

**Charakterisierung prädiktiver molekularer Biomarker
für die Aktivität von
therapeutischen anti-EGFR Antikörpern**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Biologin Katharina Bergmann
aus Groß-Umstadt

Tübingen
2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

20.12.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Schwarz

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	1
1.1.1 Die ErbB-Rezeptorfamilie	1
1.1.2 Die Liganden der ErbB-Rezeptoren	2
1.1.3 EGFR-Signaling	3
1.1.3.1 Die Aktivierung des EGFR	3
1.1.3.2 Die Signaltransduktion des EGFR	4
1.1.4 Die physiologische Rolle des EGFR und der Liganden	6
1.2 Die Rolle des EGFR im Tumorgeschehen	7
1.3 Der EGFR als therapeutisches Target in der Onkologie	8
1.3.1 EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI)	8
1.3.2 Monoklonale Antikörper (mAb) gegen den EGFR	8
1.3.2.1 Cetuximab	9
1.3.2.2 Panitumumab	11
1.3.2.3 Matuzumab	12
1.3.2.4 Nimotuzumab	13
1.3.3 Biomarker für therapeutische anti-EGFR Antikörper	13
1.3.3.1 Der EGFR-Polymorphismus R521K	15
1.3.3.2 Die Expression der EGFR-Liganden	16
1.3.3.3 Der KRAS-Mutationsstatus	17
1.3.3.4 Die Expression von ErbB3	17
1.4 Ziel der Arbeit	18
2. MATERIAL	19
2.1 Laborgeräte	19
2.2 Software	20
2.3 Kits	20
2.4 Laborchemikalien und Reagenzien	21

2.5	Einmalartikel	21
2.6	Verbrauchsmaterialien	22
2.7	Medien, Zusätze und Reagenzien für die Zellkultur	23
2.8	Wachstumsfaktoren und Therapeutika	23
2.9	Bakterienstämme	23
2.10	Vektoren und Oligonukleotide	24
2.11	Antikörper	25
2.12	Medien und Puffer	25
2.13	Säugerzelllinien	27
3.	METHODEN	28
3.1	Molekularbiologische Methoden	28
3.1.1	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	28
3.1.2	Anzucht und Einfrieren von transformierten Bakterien	28
3.1.3	Präparation bakterieller Plasmid-DNA	28
3.1.4	Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit	29
3.1.5	<i>In vitro</i> Mutagenese von Vektorkonstrukten	29
3.1.6	Sequenzierung	30
3.1.7	Isolierung der RNA aus Säugerzellen	31
3.1.8	Reverse Transkription (RT) von RNA	31
3.1.9	Agarosegelelektrophorese	32
3.1.10	Quantitative Real-Time PCR-Analyse	32
3.1.11	Genexpressionsanalyse mit <i>Affymetrix-Arrays</i>	32
3.2	Allgemeine Zellkulturtechniken	33
3.2.1	Kultivierung von Säugerzellen	33
3.2.2	Bestimmung der Zelldichte	33
3.2.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	33
3.2.4	Transiente Transfektion von Säugerzellen	34
3.2.5	Stabile Transfektion von NIH3T3-Säugerzellen	34
3.2.6	Behandlung von Zellen	35
3.2.7	Monolayer-Assay	36
3.2.8	Softagar-Assay	38
3.2.9	Durchflusszytometrie	39
3.3	Proteinbiochemische Methoden	39
3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus humanen Zellen	39
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten	40
3.3.3	Vorbereitung der Lysate für die elektrophoretische Trennung	40
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.3.5	Western Blot-Analyse	41
3.3.6	<i>WideScreen® BeadPlex® Assays</i>	41
3.3.7	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	42

