu den häufigsten Mechanismen zählen dabei die Resistenz gegenüber Apoptose und die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen sowie alternativer kompensatorischer Signalwege (Holoohan *et al.* 2013, Housman *et al.* 2014, Mansoori *et al.* 2017).

Auch die hier präsentierten Daten deuten darauf hin, dass eine oder mehrere dieser genannten Prozesse für das schlechte Ansprechen auf die Regorafenib-Therapie (mit)verantwortlich sind.

Als ein wichtiger Resistenz-vermittelnder Signalweg wird in der Literatur die JAK-STAT-Signalkaskade beschrieben, worüber extrazelluläre Signale (beispielsweise aus dem Tumorstroma) über eine transkriptionelle Antwort zur Genexpression von Bcl-2, Bcl-XL, p21 und c-Myc führen und darüber das Überleben von Tumorzellen fördern (Li 2008, Lionge und Ward 2013).

Die Western Blot-Ergebnisse zeigten hinsichtlich der Bcl-2-Expression in den humanen und murinen Zelllinien nach Regorafenib-Therapie kein eindeutiges Ergebnis. In den QGP-1-Zellen konnte eine deutliche Hochregulation von Bcl-2 gezeigt werden, welche auch mit einer Aktivierung von STAT3 verbunden war. In den BON-1 und HMEG-Zellen konnte dies nicht bestätigt werden. Da die Januskinasen nach derzeitigem Wissensstand nicht als direkte Zielstruktur von Regorafenib gelten, könnte die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs einen Zelltyp-spezifischen kompensatorischen Mechanismus unter der Behandlung von Regorafenib darstellen. Warum dies nicht in allen untersuchten Zelllinien zu beobachten war,

konnte im Rahmen der Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Mögliche Gründe könnten unterschiedliche Expressionslevel der beteiligten Kinasen im JAK-STAT-Signalweg, Unterschiede im Mutationsstatus oder auch der vorliegende Rezeptorstatus der Zelllinien sein.

Die immunhistochemischen Bcl-2-Färbungen der Studie zum Effekt auf Tumorentstehung konnten allerdings unter Regorafenib-Behandlung einen Anstieg von Bcl2-positiven Zellen im Tumor nachweisen. Das schlechte Ansprechen auf die Regorafenib-Therapie und das erhöhte Wachstum *in vivo* könnte somit durch die Hochregulation von Bcl-2 mitbedingt sein. Möglicherweise könnten hier auch Regorafenib-abhängig Signale aus dem Tumormikromilieu eine Rolle spielen.

Da während des Tumorwachstums keine erhöhte Proliferation unter Regorafenib mehr gezeigt werden konnte, war im Gegensatz zur Tumorentstehung auf das Tumorwachstum erwartungsgemäß auch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von Bcl-2-positiven Zellen in beiden Behandlungsgruppen zu erkennen. In der Spätphase der Tumorprogression scheinen Bcl-2 abhängige Mechanismen bei der Resistenzentwicklung folglich keine Rolle zu spielen.

Aufgrund der Daten zum Tumorwachstum unter Regorafenib kann geschlussfolgert werden, dass die alleinige Gabe von Regorafenib in PNETs nicht effektiv ist, und in der Frühphase der Tumorentstehung sogar auch protumorale Effekte ausüben kann. Wenn Regorafenib künftig für PNETs trotzdem eine therapeutische Option darstellen sollte, dann kann dies voraussichtlich nur im Rahmen einer Kombinationstherapie erfolgen, um Regorafenib-induzierte Resistenzmechanismen durchbrechen zu können.

Die mit diesem Ziel durchgeführten *in vitro* Untersuchungen mit dem Bcl-2-Inhibitor ABT-199 zeigten im Rahmen dieser Arbeit vielversprechende Ergebnisse. Die Kombinationsbehandlung von Regorafenib und ABT-199 konnte eine deutliche synergistische Reduktion der Viabilität und eine Apoptose-Induktion in allen untersuchten humanen und murinen Zelllinien nachweisen, unabhängig von der Regulation des Bcl-2-Expressionslevels unter Regorafenib-Therapie. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Arbeit von Tutusaus *et al.* vorgestellt. Dabei konnte ABT-263, ein Bcl-2-, Bcl-XL und Bcl-w-Inhibitor, den Effekt von Sorafenib in HepG2 Leberkarzinomzelllinien *in vitro* verstärken und über einen Caspase-abhängigen Mechanismus Apoptose induzieren. Außerdem konnte ein synergistischer Effekt von Sorafenib und ABT-263 in einem subkutanen HepG2-Mausmodell gezeigt werden (Tutusaus *et al.* 2018).

Die Western Blot-Ergebnisse haben ebenfalls eine Hochregulation von Mcl-1 unter der ABT-199-Monotherapie aufgezeigt. Da ABT-199 spezifisch Bcl-2 inhibiert, ist die Hochregulation des überlebensfördernden Proteins Mcl-1 ein oft beschriebener Resistenzmechanismus (Luedtke *et al.* 2017, Bose *et al.* 2017). Da dieser Mechanismus jedoch in diesem Ausmaß lediglich in der Monotherapie aufgetreten war, ist nicht zu erwarten, dass die Kombinationstherapie darüber negativ beeinflusst werden würde.

## 5.6 Limitationen des Mausmodells und des Studiendesigns

Die erfolgreiche Untersuchung von neuen therapeutischen Ansätzen in der präklinischen Forschung setzt die Wahl eines geeigneten Tiermodells und ein angemessen gewähltes Studiendesign voraus, das u.a. Therapiezeiträume, Medikamenten-Konzentrationen, Abbruchkriterien einschließt.

In dieser Arbeit wurde als präklinisches *in vivo* Modell das RIP1Tag2-Mausmodell gewählt, da die Tumorphysik bereits intensiv untersucht und charakterisiert wurde und die stark vaskularisierten Tumore die humane Tumorerkrankung sehr gut rekapitulieren. Dennoch weist auch dieses Mausmodell Unterschiede zum humanen Insulinom auf. RIP1Tag2-Mäuse bilden bis zu ihrem Tod selten Metastasen aus. Es werden nur bei etwa 10% der Tiere Mikrometastasen in der Leber und Lunge gefunden (Lopez und Hanahan 2002, Bill *et al.* 2015). Der Einfluss auf das sehr weit fortgeschrittene Karzinom kann somit in diesem Mausmodell nicht hinreichend untersucht werden. Durch die Zugabe von Glukose könnte die häufig auftretende und limitierende Hypoglykämie therapiert und die Lebensdauer der Tiere bis zur Ausbildung von makroskopischen Metastasen verlängert werden. In dieser Studie wurde sich jedoch gegen den Einsatz einer Glukoselösung über das Trinkwasser entschieden, da aufgrund des unterschiedlichen Trinkverhaltens der Mäuse weitere unbekannte Faktoren und stark abweichende Einflüsse auf den Metabolismus zu erwarten wären.

Ein weiterer Unterschied liegt in den genetischen Mutationen, die für die Ausbildung des Tumors verantwortlich sind. In den RIP1Tag2-Mäusen beschränken sich die Mutationen auf die Herunterregulation von p53 und Rb. In der humanen Situation handelt es sich hingegen um eine zeitlich versetzte Akkumulation verschiedener Mutationen. Das Mutationsspektrum ist zudem weitaus vielfältiger und weist neben Veränderungen in dem mTOR-Signalweg auch Abweichungen der epigenetischen Faktoren wie DAXX/ATRX auf.

Neben der Art des Mausmodells spielt ebenso die Wahl der Therapiezeiträume eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurden für die Untersuchung von Regorafenib zwei verschiedene Zeiträume gewählt, so dass sowohl der Einfluss auf die frühe Tumorentstehung und die Angiogenese als auch das spätere Tumorstadium untersucht werden kann. Durch die Erkenntnis, dass Regorafenib das Tumorstadium in der frühen Tumorentstehung unerwarteter Weise steigert, dieser Effekt jedoch in jedem der untersuchten Parameter in der späten Progressionsphase aufgehoben ist, deutet das auf deutliche Unterschiede zwischen beiden Ansätzen und Behandlungsfenstern hin.

Während der frühen Phase der Tumorentstehung sind die Prozesse der Angiogenese und dessen zugrundeliegenden Signalwege hoch reguliert. Erwartungsgemäß sollte ein anti-angiogener Kinaseinhibitor zu diesem Zeitpunkt daher einen deutlichen Einfluss auf den Tumor ausüben.

Gerade in dem Zeitraum der Angiogenese schien die Inhibition des VEGFR- und PDGFR-Signalwegs jedoch einen gegensätzlichen Effekt zu erzielen, was auf Resistenzmechanismen hindeutet. Obwohl in der Tumorentstehung deutlich tumorfördernde Effekte von Regorafenib ermittelt wurden, spielen diese Ergebnisse für die Behandlung von Patienten wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle, da die Diagnose eines PNETs meist später als in dem hier untersuchten Zeitfenster erfolgt.

