

1. Abstract

Lung cancer is one of the most common types of cancer and cause of cancer-related deaths worldwide, with 1.61 million new cases and 1.38 million deaths in 2008 alone, representing 12.7 % of new cancers and 18.2 % of cancer mortality. Roughly 85 % of lung cancers are non-small cell lung cancer (NSCLC) and the majority of patients are diagnosed at an advanced stage. Current treatments for NSCLC may prolong survival, but they are rarely curative [1].

The process of angiogenesis is considered as a hallmark of cancer, as it is an integral part of tumor growth, progression and metastasis [2]. Pro-angiogenic pathways have been attractive therapeutic targets, since they are commonly expressed in NSCLC. The vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway is considered to be the most prominent pro-angiogenic pathway and an effective target in anti-angiogenic therapy [3-5]. However, anti-angiogenic therapy in NSCLC is rarely a long-term solution due to acquired drug resistance by the patients. Furthermore, pre-clinical data have demonstrated that in some cases anti-angiogenic therapy promotes a malignant phenotype associated with increased invasiveness and metastasis. Unfortunately, the role of VEGF and its receptor VEGFR2 as prognostic factors in NSCLC is still inconclusive [6-11]. Therefore, the aim of this study was to identify new key players and prognostic markers in angiogenesis to potentially improve anti-angiogenic therapy in NSCLC. In this context, the involvement of VEGFR2 and EphA2 in regard to tumor invasiveness was investigated. It has been previously shown that VEGFR2 inhibition in NSCLC results in an invasive phenotype, which is mediated by EphA2. To identify a potential new target in anti-angiogenic therapy, the first goal of this study was to determine a complex interaction between VEGFR2 and EphA2. Using proximity ligation assay, a heterocomplex between VEGFR2 and EphA2 was identified, which dissociates upon VEGFR2 inhibition. This discovery may aid in developing new therapeutic strategies to overcome anti-angiogenic therapy resistance in the future.

The second goal of this study was to investigate five previously identified point mutations in the KDR gene to determine a potential impact on angiogenesis and invasiveness in NSCLC. *In vivo* experiments in mice have shown a strong reduction in tumor growth in cells harboring the G873R missense mutation in VEGFR2.

However, *in vitro* studies have determined no defect in the function and activity of VEGFR2. Nonetheless, this mutation could be used as a potential prognostic marker to personalize anti-angiogenic treatment for NSCLC patients carrying this mutation.

9. Zusammenfassung

Lungenkrebs gilt als eine der häufigsten Krebsarten in der menschlichen Population und ist verantwortlich für rund 18 % aller durch Krebs hervorgerufenen Todesfälle. Ungefähr 85 % aller Lungenkrebsfälle sind nichtkleinzellige Bronchialkarzinome ("Non-Small Cell Lung Cancer" (NSCLC)) und werden meistens erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Derzeitige Behandlung für nichtkleinzellige Bronchialkarzinome können die Überlebensdauer der Patienten zwar etwas verlängern, aber den Krebs nicht heilen [1].

Angiogenese gilt als eines der Kennzeichen von Krebs, da es in direktem Zusammenhang mit Tumorwachstum, Progression und Bildung von Metastasen steht [2]. Pro-angiogene Signalwege werden bereits seit längerer Zeit als therapeutische Ziele verwendet, da sie vermehrt in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen vorkommen. Der VEGF Signalweg gilt als der wichtigste pro-angiogene Signalweg und ein effektives Ziel in der anti-angiogenen Krebstherapie [3-5]. Leider führt die anti-angiogene Therapie bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen selten zu langanhaltendem Erfolg, da die Patienten vermehrt Resistenzen gegen die verwendeten Therapeutika entwickeln und sich der Krebs wieder ausbreitet. Weiterhin haben präklinische Studien gezeigt, dass anti-angiogene Therapie in einigen Fällen einen malignen Phänotyp hervorrufen kann, der mit gesteigerter Invasivität und Ausbildung von Metastasen assoziiert ist. Jedoch ist die genaue Rolle von VEGF und seinem Rezeptor VEGFR2 als prognostische Marker in nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom nicht völlig bekannt [6-11]. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Identifizierung von neuen Proteinen und prognostischen Markern in der Angiogenese, in der Hoffnung die anti-angiogene Therapie für nichtkleinzellige Bronchialkarzinome zu verbessern. In diesem Zusammenhang war das erste Ziel der Arbeit die Untersuchung der Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren VEGFR2 und EphA2. Frühere Studien haben belegt, dass die Inhibition von VEGFR2 in nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom zu einem invasiven Phänotyp führt, der über EphA2 gesteuert wird. Um ein potentiell neues Ziel in der anti-angiogenen Therapie zu identifizieren, wurde mittels eines sogenannten "proximity ligation assay" (PLA) die Bildung eines Heterokomplexes zwischen VEGFR2 und EphA2 nachgewiesen, der durch Inhibition von VEGFR2 aufgehoben werden konnte. Diese Entdeckung

könnte dabei helfen neue Therapieansätze zu entwickeln, um den durch die anti-angiogene Therapie hervorgerufenen Resistenzen entgegen zu wirken.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von fünf somatischen Mutationen in VEGFR2 und die potentielle Auswirkung dieser Mutanten auf die Angiogenese und Invasivität in nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom. *In vivo* Experimente in immunodefizienten Mäusen haben gezeigt, dass Zellen, welche die VEGFR2 G873R Mutation beinhalten, ein erheblich reduziertes Tumorwachstum aufweisen. Jedoch konnten *in vitro* Studien keinen Defekt in Funktion und Aktivität von VEGFR2 feststellen. Dennoch ist diese Erkenntnis bedeutend, da diese Mutation in VEGFR2 als prognostischer Marker genutzt werden kann, um anti-angiogene Therapie in nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom zu verbessern.