4. ERGEBNISSE	43
4.1 Untersuchung des EGFR-Polymorphismus R521K	43
4.1.1 Etablierung und Validierung des zellulären Systems	43
4.1.2 Proliferation unter dem Einfluss der EGFR-Liganden	45
4.1.2.1 Proliferation im Monolayer-Assay	46
4.1.2.2 Proliferation im Softagar-Assay	48
4.1.2.3 Zusammenfassung des Kapitels 4.1.2	51
4.1.3 Zeitverlauf der EGFR-Signaltransduktion	52
4.1.3.1 Phosphorylierung des EGFR nach Stimulation mit Liganden	52
4.1.3.2 Aktivierung von Signalproteinen nach Stimulation mit Liganden	54
4.1.3.3 Zusammenfassung des Kapitels 4.1.3	57
4.1.4 Genprofil nach Stimulation mit EGFR-Liganden	57
4.1.4.1 Unterschiede zwischen den EGFR-Varianten	58
4.1.4.2 Unterschiedliche Effekte der EGFR-Liganden	66
4.1.4.3 Zusammenfassung des Kapitels 4.1.4	74
4.1.5 Einfluss des EGFR-Polymorphismus und der EGFR-Liganden auf die Wirkung der therapeutischen Antikörper	74
4.1.5.1 Wachstum im Monolayer unter exogenem Ligandeneinfluss	75
4.1.5.2 Dreidimensionales Wachstum unter exogenem Ligandeneinfluss	77
4.1.5.3 Wachstum im Monolayer unter endogenem Ligandeneinfluss	79
4.1.5.4 Effekt der anti-EGFR Antikörper auf die EGFR-Signaltransduktion	82
4.1.5.5 Zusammenfassung des Kapitels 4.1.5	86
4.2 Untersuchung von ErbB3	87
4.2.1 Validierung des zellulären Systems	87
4.2.2 Effekte der EGFR-Liganden und der therapeutischen Antikörper	88
4.2.2.1 Effekt der anti-EGFR Antikörper auf die EGFR- und ErbB3-Aktivierung	88
4.2.2.2 Effekt der anti-EGFR Antikörper auf die EGFR-Signaltransduktion	90
4.2.2.3 Zusammenfassung des Kapitels 4.2.2	92
4.3 Untersuchung verschiedener KRAS-Mutationen	92
4.3.1 Charakterisierung des Zellsystems	93
4.3.1.1 Expression der humanen EGFR-Liganden	93
4.3.1.2 Expressionsprofil und Aktivierungsstatus von Signalproteinen	94
4.3.2 Effekte der EGFR-Liganden auf die EGFR-Signaltransduktion	95
4.3.3 Einfluss von anti-tumoralen Therapeutika auf die Proliferation	97
4.3.4 Zusammenfassung des Kapitels 4.3	99
5. DISKUSSION	100
5.1 Einfluss der EGFR-Liganden auf Wachstum, Signaltransduktion und Sensitivität von Zellen gegen anti-EGFR Antikörper	100
5.1.1 Effekte der EGFR-Liganden auf Proliferation, Genexpression und Signaltransduktion	100

5.1.2	Untersuchung der endogenen Ligandenexpression	102
5.1.3	Ansprechen von Tumorzellen auf therapeutische anti-EGFR Antikörper unter dem Einfluss verschiedener EGFR-Liganden	104
5.2	Einfluss des EGFR-Polymorphismus R521K auf Proliferation, Genexpression und Ansprechen von Zellen auf anti-EGFR Antikörper	107
5.3	Einfluss der Coexpression von EGFR und ErbB3 auf die Sensitivität von Tumorzellen gegen therapeutische anti-EGFR Antikörper	110
5.4	Einfluss verschiedener KRAS-Mutationen auf das Ansprechen von Tumorzellen auf EGFR-Liganden und anti-tumorale Therapeutika	112
6.	ZUSAMMENFASSUNG	115
	LITERATURVERZEICHNIS	117
	DANKSAGUNG	131