Mutmaßlich relevanter für die Translation auf das humane System ist daher der Effekt auf das fortgeschrittene Tumorwachstum, da dieser vergleichbar mit der Therapie eines Patienten mit etabliertem, symptomatischem Tumor ist. In dieser Studie konnte Regorafenib allerdings ebenfalls nach 6-wöchiger Therapie keinen Effekt erzielen. Hierbei ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen, dass der Tumor zunächst auf die Therapie angesprochen hat, der Effekt aber nur transient war und nach der 6-wöchigen Behandlungsdauer nicht mehr zu erkennen war. Dazu wäre der Einsatz von Biomarkern, die Auskunft über das Ansprechen auf die Therapie geben, geeignet. Dabei erscheint die Messung des C-Peptids sinnvoll, um einen möglichen Einfluss auf die Insulinsekretion zu ermitteln. Für diese Messung im Mausmodell wird jedoch eine relativ hohe Blutmenge benötigt, sodass diese Methode nur schwer durchführbar wäre.

Ein weiteres Augenmerk sollte auf die pharmakologischen Eigenschaften des Inhibitors gerichtet werden. In diversen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Regorafenib in zwei Metabolite verstoffwechselt wird, welche die Ziel-Kinasen mit der gleichen Affinität binden und inhibieren wie die Ausgangssubstanz. Dabei stellt sich die Frage, zu welchem Anteil das Medikament das Pankreasgewebe erreicht und ob der Effekt im exokrinen und endokrinen Pankreas gleichermaßen erfolgt. Dabei müsste auch untersucht werden, ob Regorafenib aufgrund der Kollagenschicht der Insulinomkapsel schlechteren Zugang zum Insulinom hat als zum exokrinen Pankreas. Ein erster Ansatz, um dies zu klären war die Entnahme der Insulinome und dessen Behandlung mit Regorafenib *in vitro*. Da Regorafenib bei diesem Versuchsansatz die Proteinexpression von Bcl-2 erhöht hat, kann angenommen werden, dass Regorafenib in der Lage ist, die Kapsel zu passieren. Untersuchungen mit dem Einsatz von fluoreszenzmarkiertem Regorafenib oder eine intratumorale Konzentrationsmessung könnten dieser Frage detaillierter nachgehen.

Ein weiterer Punkt in der Auswertung der Ergebnisse spielt die Gruppengröße und die Zuordnung der Tiere in die einzelnen Kohorten. Der Einsatz von maximal 10 Mäusen pro Behandlungsgruppe ist für die Erstellung einer repräsentativen Aussage relativ gering, erschien jedoch für die erstmalige Untersuchung eines Medikamentes geeignet. Dennoch wäre es denkbar, dass durch den Anstieg der Gruppengröße aus einem beobachteten Trend signifikante Ergebnisse erzielt werden könnten. In dieser Arbeit wurde bei der Bildung der Kohorten auf das Alter der Tiere und ein möglichst ausgeglichenes Verhältnis der Geschlechter geachtet. Die Tumorprogression des RIP1Tag2-Mausmodells wird als homogen be-

schrieben, da die charakteristischen Veränderungen nach genau beschriebenen Prozessen und Zeitpunkten stattfinden. Während der Arbeit mit dem Mausmodell konnten hingegen auch gegenteilige Kenntnisse gewonnen werden. Dabei unterschieden sich die Mäuse desselben Alters teilweise doch sehr deutlich in ihrer Tumorlast und der damit verbundenen Hypoglykämie. Die unterschiedlichen Voraussetzungen der Tiere bei Beginn der Therapie können das teilweise unterschiedliche Ansprechen auf die Regorafenib-Therapie begründen.

In Studien mit dem KPC-Mausmodell, das das duktales Adenokarzinom des Pankreas rekapituliert, wird der Tumorstatus der Mäuse vor Versuchsbeginn mithilfe von Ultraschalluntersuchungen und Palpation ermittelt (Olive und Tuveson 2006). Damit wird gewährleistet, dass alle untersuchten Tiere einen möglichst vergleichbaren Tumorstatus aufweisen. Ein solches bildgebendes Verfahren zur Überwachung des Tumorwachstums im RIP1Tag2-Mausmodell ist bislang jedoch nicht beschrieben und wäre aufgrund der Lokalisation der multiplen Insulinome innerhalb des exokrinen Pankreas über Ultraschall nur sehr eingeschränkt bildlich darzustellen. Zusätzlich würde die mehrmalige Narkose des Tieres gerade am Ende der Experimentalperiode eine zu hohe Belastung bedeuten.

Trotz der genannten Vor- und Nachteile des RIP1Tag2-Mausmodells ist es das bisher geeignetste und am häufigsten verwendete Mausmodell zur Untersuchung von pankreatisch neuroendokrinen Tumoren. Die genannten Punkte müssen dennoch in der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Patienten berücksichtigt werden. Trotz dieser Einschränkungen bleibt auch festzustellen, dass die Heterogenität in der murinen Tumorgenese auch durchaus Parallelen zu der ausgeprägten Heterogenität der humanen Erkrankung in klinischen Studien aufweist.

## Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorgestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass sich der Einsatz von neuen Inhibitoren in der Behandlung von PNETs weiterhin als sehr schwierig darstellt. Obwohl Regorafenib durch die Inhibition diverser Signalwege eine vielversprechende Therapieoption darstellt, scheint es anhand der präklinischen *in vivo* Daten an einem genetischen PNET-Mausmodell keinen therapeutischen Mehrwert zu haben. Ebenso wird gezeigt, dass Monotherapien durch gesteigerte Resistenzmechanismen limitiert sind. Der Einsatz von Kombinationstherapien oder die zeitlich versetzte Gabe verschiedener Inhibitoren könnte einen deutlicheren therapeutischen Effekt erzielen. Die Identifizierung prädiktiver Biomarker würde die Behandlung ebenfalls deutlich vereinfachen und ein Ansprechen auf die Therapie möglichst früh voraus-sagen lassen.

Diese Ergebnisse geben Anlass zu diskutieren, in welchem Umfang Angiogenese-Inhibitoren alleine künftig einen Stellenwert in der Tumorthherapie sind oder ob Ansätze mit Kombinationstherapien sinn-voller wären.

Trotz der intensiven Untersuchung des Effekts von Regorafenib in PNETs bleiben einige Fragestellungen offen, die in weiteren Studien zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen beitragen und ebenfalls neue therapeutische Ansätze identifizieren könnten:

- Hätte sich ein Überlebensvorteil der Regorafenib-behandelten Tiere in einer Überlebensstudie ergeben?
- Wird die Invasivität der Tumore über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen erhöht?
- Welche Faktoren und Signalwege sind dafür verantwortlich?
  
- Kann die Kombinationstherapie von ABT-199 und Regorafenib zu einer Reduktion des Tumor-wachstums *in vivo* führen?
- Können dabei bestimmte Tumore identifiziert werden, die besonders gut oder schlecht auf die Therapie ansprechen, sodass die endogene Bcl-2-Expression einen prädiktiven Marker für das Ansprechen auf die Therapie darstellt?
  
- Ist die Resistenz vornehmlich durch Effekte des Tumormikromilieus vermittelt und welche Zell-typen sind hierbei beteiligt?
- Welche Mechanismen und Signalwege führen zu tumorfördernden Eigenschaften der infiltrie-renden Makrophagen?
- Tragen weitere Immunzellen wie regulatorische T-Zellen zum Tumorwachstum bei?
- Stellt die gezielte Modulation von Immunzellen eine Option für Kombinationstherapien dar?

## Zusammenfassung / Abstract

### Zusammenfassung

Pankreatische neuroendokrine Tumore (PNETs) stellen eine hypervaskularisierte Tumorentität dar, die ein hohes Ansprechen auf anti-angiogene Behandlungsstrategien mit Multityrosinkinase-Inhibitoren zeigt. Der Langzeitvorteil ist jedoch durch das schlechte Ansprechen auf die Therapien aufgrund von auftretenden Resistenzmechanismen limitiert. Ziel ist es daher, neue Therapien und dessen zugrundeliegenden molekularen Eigenschaften zu charakterisieren und optimieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Multityrosinkinase-Inhibitor Regorafenib *in vitro* einen Effekt auf die Proliferation, Proteintranslation und den Metabolismus von humanen BON-1 - und QGP-1-Zellen ausübt, ohne jedoch Apoptose zu induzieren. Im Vergleich zu Everolimus und Sunitinib, die für die Behandlung von PNETs bereits zugelassen sind, zeigte Regorafenib dabei die stärksten Effekte. Die Inhibition der Proliferation durch Regorafenib konnte darüber hinaus auch in isolierten  $\beta$ -Tumorzelllinien aus RIP1Tag2-Mäusen bestätigt werden.

Aufbauend auf den *in vitro* Untersuchungen wurde der Effekt von Regorafenib auf die Tumorentstehung und das Tumorwachstum im RIP1Tag2-Mausmodell untersucht, das die Beta-Zell-Karzinogenese rekapituliert. Anhand von immunhistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass Regorafenib bei der Tumorentstehung unerwarteter Weise zu einer gesteigerten Proliferation und einer erhöhten Anzahl von Blutgefäßen im Tumor führte. Hingegen konnte während des Tumorwachstums lediglich ein geringer Effekt auf die Proliferation und die Vaskularisierung ermittelt werden.

Das schlechte Ansprechen konnte auf eine erhöhte Expression der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine zurückgeführt werden, die in beiden Therapiestudien unter der Behandlung von Regorafenib erhöht waren. Eine anschließende Kombinationstherapie mit Regorafenib und dem Bcl-2-Inhibitor ABT-199 führte zu einer synergistischen Apoptoseinduktion in BON-1-, QGP-1- und den murinen  $\beta$ -Tumorzellen, sodass diese Kombinationstherapie einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung von PNETs *in vivo* darstellen könnte.

