

Abstract

Anti-angiogenic therapy mainly targeting VEGF/VEGFR2 (vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor 2) is seen as an effective strategy in cancer treatment (Ebos and Kerbel, 2011; Ellis and Hicklin, 2008; Sennino and McDonald, 2012). However, clinical results show only modest PFS (progression-free survival) without improvement in OS (overall survival) (Carmeliet and Jain, 2011; Ellis and Hicklin, 2008) and development of resistance in some cases leading to disease progression (Ebos and Kerbel, 2011). In addition, emerging preclinical data demonstrated that anti-angiogenic therapy promotes a malignant phenotype including increased invasiveness and metastasis in different types of cancer, however the mechanisms of this evasive resistance are poorly understood (Bergers and Hanahan, 2008; Du et al., 2008; Ebos et al., 2009; Lu et al., 2012; Paèz-Ribes et al., 2009; Sennino et al., 2012). Therefore, the aim of this work was to investigate, if VEGFR2 inhibition leads to an invasive phenotype in NSCLC (non-small-cell lung cancer) and to identify a possible mechanism underlying this negative side effect. 3-D collagen based invasion assay and in vivo intrapulmonary injections showed that VEGFR2 inhibition induced an invasive phenotype in NSCLC cell lines. Moreover, VEGFR2 inhibition in vivo led to increased amount of lung metastases. Immunoprecipitation experiments and proximity ligation assay revealed that EphA2 (erythropoietin-producing hepatoma receptor A2) forms a heterocomplex with VEGFR2 which was dissociated upon VEGFR2-targeted therapy. EphA2 KD (knock down) in NSCLC cells was able to inhibit the malignant phenotype caused by anti-angiogenic therapy in vitro and in vivo showed by inhibition of invasiveness and reduced number of tumor metastases. Furthermore, a single mutation on EphA2 (S897A) was sufficient to inhibit tumor cell invasion and malignancy comparable to the EphA2 KD results. It was demonstrated that this position (S897) is a substrate for the AKT kinase (protein-kinase B). In addition, pharmacological targeting of EphA2 with Dasatinib in combination with anti-angiogenic therapy decreased lung metastases and inhibited tumor cell invasion in vivo. Based on these findings a possible mechanism for the invasive phenotype could be proposed. Upon anti-angiogenic treatment the heterocomplex of VEGFR2 and EphA2 is dissociated and the S897 position is available for phosphorylation by activated AKT resulting in invasion. In summary, the current work identified a new not yet described interaction between VEGFR2 and EphA2 and revealed that the S897 position of EphA2 has a regulatory function in controlling malignant progression. This may help to

develop new therapeutic strategies to overcome anti-angiogenic therapy resistances in the future.

Zusammenfassung

Die antiangiogene Therapie galt als effektive Strategie in der Krebsbehandlung. Dabei richtet sich diese hauptsächlich gegen die beiden Hauptregulatoren der Angiogenese VEGF und VEGFR2 (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor/vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 2) (Ebos und Kerbel, 2011; Ellis und Hicklin, 2008; Sennino und McDonald, 2012). Jedoch zeigten klinische Studien eine geringfügige Steigerung des progressionsfreien Überleben der Patienten, wobei das Gesamtüberleben leider nicht verbessert wurde (Carmeliet und Jain, 2011; Ellis und Hicklin, 2008). Darüber hinaus entwickelten sich in einigen Fällen Resistenzen, die zum ungebremsten Verlauf der Krankheit führten (Ebos und Kerbel, 2011). Besorgniserregende präklinische Studien haben gezeigt, dass die antiangiogene Therapie einen malignen Phänotyp mit gesteigerter Invasivität und Metastasierung ausbilden kann. Dies konnte in verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden, wobei der Mechanismus dieser Art von Resistenz noch nicht aufgeklärt ist (Bergers und Hanahan, 2008; Du et al., 2008; Ebos et al., 2009; Lu et al., 2012; Paèz-Ribes et al., 2009; Sennino et al., 2012).

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit zu überprüfen, ob die Inhibition von VEGFR2 zu einem invasiven Phänotyp im nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (engl. non-small-cell lung cancer (NSCLC)) führt. In diesem Zusammenhang sollte der Mechanismus, der diese negative Nebenwirkung hervorruft, aufgeklärt werden. Mittels eines in vitro 3-D Kollagen basierten Invasions Assays und in vivo durch Intrapulmunale Injektion von NSCLC Zelllinien konnte bestätigt werden, dass VEGFR2 Inhibition zu einem invasiven Phänotyp führt. Zusätzlich wurde durch VEGFR2 Inhibition die Metastasenanzahl erhöht. Über Immunopräzipitations-Experimente sowie durch einen sogenannten Proximity Ligation Assay® konnte nachgewiesen werden, dass VEGFR2 und EphA2 (engl. erythropoietin-producing hepatoma receptor A2) einen Heterokomplex ausbilden, welcher durch VEGFR2 Inhibition wieder aufgehoben wurde. EphA2 herunterregulierte (engl. KD (knock down)) NSCLC Zellen konnten den durch antiangiogene Therapie hervorgerufen malignen Phänotyp in vitro und in vivo unterbinden. Dies konnte durch Inhibition der Invasion sowie durch reduzierte Metastasenanzahl gezeigt werden. Darüber hinaus konnte, vergleichbar zu den EphA2 KD Zellen, die Invasion als auch die maligne Weiterentwicklung durch eine einzige Mutation auf dem EphA2 Protein (S897A) unterbunden werden. Es konnte bestätigt werden, dass dieses Serin (S897) ein Substrat für die Kinase AKT (engl. protein-kinase B) ist. Zusätzlich wurde in vivo durch pharmakologische

Inhibierung von EphA2 mittels Dasatinib in Kombination mit antiangiogener Therapie die Metastasenzahl reduziert sowie die Invasion gehemmt. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte ein möglicher Mechanismus für den invasiven Phänotyp vorgeschlagen werden. Antiangiogene Therapie führt zur Dissoziation des VEGFR2-EphA2 Heterokomplexes, wodurch die S897 Position für die Phosphorylierung durch AKT zugänglich ist und schließlich die Invasion aktiviert. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine neue noch nicht beschriebene Interaktion von VEGFR2 und EphA2 identifiziert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die S897 Position von EphA2 eine regulierende Funktion in der bösartigen Entwicklung von Krebs hat. Diese Erkenntnisse können für die Entwicklung neuer Therapieansätze hilfreich sein, um die durch antiangiogene Therapie hervorgerufene Resistenzform (maligner Phänotyp) in Zukunft zu unterbinden.