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1- 1: Rezeptoraffinität der ErbB-Liganden.	2
Abb. 1- 2: Darstellung der Liganden-induzierten EGFR-Dimerisierung.	3
Abb. 1- 3: Signalwege, die durch Aktivierung des EGFR induziert werden können.	6
Abb. 1- 4: Vergleich der Antikörpervarianten.	9
Abb. 4- 1: Expression von humanen EGFR auf stabil tranfizierten NIH3T3-Zellen	44
Abb. 4- 2: Effekt von humanem EGF auf Proliferation und Signaltransduktion stabil transfizierter NIH3T3-Zellen.	45
Abb. 4- 3: Konzentrations-Wirkungskurve der EGFR-Liganden bei NIH3T3-Zellen im Monolayer.	47
Abb. 4- 4: Proliferationsverhalten von stabil transfizierten NIH3T3-Zellen unter serumfreien Bedingungen.....	48
Abb. 4- 5: Konzentrations-Wirkungskurve der EGFR-Liganden bei NIH3T3-Zellen im Softagar.	49
Abb. 4- 6: Proliferationsverhalten von stabil transfizierten NIH3T3-Zellen ohne Zugabe von EGFR-Liganden.	51
Abb. 4- 7: Zeitabhängige Expression und relative Phosphorylierung der EGFR-Varianten 521K und 521R nach Stimulierung mit EGFR-Liganden.	53
Abb. 4- 8: Zeitabhängigen Aktivierung von Signalproteinen in EGFR 521K- bzw. EGFR 521R-Zellen nach Stimulierung mit EGFR-Liganden.....	56
Abb. 4- 9: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Genexpressionsprofile von stimulierten und unstimulierten NIH3T3-Zellen, die stabil humanen EGFR 521K, EGFR 521R oder Leervektor exprimieren.	59
Abb. 4- 10: Box-Whisker-Plots ausgewählter Gene, deren Expression von der Wahl der EGFR-Variante beeinflusst wird.	62
Abb. 4- 11: Profil-Analysen der Gennetzwerke „Frühe Wachstumsfaktor-Antwort“ und „Zellzyklusregulation“.....	64
Abb. 4- 12: Expressionsprofile beispielhafter Gene aus den Bereichen „frühe Wachstumsfaktor-Antwort“ und „Zellzykluskontrolle“.	65
Abb. 4- 13: Hierarchisches Clustering.	66
Abb. 4- 14: Globale oder „Genom“-weite Betrachtung der Liganden-induzierten Unterschiede in der Genexpression.	67
Abb. 4- 15: Liganden-spezifische Genexpression: hierarchisches Clustering der negativen log-transformierten p-Werte aus Tukey-Tests.....	69
Abb. 4- 16: Exemplarische Darstellung Liganden-spezifischer Genregulation.....	73
Abb. 4- 17: Liganden-vermitteltes Ansprechen der NIH3T3-Zellen auf therapeutische Antikörper im Monolayer-Assay.....	76
Abb. 4- 18: Liganden-vermitteltes Ansprechen der NIH3T3-Zellen auf therapeutische Antikörper im Softagar-Assay bei geringer Ligandenkonzentration.	78

Abb. 4- 19: Liganden-vermitteltes Ansprechen auf therapeutische Antikörper im Softagar-Assay bei hoher Ligandenkonzentration.	79
Abb. 4- 20: Anreicherung von humanen EGFR-Liganden im Überstand von EGFR-exprimierenden NIH3T3-Zellen nach Behandlung mit therapeutischen Antikörpern.	80
Abb. 4- 21: Liganden-abhängiges Ansprechen der NIH3T3-Zellen auf therapeutische Antikörper.	81
Abb. 4- 22: Vergleich von Signalproteinen in EGFR 521K-Zellen, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt wurden.	84
Abb. 4- 23: Vergleich von Signalproteinen in EGFR 521R-Zellen, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt wurden.	85
Abb. 4- 24: Expression von humanem EGFR und humanem ErbB3 in stabil transfizierten CHO-Zellen.	87
Abb. 4- 25: Vergleich von Signalproteinen in CHO-EGFR Zellen, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt wurden.	90
Abb. 4- 26: Vergleich von Signalproteinen in CHO-EGFR/ErbB3 Zellen, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt wurden.	91
Abb. 4- 27: Expression von <i>TGFA</i> , <i>AREG</i> und <i>EREG</i> in isogenen SW48-Zellen.	93
Abb. 4- 28: Untersuchung ausgewählter Signalproteine von isogenen SW48-Zellen.	95
Abb. 4- 29: Vergleich der Signaltransduktion in isogenen SW48-Zellen nach Stimulierung mit EGFR-Liganden.	96
Abb. 4- 30: Konzentrations-Wirkungskurven von Oxaliplatin und Cetuximab.	97

Tabellenverzeichnis

Tab. 4- 1: Bestimmung der mittleren EC_{50} aus drei unabhängigen Monolayer-Experimenten.	46
Tab. 4- 2: Bestimmung der mittleren EC_{50} aus drei unabhängigen Softagar-Experimenten.	50
Tab. 4- 3: Versuchsaufbau für die Affymetrix-Analyse	58
Tab. 4- 4 Gene, die durch Expression der EGFR-Varianten 521K und 521R differentiell exprimiert wurden.	60
Tab. 4- 5: Relative EGFR-Phosphorylierung [%] von NIH3T3-Zellen nach Behandlung mit EGFR-Liganden und therapeutischen anti-EGFR Antikörpern.	83
Tab. 4- 6: Relative EGFR- und ErbB3-Phosphorylierung [%] von CHO-Zellen nach Behandlung mit EGFR-Liganden und therapeutischen anti-EGFR Antikörpern.	88
Tab. 4- 7: Relatives Wachstum der SW48-Zellen 72 h nach Behandlung mit Oxaliplatin (10 μ M) oder Cetuximab (100 μ g/mL) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.	98