Eine weitere Erkenntnis war, dass Regorafenib in beiden Therapiestudien neben einer gesteigerten Proliferation zu einem deutlichen Anstieg von invasiven Insulinomen geführt hat. Diese gesteigerte Invasivität war assoziiert mit einem deutlichen Anstieg von Cathepsin B, belegt anhand von qRT-PCR-Analysen und immunhistochemischen Färbungen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Regorafenib-Therapie in der Tumorentstehung zu einem Anstieg von F4/80-positiven und CSF1R-positiven Zellen im Tumor führte und somit ein tumorförderndes Mikromilieu zu induzieren schien. In der Studie hinsichtlich des Effekts auf

das Tumorwachstum war dieser Effekt hingegen jedoch nicht signifikant. In beiden durchgeführten Studien konnte jedoch anhand von qRT-PCR-Analysen ein immunsupprimierendes Tumormikromilieu unter der Regorafenib-Therapie nachgewiesen werden, welches sich insbesondere durch den Anstieg von FOXP3<sup>+</sup>-Zellen, Granzyme B und CD69 zeigt und möglicherweise zur Resistenzentwicklung beiträgt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Regorafenib *in vitro* deutliche Effekte auf das Tumorwachstum ausübt. Dennoch hat Regorafenib, als eine anti-angiogene Monotherapie, nur transiente Effekte und scheint die Invasivität der Tumore *in vivo* sogar zu steigern. Diese wird wahrscheinlich durch Tumorzell-immanente oder Tumorstroma-vermittelte Resistenzmechanismen vermittelt. Die Ergebnisse verdeutlichen erneut die Bedeutung des Tumormikromilieus in der Krebstherapie und dass eine effiziente Behandlung der neuroendokrinen Pankreastumore voraussichtlich nur durch gezielte Kombinations-Therapien erreicht werden kann.

## Abstract

Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs) represent a distinct hypervascular tumor entity with marked response rates to treatment strategies using antiangiogenic multikinase inhibitors. However, acquired resistance frequently develops and limits the long-term benefit of antiangiogenic approaches. Therefore, new therapies and their underlying mechanisms have to be characterized and optimized.

In this study, the Multityrosinkinase-inhibitor Regorafenib showed a clear effect on proliferation, protein translation and metabolism of the human BON-1- and QGP-1-cell lines *in vitro*, but without induction of apoptosis.

In comparison to Everolimus and Sunitinib, which have been already approved for the treatment of PNET-patients, Regorafenib showed the strongest effects *in vitro*. The antiproliferative effects of Regorafenib were subsequently confirmed in  $\beta$ -tumor cell lines isolated from RIP1Tag2-mice.

Based on these *in vitro* data the effect of Regorafenib was evaluated on tumor development (week 6-9) and tumor growth (week 9-15) in the RIP1Tag2-mouse model, which recapitulates pancreatic beta-cell carcinogenesis. Immunohistochemical stainings with Ki-67- and CD31 unexpectedly showed an increase in proliferation and blood vessel formation within the tumor area due to Regorafenib treatment in during tumor development. In contrast, during tumor progression, Regorafenib had only weak effects on proliferation and blood vessels.

The lack of response to Regorafenib can be explained by several potential resistance mechanisms: First, an increased expression of the pro-survival Bcl-2-proteins after Regorafenib treatment was observed in



both trials - prevention and therapy. In line with these findings, a combination therapy using Regorafenib and the selective Bcl-2-inhibitor ABT-199 synergistically induced apoptosis in BON-1, QGP-1 - and insulinoma cell lines which could represent a promising treatment strategy for PNETs *in vivo*.

A second potential resistance mechanism was the significant increase of invasive insulinomas following Regorafenib treatment which was observed in both therapeutic trials. This increased invasiveness was associated with an increase in cathepsin B as evidenced by qRT-PCR analyses and immunohistochemical staining.

In line with these findings, it could also be shown that regorafenib treatment led to an increase of F4 / 80-positive and CSF1R-positive cells in the tumor area, thus inducing a tumor-promoting microenvironment. Nevertheless, this effect was not prevalent any more during the later invention trial. In both studies, however, an immunosuppressive tumor microenvironment comprising several cell immune populations was detected under regorafenib therapy, which is mainly due to the increase in FOXP3<sup>+</sup> cells, Granzyme B and CD69 positive cells.

In summary, these data show that Regorafenib exerts marked effects on tumor growth *in vitro*. However, Regorafenib as an anti-angiogenic monotherapy, has only transient effects and appears to even increase the invasiveness of the tumors *in vivo*, possibly due to several tumor-inherent or stroma-related resistance mechanisms. These results highlight the importance of the tumormicroenvironment in cancer therapy and suggest that future therapies of pancreatic neuroendocrine tumors may be achieved by combination therapy approaches.

## Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K.**, Lichtman, A.H.H, Pillai, S. (2011): Cellular and Molecular Immunology. 7th Edition. *Elsevier Health Sciences*
- Abou-Elkacem, L.**, Arns, S., Brix, G., Gremse, F. Zopf, D., Kiessling, F., Lederle, W. (2013): Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model. *Molecular cancer therapeutics* 12 (7), S. 1322–1331.
- Abraham, D.**, Zins, K., Sioud, M., Lucas, T., Schäfer, R., Stanley, ER, Aharinejad, Seyedhossein (2010): Stromal cell-derived CSF-1 blockade prolongs xenograft survival of CSF-1-negative neuroblastoma. *International journal of cancer* 126 (6), S. 1339–1352.
- Abrams, T.J.**, Murray, L.J., Pesenti, E., Holway, V.W., Colombo, T., Lee, L.B., Cherrington, J.M., Pryer, N.K. (2003): Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with "standard of care" therapeutic agents for the treatment of breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2(10):1011-21.
- Arumugam, T.**, Ramachandran, V., Fournier, K.F., Wang, H., Marquid, L., Abbruzzese J.L. et al. (2009): Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.*;69(14):5820-8.
- Atkins, M.B.**, Yasothan, U., Kirkpatrick, P. (2009): Everolimus. *Nat Rev Drug Discov.* 8(7):535-6.
- Avniel-Polak, S.**, Leibowitz, G., Riahi, Y., Glaser, B., Gross, David J., Grozinsky-Glasberg, S. (2016): Abrogation of Autophagy by Chloroquine Alone or in Combination with mTOR Inhibitors Induces Apoptosis in Neuroendocrine Tumor Cells. *Neuroendocrinology* 103 (6), S. 724–737.
- Babu, V.**, Paul, N., Yu, R. (2013): Animal models and cell lines of pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas* 42 (6), S. 912–923.
- Balkwill, F. R.**, Capasso, M., Hagemann, Thorsten (2012): The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science* 125 (Pt 23), S. 5591–5596.
- Becher, O.J.** and Holland, E.C. (2006): Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer research* 66 (7), 3355-8, discussion 3358-9.
- Bell-McGuinn, K.M.**, Garfall, A.L., Bogoyo, M., Hanahan, D., Joyce, J.A. (2007): Inhibition of cysteine cathepsin protease activity enhances chemotherapy regimens by decreasing tumor growth and invasiveness in a mouse model of multistage cancer. *Cancer research* 67 (15), S. 7378–7385.
- Bergers, G.**, Javaherian, K., Lo, KM., Folkman J., Hanahan D. (1999): Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science.* 284(5415):808-12.
- Bergers, G.** und Song, S. (2005): The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.*; 7(4):452-64. Review.
- Bergers, G.** und Hanahan, D. (2008): Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature reviews Cancer* 8 (8), S. 592–603.
- Beyer, M.**, Schultze, J.L. (2006): Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108 (3), S. 804–811.

- Bill, R.,** Fagiani, E., Zumsteg, A., Antoniadis, H., Johansson, D., Haefliger, S. et al. (2015): Nintedanib Is a Highly Effective Therapeutic for Neuroendocrine Carcinoma of the Pancreas (PNET) in the RIP1Tag2 Transgenic Mouse Model. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (21), S. 4856–4867.
- Biswas, S.K.,** Mantovani, A. (2010): Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* volume 11, pages 889–896
- Boichuk, S.,** Rausch, J., Duensing, A. (2013): New developments in management of gastrointestinal stromal tumors: regorafenib, the new player in the team. *Dovepress* Volume 2014:4 Pages 1–10
- Bose, P.,** Gandhi, V., Konopleva, M. (2017): Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. *Leukemia & lymphoma* 58 (9), S. 1–17.
- Buchbinder, E.I.,** Desai, A. (2016): CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American journal of clinical oncology* 39 (1), S. 98–106.
- Cannarile, M. A.,** Weisser, M., Jacob, W., Jegg, AM, Ries, C.H., Rüttinger, D. (2017): Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *Journal for immunotherapy of cancer* 5 (1), S. 53.
- Capdevila, J.,** Tabernero, J. (2011): A shining light in the darkness for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer discovery* 1 (3), S. 213–221.
- Casanovas, O.,** Hicklin, D. J., Bergers, G., Hanahan, D. (2005): Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8 (4), S. 299–309.
- Cavnar, M.J.,** Turcotte, S., Katz, S. C., Kuk, D., Gönen, M., Shia, J. et al. (2017): Tumor-Associated Macrophage Infiltration in Colorectal Cancer Liver Metastases is Associated With Better Outcome. *Annals of surgical oncology* 24 (7), S. 1835–1842.
- Chen, M.,** van Ness, M., Guo, Y., Gregg, J. (2012): Molecular pathology of pancreatic neuroendocrine tumors. *Journal of gastrointestinal oncology* 3 (3), S. 182–188.
- Childs, A.,** Kirkwood, A., Edeline, J., Luong, T.V., Watkins, J., Lamarca, A. et al. (2016): Ki-67 index and response to chemotherapy in patients with neuroendocrine tumours. *Endocrine-related cancer* 23 (7), S. 563–570.
- Christiansen, A.,** Detmar, M. (2011): Lymphangiogenesis and cancer. *Genes & cancer* 2 (12), S. 1146–1158.
- Couvelard, A.,** O'Toole, D., Turle, H., Leek, R., Sauvanet, A., Degott, C. et al. (2005): Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *Br J Cancer.*;92(1):94-101.
- Delbaldo, C.,** Faivre, S., Dreyer, C., Raymond, E. (2012): Sunitinib in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 4 (1), S. 9–18.
- DeVorkin, L.,** Hattersley, M., Kim, P., Ries, J., Spowart, J., Anglesio, M.S. et al. (2017): Autophagy Inhibition Enhances Sunitinib Efficacy in Clear Cell Ovarian Carcinoma. *Molecular cancer research: MCR* 15 (3), S. 250–258.
- Di Domenico, A.,** Wiedmer, T., Marinoni, I., Perren, A. (2017): Genetic and epigenetic drivers of neuroendocrine tumours (NET). *Endocr Relat Cancer.*24 (9): R315-R334

- Du, Y.C.**, Nancy, L., Brian C., Hanahan, D., Varmus, H. (2007): Assessing tumor progression factors by somatic gene transfer into a mouse model: Bcl-xL promotes islet tumor cell invasion. *PLoS biology* 5 (10), e276.
- Dufies, M.**, Giuliano, S., Ambrosetti, D., Claren, A., Ndiaye, P.D., Mastri, M. (2017): Sunitinib Stimulates Expression of VEGFC by Tumor Cells and Promotes Lymphangiogenesis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Res.*; 77(5):1212-1226.
- Ebos, J. M. L.**, Lee, C.R., Christensen, J.G., Mutsaers, A.J., Kerbel, R.S. (2007): Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (43), S. 17069–17074.
- Efrat, S.**, Linde, S., Kofod, H., Spector, D., Delannoy, M., Grant, S. et al. (1988): Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (23), S. 9037–9041.
- Falconi, M.**, Eriksson, B., Kaltsas, G., Bartsch, D. K., Capdevila, J., Caplin, M. et al. (2016): ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology* 103 (2), S. 153–171.
- Fernando, N.T.**, Koch, M., Rothrock, C., Gollogly, L.K, D'Amore, P.A., Ryeom, S., Yoon, S.S. (2008): Tumor escape from endogenous, extracellular matrix-associated angiogenesis inhibitors by up-regulation of multiple proangiogenic factors. *Clin Cancer Res.*;14(5):1529-39.
- Fitzmaurice, C.**, Akinyemiju, T.F., Lami, F.H., Alam, T., Alizadeh-Navaei, R., Allen, C. (2018): Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 1;4(11):1553-1568
- Flammiger, A.**, Weisbach, L., Huland, H., Tennstedt, P., Simon, R., Minner, S. et al. (2013): High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 49 (6), S. 1273–1279.
- Folkman, J.**, Watson, K., Ingber, D. et al. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature.* 339(6219):58-61.
- Franko, J.**, Feng, W., Yip, L., Genovese, E., Moser, A.J. (2010): Non-functional neuroendocrine carcinoma of the pancreas: incidence, tumor biology, and outcomes in 2,158 patients. *J Gastrointest Surg.* 14(3):541-8.
- Gandhi, L.**, Camidge, D.R., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D. et al. (2011): Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (7), S. 909–916.
- Gazzaniga, S.**, Bravo, A.I., Guglielmotti, A., van Rooijen, N., Maschi, F., Vecchi, A. et al. (2007): Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *The Journal of investigative dermatology* 127 (8), S. 2031–2041.

- Georgoudaki, A.M.**, Prokopec, K.E., Boura, V.F., Hellqvist, E., Sohn, S., Östling, J., Dahan, R. (2016): Re-programming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis. *Cell Rep.*;15(9):2000-11.
- Giuliano, S.**, Cormerais, Y., Dufies, M., Grépin, R., Colosetti, P., Belaid, A. et al. (2015): Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux. *Autophagy* 11 (10), S. 1891–1904.
- Giuliano, S.**, Pagès, G. (2013): Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. *Biochemie.*; 95(6):1110-9.
- Giraud, E.**, Inoue, M., Hanahan, D. (2004): An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest.*;114(5):623-33.
- Gocheva, V.**, Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C. et al. (2006): Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes & development* 20 (5), S. 543–556.
- Goel, G.** (2018): Evolution of regorafenib from bench to bedside in colorectal cancer: Is it an attractive option or merely a "me too" drug? *Cancer management and research* 10, S. 425–437.
- Gordon, S.** (2003): Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology* 3 (1), S. 23–35.
- Gordon, S.**, Martinez, F. O. (2010): Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32 (5), S. 593–604.
- Gordon, S.R.**, Maute, R.L., Dulken, B.W., Hutter, G., George, B.M., McCracken, M.N. et al. (2017): PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 545 (7655), S. 495–499.
- Griesmann, H.**, Drexel, C., Milosevic, N., Sipos, B., Rosendahl, J., Gress, T.M., Michl, P. (2017): Pharmacological macrophage inhibition decreases metastasis formation in a genetic model of pancreatic cancer. *Gut* 66 (7), S. 1278–1285.
- Grothey, A.**, van Cutsem, E., Sobrero, A., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M. et al. (2013): Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 381 (9863), S. 303–312.
- Halfdanarson, T. R.**, Rabe, K. G., Rubin, J., Petersen, G.M. (2008): Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 19 (10), S. 1727–1733.
- Hanahan, D.** (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*, 315(6015):115-22.
- Hanahan, D.**, Coussens, L.M. (2012): Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21 (3), S. 309–322.
- Hanahan, D.**, Weinberg, R. A. (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100 (1), S. 57–70.
- Holohan, C.**, van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., Johnston, P.G. (2013): Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews. Cancer* 13 (10), S. 714–726.
- Housman, G.**, Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S. (2014): Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers* 6 (3), S. 1769–1792.

- Hsu, F.T.**, Sun, C.C., Wu, C.H., Lee, Y.J., Chiang, C.H., Wang, W.S. (2017): Regorafenib Induces Apoptosis and Inhibits Metastatic Potential of Human Bladder Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 37(9):4919-4926.
- Inoue, M.**, Hager, J.H., Ferrara, N., Gerber, H.P., Hanahan, D. (2002): VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic  $\beta$  cell carcinogenesis. *Cancer Cell* 1 (2), S. 193–202.
- Jang, J.E.**, Hajdu, C.H., Liot, C., Miller, G., Dustin, M.L., Bar-Sagi, D.(2017): Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-tumor Immunity in Pancreatic Cancer. *Cell reports* 20 (3), S. 558–571.
- Jiao, Y.**, Shi, C., Edil, B. H., de Wilde, R.F., Klimstra, D.S., Maitra, A. et al. (2011): DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* (New York, N.Y.) 331 (6021), S. 1199–1203.
- Joe, A.K.**, Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D., Weinstein, I.B. (2002): Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.*8(3):893-903.
- Jones, S.**, Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P. et al. (2008): Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* (New York, N.Y.) 321 (5897), S. 1801–1806.
- Kajita, M.**, McClinic, K.N., Wade, P.A. (2004): Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol.*; 24(17):7559-66.
- Kaku, M.**, Nishiyama, T., Yagawa, K., Abe, M. (1980): Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. *Gan.* 71(5):596-601
- Keir, M.E.**, Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H. (2008): PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 26:677-704
- Kim, J.Y.**, Hong S.M., Ro, J.Y. (2017): Recent updates on grading and classification of neuroendocrine tumors. *Ann Diagn Pathol.* 29:11-16.
- Kirkin, V.**, Joos, S., Zörnig, M. (2004): The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1644(2-3):229-49.
- Kissel, M.**, Berndt, S., Fiebig, L., Kling, S., Ji, Q., Gu, Q. et al. (2017): Antitumor effects of regorafenib and sorafenib in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 8 (63), S. 107096–107108.
- Klöppel, G.**, Anlauf M. (2005): Epidemiology, tumour biology and histopathological classification of neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 19(4):507-17.
- Klöppel, G.** (2011): Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer.* 18 Suppl 1:S1-16.
- Klöppel, G.** (2017): Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications. *Visc Med.* 33(5):324-330.
- Klöppel, G.** (2019): Neuroendocrine neoplasms: Two families with distinct features unified in one classification (German version). *Der Pathologe.* Springer Medizin Verlag GmbH. 2019 Apr 10.
- Kopfstein, L.**, Veikkola, T., Djonov, V. G., Baeriswyl, V., Schomber, Ti., Strittmatter, K. et al. (2007): Distinct roles of vascular endothelial growth factor-D in lymphangiogenesis and metastasis. *The American journal of pathology* 170 (4), S. 1348–1361.

- Kruljac, I.,** Pape, U.F. (2017): The classification of neuroendocrine neoplasms: "Neuroendocrine carcinomas" revisited – a 2017 update and future perspectives. *Endocr Oncol Metab* 2017; Volume 3, Issue 2.
- Kuester, D.,** Lippert, H., Roessner, A., Krueger, S. (2008): The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathology, research and practice* 204 (7), S. 491–500.
- Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.
- Land, S.C.** und Tee, A. R. (2007): Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *The Journal of biological chemistry* 282 (28), S. 20534–20543.
- Lawrence, B.,** Gustafsson, B.I., Chan, A., Svejda, B., Kidd, M, Modlin, I.M.(2011): The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 40(1):1-18, vii.
- Leber, B.,** Lin, J., Andrews, D.W. (2007): Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 12 (5), S. 897–911.
- Lewis, C.E.** und Pollard, J.W. (2006): Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 66(2):605-12.
- Li, G.,** Satyamoorthy, K., Herlyn, M. (2001): N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.*;61(9):3819-25.
- Li, W.X.** (2008): Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends in cell biology* 18 (11), S. 545–551.
- Liu, E.,** Marincola, P., Oberg, K. (2013): Everolimus in the treatment of patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumors: latest findings and interpretations. *Therapeutic advances in gastroenterology* 6 (5), S. 412–419.
- Lochmann, T. L.,** Floros, K. V., Naseri, M., Powell, K.M., Cook, W., March, R. J. et al. (2018): Venetoclax Is Effective in Small-Cell Lung Cancers with High BCL-2 Expression. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 24 (2), S. 360–369.
- Luedtke, D.A.,** Niu, X., Pan, Y., Zhao, J., Liu, S., Edwards, H. et al. (2017): Inhibition of Mcl-1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells. *Signal transduction and targeted therapy* 2, S. 17012.
- Mansoori, B.,** Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., Baradaran, B. (2017): The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced pharmaceutical bulletin* 7 (3), S. 339–348.
- Mantovani, A.,** Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., Allavena, P. (2017): Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature reviews. Clinical oncology* 14 (7), S. 399–416.
- Marinoni, I.,** Schmitt Kurrer, A., Vassella, E., Dettmer, Rudolph, T., Banz, V. et al. (2014): Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology* 146 (2), 453-60.e5.

- Maxwell, J.E.**, Sherman, S.K., Howe, J.R. (2016): Translational Diagnostics and Therapeutics in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 22 (20), S. 5022–5029.
- McKenna, L.R.** und Edil, B.H. (2014): Update on pancreatic neuroendocrine tumors. *Gland surgery* 3 (4), S. 258–275.
- Mendel, D.B.** , Laird, A.D., Xin, X., Louie, S.G., Christensen, J.G., Li, G. et al. (2003): In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* 9(1):327-37.
- Missiaglia, E.**, Dalai, I., Barbi, S., Beghelli, S., Falconi, M.o, Della Peruta, M. et al. (2010): Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (2), S. 245–255.
- National cancer institute** (2018): Angiogenesis Inhibitors  
[www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet](http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet)
- Nicholls, D.G.**, Darley-Usmar, V.M., Wu, M., Jensen, P.B, Rogers, G.W., Ferrick, D. A. (2010): Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *Journal of visualized experiments: JoVE* (46).
- Noy, R.**, Pollard, W. (2014). Tumor- associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, 41(1):49-61.
- Olive, K.P.**, Tuveson, D.A: (2006): The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 12(18):5277-87.
- Otrock, Z.K.**, Hatoum, H.A., Musallam, K.M., Awada, A.H., Shamseddine, A.I. (2011): Is VEGF a predictive biomarker to anti-angiogenic therapy? *Critical reviews in oncology/hematology* 79 (2), S. 103–111.
- Paech, F.**, Mingard, C., Grünig, D., Abegg, V.F., Bouitbir, J., Krähenbühl, S. (2018): Mechanisms of mitochondrial toxicity of the kinase inhibitors ponatinib, regorafenib and sorafenib in human hepatic HepG2 cells. *Toxicology* 395, S. 34–44.
- Paquette, M.**, El-Houjeiri, L., Pause, A. (2018): mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers* (Basel). 10(1): 18.
- Parekh, D.**, Ishizuka, J., Townsend, C.M. Jr, Haber, B., Beauchamp, R.D., Karp, G. et al. (1994): Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas.* 9(1):83-90.
- Pavel, M.** (2018): Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes– was gibt es Neues?  
[www.gi-oncology.de/download/2008/Abstracts/2-02a\\_Pavel.pdf](http://www.gi-oncology.de/download/2008/Abstracts/2-02a_Pavel.pdf)
- Perl, A.K.**, Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., Christofori, G. (1998): A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 392(6672):190-3.
- Phan, A.T.**, Dave, B. (2016): The pivotal role of mammalian target of rapamycin inhibition in the treatment of patients with neuroendocrine tumors. *Cancer medicine* 5 (10), S. 2953–2964.
- Pietras, K.** und Hanahan, D. (2005): A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose "chemo-switch" regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (5), S. 939–952.



- Pollard, J.W.** (2009): Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(4):259-70.
- Pyonteck, S. M.,** Gadea, B. B., Wang, H-W, Gocheva, V., Hunter, K. E., Tang, L. H., Joyce, J. A. (2012): Deficiency of the macrophage growth factor CSF-1 disrupts pancreatic neuroendocrine tumor development. *Oncogene* 31 (11), S. 1459–1467.
- Quatromoni, J.G.** und Eruslanov, E. (2012): Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res.* 4(4):376-389
- Raymond E.,** Dahan, L., Raoul, J.L., Bang, Y.J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C. et al. (2011): Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med.*;364(6):501-13.
- Raymond, E.,** Hammel, P., Dreyer, C., Maatescu, C., Hentic, O., Ruszniewski, P., Faivre, S. (2012): Sunitinib in pancreatic neuroendocrine tumors. *Targ Oncol* 7 (2), S. 117–125.
- Rawlings, J.S.,** Rosler, K.M., Harrison, D. A. (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science* 117 (Pt 8), S. 1281–1283.
- Richmond, A.** und Su, Y. (2008): Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech.* 1(2-3):78-82.
- Ries, C.H.,** Hoves, S., Cannarile, M.A., Rüttinger, D. (2015): CSF-1/CSF-1R targeting agents in clinical development for cancer therapy. *Current opinion in pharmacology* 23, S. 45–51.
- Rindi G.** und Kloppel G. (2004). Endocrine tumors of the gut and pancreas tumor biology and classification. *Neuroendocrinology*, 80 Suppl 1:12-5.
- Scarpa, A.,** Chang, D.K., Nones, K., Corbo, V., Patch, A.M., Bailey, P. et al. (2017): Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature* 543 (7643), S. 65–71.
- Scherübl, H.,** Jensen, R.T., Cadiot, G., Stölzel, U., Klöppel, G. (2011): Management of early gastrointestinal neuroendocrine neoplasms. *World journal of gastrointestinal endoscopy* 3 (7), S. 133–139.
- Scherübl, H.,** Streller, B., Stabenow, R., Herbst, H., Höpfner, M., Schwertner, C. et al. (2013): Clinically detected gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors are on the rise: epidemiological changes in Germany. *World journal of gastroenterology* 19 (47), S. 9012–9019.
- Schmieder, R.,** Hoffmann, J., Becker, M., Bhargava, A., Müller, T., Kahmann, N. et al. (2014): Regorafenib (BAY 73-4506): antitumor and antimetastatic activities in preclinical models of colorectal cancer. *International journal of cancer* 135 (6), S. 1487–1496.
- Shchors, K.,** Nozawa, H., Xu, J., Rostker, F., Swigart-Brown, L., Evan G., Hanahan D. (2013): Increased invasiveness of MMP-9-deficient tumors in two mouse models of neuroendocrine tumorigenesis. *Oncogene.* 32(4):502-13.
- Sillanpaa, S.,** Anttila, M., Voutilainen, K., Ropponen, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Puistola U. et al. (2007): Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 296 -- 303.
- Skelin, M.,** Rupnik, M., Cencic, A. (2010): Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX.* 27(2):105-13.
- Soderquist, R.,** Eastman, A. (2016): BCL2 Inhibitors as Anticancer Drugs: A Plethora of Misleading BH3 Mimetics. *Molecular cancer therapeutics* 15 (9), S. 2011–2017.

- Sorbye, H.**, Welin, S., Langer, S. W., Vestermark, L. W., Holt, N., Osterlund, P. et al. (2013): Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 24 (1), S. 152–160.
- Souers, A.J.**, Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J. et al. (2013): ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine* 19 (2), S. 202–208.
- Tai, W.T.** Chu, P.Y., Shiau, C.W., Chen, Y.L., Li, Y.S., Hung, M.H. et al. (2014): STAT3 mediates regorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (22), S. 5768–5776.
- Takeuchi, Y.** und Nishikawa, H. (2016): Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *International immunology* 28 (8), S. 401–409.
- Trapé, A. P.**, Liu, S., Cortes, A.C., Ueno, N.T., Gonzalez-Angulo, A.M. (2016): Effects of CDK4/6 Inhibition in Hormone Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Breast Cancer Cells with Acquired Resistance to Paclitaxel. *Journal of Cancer* 7 (8), S. 947–956.
- Tsai, J.J.**, Pan, P.J., Hsu, F.T. (2017): Regorafenib induces extrinsic and intrinsic apoptosis through inhibition of ERK/NF- $\kappa$ B activation in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 37(2):1036-1044.
- Tse, C.**, Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S. (2008): ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 68(9):3421-8
- Tutusaus, A.**, Stefanovic, M., Boix, L., Cucarull, B., Zamora, A., Blasco, L. et al. (2018): Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 9 (24), S. 16701–16717.
- Vaillant, F.**, François, M., Delphine, L., Lily, B., Kelsey, P., Bhupinder, R., M.E. et al. (2013): Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer cell* 24 (1), S. 120–129.
- van Delft, M.F.**, Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P. E. et al. (2006): The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer cell* 10 (5), S. 389–399.
- Vandenberg, C.J.**, Cory, S. (2013): ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood* 121 (12), S. 2285–2288.
- Vasiljeva, O.**, Papazoglou, A., Krüger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J. et al. (2006): Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer research* 66 (10), S. 5242–5250.
- Wheelock, M.J.**, Shintani, Y., Maeda, M., Fukumotot, Y., Johnson, K.R. (2008): Cadherin switching. Commentary. *J Cell Sci* 2008 121: 727-735.
- Weinberg, R.A.** (2013). *The Biology of Cancer*. Second Edition. Abingdon: Garland Science.
- Wiedmer, T.**, Blank, A., Pantasis, S., Normand, L., Bill, R., Krebs, P. et al. (2017): Autophagy Inhibition Improves Sunitinib Efficacy in Pancreatic Neuroendocrine Tumors via a Lysosome-dependent Mechanism. *Molecular cancer therapeutics* 16 (11), S. 2502–2515.

- Wilhelm, S.M.**, Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C.A., Schütz, G. et al. (2011): Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International journal of cancer* 129 (1), S. 245–255.
- Wu, P.**, Nielsen, T.E., Clausen, M.H. (2015): FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences* 36 (7), S. 422–439.
- Yachida, S.**, Vakiani, E., White, C. M., Zhong, Y., Saunders, T.Morgan, R. et al. (2012): Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *The American journal of surgical pathology* 36 (2), S. 173–184.
- Yao, J.C.**, Eisner, M.P., Leary, C., Dagohoy, C., Phan, A., Rashid, A. et al. (2007): Population-based study of islet cell carcinoma. *Annals of surgical oncology* 14 (12), S. 3492–3500.
- Yao, J.C.**, Phan, A.T., Chang, D. Z., Wolff, R. A., Hess, K., Gupta, S. et al. (2008): Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- to intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of a phase II study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (26), S. 4311–4318.
- Yao, J.C.**, Shah, M.H., Ito, T., Bohas, C.L., Wolin, E.M., van Cutsem, E. et al. (2011): Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *The New England journal of medicine* 364 (6), S. 514–523.
- Yamauchi, M.**, Yoshino, I., Yamaguchi, R., Shimamura, T., Nagasaki, M., Imoto, S. et al. (2011): N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am J Cancer Res.* 2011;1(7):823-33.
- Youle, R.J.**, Strasser A. (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(1):47-59.
- Yu, R.** (2016): Animal models of spontaneous pancreatic neuroendocrine tumors. *Molecular and cellular endocrinology.* 421, S. 60–67.
- Zhang, J.**, Jia, Z.g, Li, Q., Wang, L., Rashid, A., Zhu, Z. et al. (2007): Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer.* 109 (8), S. 1478–1486.
- Zhang, J.**, Jia, Z., Li, Q., Wang, L., Rashid, A., Zhu, Z. (2007): Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer.* 109(8):1478-86
- Zhang, J.**, Salminen, A., Yang, X., Luo, Y., Wu, Q., White, M. et al. (2016): Effects of 31 FDA approved small-molecule kinase inhibitors on isolated rat liver mitochondria. *Archives of toxicology.* 91 (8), S. 2921–2938.
- Zhang, Q.**, Zeng, L., Chen, Y., Lian, G., Qian, C.n, Chen, S. et al. (2016): Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Gastroenterology research and practice.* S. 8962321.
- Zhao, X.**, Qu, J., Sun, Y., Wang, J., Liu, X., Wang, F. et al. (2017): Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget.* 8(18):30576-30586.

- Zhou, Q.**, Peng, R.Q., Wu, X.J., Xia, Q., Hou, J.H., Ding, Y. et al. (2010): The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *Journal of translational medicine* 8, S. 13.
- Zhu, Y.**, Herndon, J.M., Sojka, D.K., Kim, K.W., Knolhoff, B. L., Zuo, C. et al. (2017): Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity* 47 (2), 323-338.e6.
- Zopf, D.**, Fichtner, I., Bhargava, A., Steinke, W., Thierauch, K.H., Diefenbach, K. et al. (2016): Pharmacologic activity and pharmacokinetics of metabolites of regorafenib in preclinical models. *Cancer medicine* 5 (11), S. 3176–3185.

## Anhang

## Ergänzende Ergebnisse 1

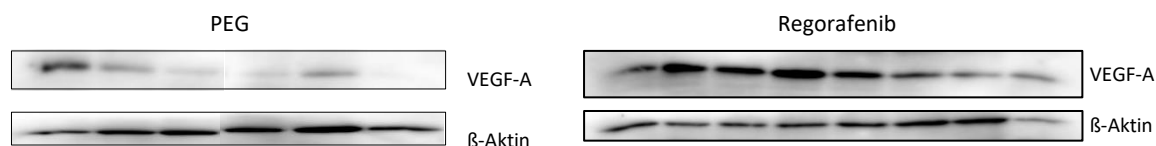


Abbildung 74: Western Blot Experiment für die densitometrische Auswertung von VEGF-A im Pankreasgewebe von PEG – und Regorafenib-behandelten RIP1Tag2-Mäusen der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle.

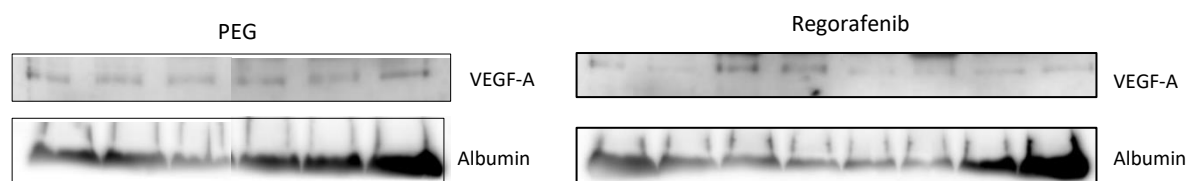


Abbildung 75: Western Blot Experiment für die densitometrische Auswertung von VEGF-A im Serum von PEG – und Regorafenib-behandelten RIP1Tag2-Mäusen der Studie zur Intervention der Tumorentstehung. Albumin diene als Ladekontrolle.

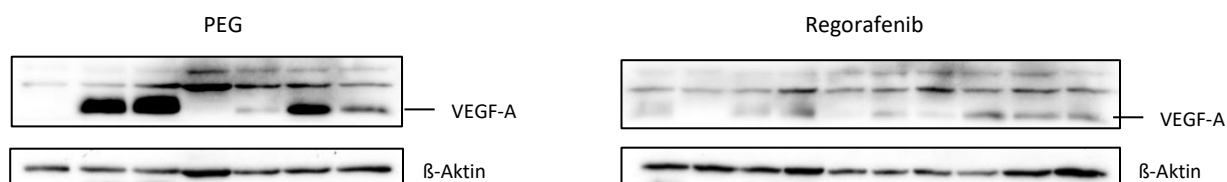


Abbildung 76: Western Blot Experiment für die densitometrische Auswertung von VEGF-A im Pankreasgewebe von PEG – und Regorafenib-behandelten RIP1Tag2-Mäusen der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle.

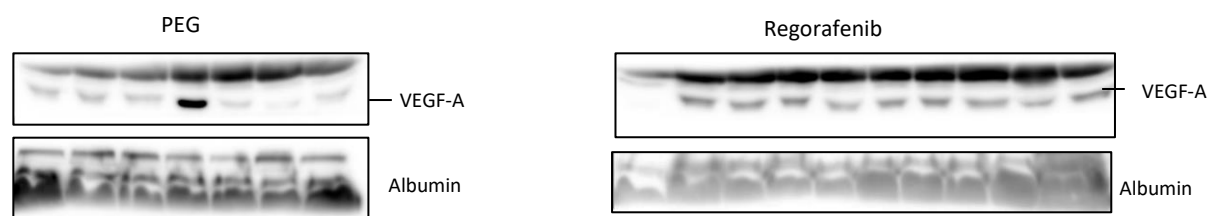


Abbildung 77: Western Blot Experiment für die densitometrische Auswertung von VEGF-A im Serum von PEG – und Regorafenib-behandelten RIP1Tag2-Mäusen der Studie zur Intervention des Tumorwachstums. Albumin diene als Ladekontrolle.

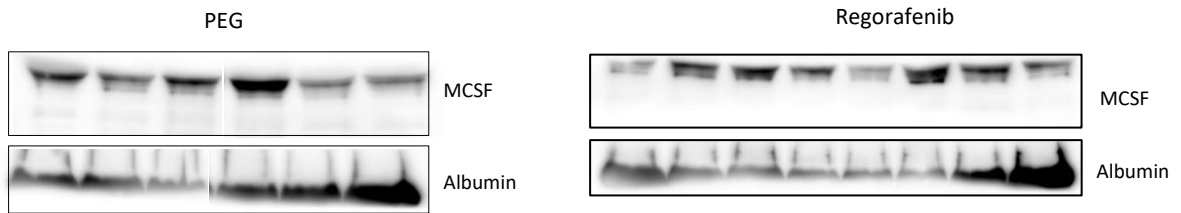


Abbildung 78: Western Blot Experiment für die densitometrische Auswertung von MCSF im Serum von PEG – und Regorafenib-behandelten RIP1Tag2-Mäusen der Studie zur Intervention der Tumorentstehung. Albumin diente als Ladekontrolle.



Abbildung 79: Western Blot Experiment für die densitometrische Auswertung von MCSF im Serum von PEG – und Regorafenib-behandelten RIP1Tag2-Mäusen der Studie zur Intervention des Tumorwachstums. Albumin diente als Ladekontrolle.

## Ergänzende Ergebnisse 2

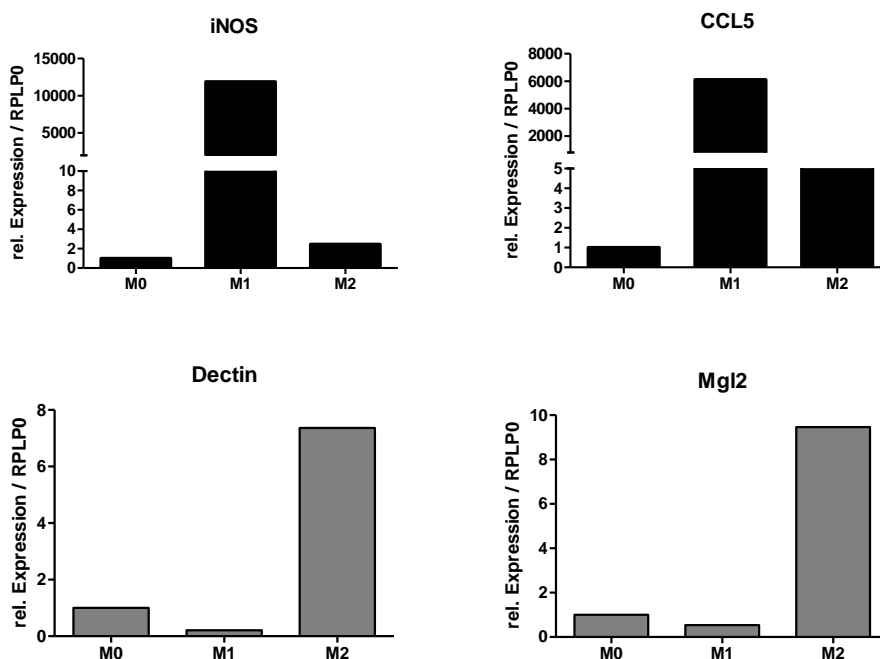


Abbildung 80: Nachweis von M1- und M2-Markern in polarisierten Makrophagen. Repräsentative Darstellung der Polarisation der primären murinen Makrophagen zum M1-Typ (LPS+IFN $\gamma$ ) und M2-Typ (IL-4) anhand von iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*) und CCL5 sowie Mgl2 (*macrophage galactose-type C-type lectin 2*) und Dectin auf RNA-Ebene anhand von qRT-PCR, normalisiert auf RPLP0.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
APC	<i>antigen presenting cells</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Kälberserumalbumin
CCL	chemokin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
c-KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
CSF-1	<i>Colony stimulating growth factor</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxy-Nucleotidtriphosphate
ECAR	<i>Extracelullar acidification rate</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EdU	5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin
EGF	epidermal growth factor
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymalen Transition
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FCS	Fetales Kälber Serum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor</i>
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	<i>hour</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HIF1α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
IFNγ	<i>Interferon-gamma</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IL	Interleukin
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
JAK/STAT	Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milliampere
mCRC	<i>metastatic colorectal cancer</i>

<b>mBMM</b>	<i>murine bonemarrow macrophages</i>
<b>MCSF</b>	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i>
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MMP</b>	Metalloproteinasen
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>nm</b>	Nanomolar
<b>OCR</b>	<i>oxygen consumption rate</i>
<b>OXPHOS</b>	oxidative Phosphorylierung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PD-1</b>	Programmed cell death protein 1
<b>PDAC</b>	Pankreatisch duktales Adenokarzinom
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PD-L1</b>	PD-1 Liganden
<b>PDX1</b>	<i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
<b>PECAM-1</b>	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
<b>PFS</b>	<i>progression free survival</i>
<b>PGE2</b>	Prostaglandin 2
<b>PI</b>	Propidium-Iodid
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>PNET</b>	Pankreatisch neuroendokrine Tumore
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Real-Time PCR
<b>rel.</b>	relativ
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>SCLC</b>	kleinzelligen Lungenkarzinoms
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid
<b>SEM</b>	Standardfehler
<b>sog.</b>	sogenannt
<b>TAM</b>	tumorasoziierten Makrophagen
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor $\beta$
<b>TME</b>	Tumormikromilieu
<b>Treg</b>	regulatorische T-Zellen
<b>V</b>	Volt
<b>VEGF-A</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
<b>WHO</b>	World Health Organization



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung der Tumorprogression des transgenen RIP1Tag2-Mausmodells.	<b>13</b>
<b>Abbildung 2:</b>	Einfluss von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Viabilität von BON-1-Zellen.	<b>51</b>
<b>Abbildung 3:</b>	Einfluss von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Viabilität von QGP-1-Zellen.	<b>52</b>
<b>Abbildung 4:</b>	Zeit- und dosisabhängige Reduktion der Proliferation durch Regorafenib, Sunitinib und Everolimus in BON-1-Zellen.	<b>53</b>
<b>Abbildung 5:</b>	Effekte von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Proliferation in BON-1-Zellen.	<b>54</b>
<b>Abbildung 6:</b>	Zeit- und dosisabhängige Reduktion der Proliferation durch Regorafenib, Sunitinib und Everolimus in QGP-1-Zellen.	<b>55</b>
<b>Abbildung 7:</b>	Effekte von Regorafenib, Sunitinib und Everolimus auf die Proliferation in QGP-1-Zellen.	<b>56</b>
<b>Abbildung 8:</b>	Western Blot-Analyse zur Darstellung von PARP1.	<b>57</b>
<b>Abbildung 9:</b>	Metabolische Untersuchung in BON-1-Zellen.	<b>59</b>
<b>Abbildung 10:</b>	Metabolische Untersuchung in QGP-1-Zellen.	<b>60</b>
<b>Abbildung 11:</b>	Sunitinib und Everolimus induzieren eine erhöhte maximale Respiration in BON-1-Zellen und QGP-1-Zellen.	<b>61</b>
<b>Abbildung 12:</b>	Regorafenib, Sunitinib und Everolimus senken die Glykolyserate in BON-1- und QGP-1-Zellen.	<b>62</b>
<b>Abbildung 13:</b>	Etablierung von drei murinen $\beta$ -Tumorzelllinien aus der RIP1Tag2-Maus	<b>63</b>
<b>Abbildung 14:</b>	Charakterisierung der murinen $\beta$ -Tumorzelllinien.	<b>64</b>
<b>Abbildung 15:</b>	Dosisabhängige Reduktion der Viabilität von Regorafenib in murinen $\beta$ -Tumorzellen.	<b>65</b>
<b>Abbildung 16:</b>	Effekt von Regorafenib auf die Proliferation der $\beta$ -Tumorzellen.	<b>66</b>
<b>Abbildung 17:</b>	Zeit- und dosisabhängige Reduktion der Proliferation durch Regorafenib in den murinen $\beta$ -Tumorzelllinien.	<b>67</b>
<b>Abbildung 18:</b>	Effekte von Regorafenib auf die Proliferation in den murinen $\beta$ -Tumorzelllinien.	<b>68</b>
<b>Abbildung 19:</b>	Bestimmung der Proliferation von $\beta$ -Tumorzellen mittels Click-iT® EdU.	<b>69</b>
<b>Abbildung 20:</b>	Western Blot-Analyse zur Darstellung von PARP1 und Cytochrom C in murinen $\beta$ -Tumorzelllinien.	<b>70</b>
<b>Abbildung 21:</b>	Darstellung der Tumorprogression der RIP1Tag2-Mäuse.	<b>71</b>
<b>Abbildung 22:</b>	Schematische Darstellung der Tumorprogression des transgenen RIP1Tag2-Mausmodells.	<b>72</b>
<b>Abbildung 23:</b>	Überlebenszeit-Analyse nach Kaplan-Meier in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>73</b>
<b>Abbildung 24:</b>	Gewichtsverlaufs der Mäuse in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>74</b>
<b>Abbildung 25:</b>	Quantifizierung der Inselanzahl in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>75</b>

<b>Abbildung 26:</b>	Quantifizierung der Inselfläche in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>75</b>
<b>Abbildung 27:</b>	Quantifizierung der Proliferationsrate mittels Ki-67.	<b>76</b>
<b>Abbildung 28:</b>	Ki-67-Färbung eines Insulinoms.	<b>77</b>
<b>Abbildung 29:</b>	Quantifizierung des Ki-67-Index in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>77</b>
<b>Abbildung 30:</b>	Quantifizierung der Blutgefäße mittels CD31.	<b>78</b>
<b>Abbildung 31:</b>	CD31-Färbungen von Insulinomen.	<b>79</b>
<b>Abbildung 32:</b>	Bestimmung der VEGF-Expression auf RNA- und Proteinebene.	<b>79</b>
<b>Abbildung 33:</b>	Bestimmung des VEGF-Levels im Serum in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>80</b>
<b>Abbildung 34:</b>	Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.	<b>81</b>
<b>Abbildung 35:</b>	Gewichtsverlaufs der Mäuse in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.	<b>81</b>
<b>Abbildung 36:</b>	Quantifizierung der Inselanzahl.	<b>82</b>
<b>Abbildung 37:</b>	Quantifizierung der Inselfläche.	<b>82</b>
<b>Abbildung 38:</b>	Quantifizierung der Proliferationsrate mittels Ki-67.	<b>83</b>
<b>Abbildung 39:</b>	Ki-67-Färbung von Insulinomen.	<b>83</b>
<b>Abbildung 40:</b>	Quantifizierung des Ki-67-Index in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.	<b>84</b>
<b>Abbildung 41:</b>	Quantifizierung der Blutgefäße mittels CD31.	<b>85</b>
<b>Abbildung 42:</b>	CD31-Färbungen von Insulinomen.	<b>85</b>
<b>Abbildung 43:</b>	Bestimmung der VEGF-Expression auf RNA- und Proteinebene.	<b>86</b>
<b>Abbildung 44:</b>	Bestimmung des VEGF-Levels im Serum in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.	<b>86</b>
<b>Abbildung 45:</b>	Repräsentative Darstellung eines nicht-invasiven Insulinoms (A) und eines invasiven Insulinoms (B).	<b>87</b>
<b>Abbildung 46:</b>	Anstieg von invasiven Insulinomen unter Regorafenib-Therapie.	<b>88</b>
<b>Abbildung 47:</b>	Regorafenib steigert die Cathepsin B-Expression auf RNA-Ebene.	<b>89</b>
<b>Abbildung 48:</b>	Quantifizierung der immunhistochemischen Cathepsin B-Färbung in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>90</b>
<b>Abbildung 49:</b>	Quantifizierung der immunhistochemischen Cathepsin B-Färbung in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.	<b>90</b>
<b>Abbildung 50:</b>	Western Blot-Analysen der anti-apoptotischen BCL-2-Proteinfamilie und STAT3.	<b>93</b>
<b>Abbildung 51:</b>	Western Blot-Analysen der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinfamilie und STAT3.	<b>94</b>
<b>Abbildung 52:</b>	Western Blot-Analyse zur Expression von Bcl-2 in den Insulinomen der RIP1Tag2-Mäuse <i>ex-vivo</i> .	<b>95</b>
<b>Abbildung 53:</b>	Bcl-2-Färbungen von Insulinomen.	<b>96</b>
<b>Abbildung 54:</b>	Quantifizierung der Bcl-2-positiven Zellen in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>97</b>
<b>Abbildung 55:</b>	Quantifizierung der Bcl-2-positiven Zellen in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.	<b>97</b>
<b>Abbildung 56:</b>	Effekt von Regorafenib auf die Proliferation der BON-1-Zellen.	<b>98</b>

---

<b>Abbildung 57:</b>	Synergistischer Effekt von Regorafenib und ABT-199 in BON-1-Zellen.	<b>99</b>
<b>Abbildung 58:</b>	Effekt von Regorafenib auf die Proliferation der QGP-1-Zellen.	<b>100</b>
<b>Abbildung 59:</b>	Synergistischen Effekt von Regorafenib und ABT-199 in QGP-1-Zellen.	<b>101</b>
<b>Abbildung 60:</b>	Synergistischer Effekt von Regorafenib und ABT-199 in den murinen $\beta$ -Tumorzellen.	<b>102</b>
<b>Abbildung 61:</b>	Regorafenib senkt die Viabilität von Makrophagen zeit- und dosisabhängig.	<b>103</b>
<b>Abbildung 62:</b>	Effekt von Regorafenib auf die Viabilität von polarisierten Makrophagen.	<b>104</b>
<b>Abbildung 63:</b>	Regorafenib induziert keine Apoptose in M0-, M1- und M2-Makrophagen.	<b>105</b>
<b>Abbildung 64:</b>	Effekt von Regorafenib auf das CSF1R-Expressionslevel in primären murinen Makrophagen.	<b>106</b>
<b>Abbildung 65:</b>	F4/80-Färbungen von Insulinomen der RIP1Tag2-Mäuse in der Studie zur Intervention der Tumor-entstehung.	<b>107</b>
<b>Abbildung 66:</b>	Quantitative Ermittlung der Makrophagen mittels F4/80.	<b>108</b>
<b>Abbildung 67:</b>	Bestimmung des CSF1-Rezeptors und MCSF in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>108</b>
<b>Abbildung 68:</b>	Quantifizierung der immunhistochemischen CSFR-Färbung in der Studie zur Intervention der Tumorentstehung.	<b>109</b>
<b>Abbildung 69:</b>	Quantitative Ermittlung der Makrophagen mittels F4/80.	<b>110</b>
<b>Abbildung 70:</b>	F4/80-Färbung von Insulinomen.	<b>110</b>
<b>Abbildung 71:</b>	Bestimmung des CSF1-Rezeptors und MCSF in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.	<b>111</b>
<b>Abbildung 72:</b>	Quantifizierung der immunhistochemischen CSF1R-Färbung in der Studie zur Intervention des Tumorwachstums.	<b>111</b>
<b>Abbildung 73:</b>	Regorafenib induziert ein immunsupprimierendes Tumormikromilieu während der Tumorentstehung und des Tumorwachstums.	<b>113</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Laborgeräte	<b>21</b>
<b>Tabelle 2:</b>	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	<b>22</b>
<b>Tabelle 3:</b>	Verwendete Kits	<b>23</b>
<b>Tabelle 4:</b>	Oligonukleotidsequenzen	<b>24</b>
<b>Tabelle 5:</b>	Primär-Antikörper	<b>25</b>
<b>Tabelle 6:</b>	Sekundär-Antikörper	<b>26</b>
<b>Tabelle 7:</b>	Verwendete Zelllinien	<b>26</b>
<b>Tabelle 8:</b>	Verwendete Zusätze für die Zellkultur	<b>26</b>
<b>Tabelle 9:</b>	Software	<b>27</b>
<b>Tabelle 10:</b>	Übersicht über die eingesetzten Zellen und den entsprechenden Zellzahlen	<b>29</b>
<b>Tabelle 11:</b>	Verwendete Inhibitoren mit den eingesetzten Konzentrationen	<b>30</b>
<b>Tabelle 12:</b>	Konzentrationen und Wirkmechanismus der Inhibitoren	<b>35</b>
<b>Tabelle 13:</b>	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	<b>38</b>
<b>Tabelle 14:</b>	Ablauf des Entwässerungsautomats	<b>48</b>



## Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Prof. Dr. Patrick Michl für die Möglichkeit diese Arbeit in der Abteilung für Gastroenterologie anzufertigen. Ich bin dankbar für die großartige wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Promotion. Durch die freundschaftliche Zusammenarbeit habe ich mich immer sehr wohl gefühlt.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an dich, Heidi. Als Laborleiterin und direkte Betreuerin habe ich so viel von dir gelernt! Du hast mich in die Welt der Mäuse eingeführt und ich weiß, dass es nicht immer einfach war. Ich bin dir dankbar, dass du in manch hektischer Situation stets einen kühlen Kopf bewahrt hast. Ich bin mir sicher, dir fallen da ein paar Situationen ein. Du hast Vieles mit Humor genommen und gleichzeitig große Professionalität bewiesen. Ich danke dir für die vielen neuen Ideen, durch die du maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hast!

Ich danke außerdem Sebastian Krug für die freundliche Zusammenarbeit. Es hat immer Spaß gemacht mit dir zu arbeiten.

Ich möchte mich außerdem recht herzlich bei Prof. Dr. Johannes Haybaeck und seinen Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und die stets freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

Weiterhin danke ich meiner lieben Freundin Katharina Theuerkorn, die den Laboralltag, aber auch das Leben „drum herum“ enorm bereichert hat. Mit dir konnte ich über alles reden. Zusammen mit Phillip und Lars waren wir ein super Ruderteam. Ich danke euch für die vielen netten Abende, mit oder ohne Sambuca. Ihr habt das Leben in Halle stark bereichert.

Aber auch allen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der AG Michl, Jan Riedel, Tom Kaune, Florian Sperling, Claudia Ruffert, Stefanie Gühne, Dana Reinecke, Richard Böhme, Nico Hesselbarth, Diana Oelschlägel, Jan Kleilein, Bao Dinh und Linda Döring, danke für die netten Gespräche, den wissenschaftlichen Austausch und ein stets freundliches Arbeitsklima.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meinen Partner Robin Wagner. Du hast mich so verständnisvoll über die Jahre der Promotion begleitet und mich in manch schwerer Phase auch aus der Ferne so toll unterstützt und aufgebaut.

Ich danke meiner Familie und meinen lieben Freunden, die immer für mich da sind und eine gelungene Abwechslung vom stressigen Laboralltag waren.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern von Herzen für ihre bedingungslose und großartige Unterstützung sowie die wertvollen Ratschläge in jeder Lebenslage. Ihr habt mir so Vieles ermöglicht und mir dadurch viele Schritte deutlich erleichtert!

Vielen Dank!

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades. Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Gießen, den 11. November 2019

Maren Egidi