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AREG	Amphiregulin
ATP	Adenositriphosphat
b-Myb	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BTC	Betacellulin
bzw.	beziehungsweise
c	centi
C	Cetuximab
C	Cytosin
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma oncogene</i>
Ccnd1	Cyclin D1
CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR	Cystein-reich
CTF	C-terminales Fragment
D-MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PK	DNA-abhängigen Proteinkinase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dusp1	<i>Dual-specificity phosphatase 1</i>
E	Experiment
E2F1	E2F Transkriptionsfaktor 1
EC ₅₀	<i>Effective concentration 50%</i> (effektive Konzentration 50%)
EDTA	<i>Ethylen-diamin-tetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	EGF Rezeptor
EGFR 521K	Polymorphismus des EGFR mit einem Lysin (K) an Position 521
EGFR 521R	Polymorphismus des EGFR mit einem Arginin (R) an Position 521
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPG	Epigen
ErbB	<i>v-erbB avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
EREG	Epiregulin
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	und andere
Fc	<i>Fragment, crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fos	<i>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
G	Guanin
g	Gramm
Gab1	<i>Grb2-associated binding protein 1</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCN	<i>Gene copy number</i>

GO	<i>Gene ontology</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
h	<i>hour</i> (Stunde)
H ₂ O	Wasser
HB-EGF	<i>Heparin binding EGF</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin-8
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
Jun	<i>v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog</i>
k	kilo
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	Matuzumab
m	Meter
m	milli
M	Molar
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
mCRC	<i>Metastasising colorectal cancer</i> (metastasierendes Kolorektalkarzinom)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleid acid</i> (Boten-RNA)
min	Minute
Myc	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n	nano
N	Nimotuzumab
NIH3T3	<i>Mouse embryo fibroblast; 3-day transfer, inoculum 3x10⁵ cells</i>
NRG	Neuregulin
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> (nichtkleinzelliger Lungenkrebs)
OD	optische Dichte
P	Panitumumab
p	piko
p	phospho
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	<i>Principal component</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PCL _γ	Phospholipase C- γ
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PTB	<i>Phosphotyrosine binding</i>
p85S6K	p85S6-Kinase
RAF	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase

s	Sekunde
S6RP	S6 ribosomales Protein
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
SCCHN	<i>Squamous cell carcinoma head and neck</i> (Plattenepithelkarzinom Kopf und Hals)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SH2	<i>Src Homology 2</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing transforming protein</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
Src	<i>v-Src avian sarcoma viral oncogene</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TGFA	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
v/v	<i>Volume in volume</i> (Volumenprozent)
w/v	<i>Weight in volume</i> (Gewichtsprozent)
z.B.	zum Beispiel

sonstige Symbole

°C	Grad Celsius
μ	mikro
%	Prozent
®	<i>Registered</i>
™	<i>Trade Mark</i>

Einbuchstabencode der Aminosäuren

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

1. Einleitung

1.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

1.1.1 Die ErbB-Rezeptorfamilie

Zelluläre Prozesse werden durch interne und externe Signale, die entweder stimulierend oder inhibierend wirken, kontrolliert. Zellen können auf externe Signale mit Hilfe einer Reihe von membranständigen Rezeptoren reagieren; diese übertragen die Information über die Zellmembran ins Zellinnere und leiten so eine Kaskade molekularer Reaktionen ein.

Eine Klasse von membranständigen Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), die an zentralen Mechanismen wie Zellwachstum, Überleben der Zelle, Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Migration beteiligt sind. Bisher wurden 58 RTK identifiziert, die in 20 Unterfamilien unterteilt werden und zu denen die Familie der ErbB-Rezeptoren gehört [Lemmon und Schlessinger, 2010]. Sie wird von vier Mitgliedern (ErbB1/HER1/EGFR [*Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 1 / Human Epidermal Growth Factor Receptor 1 / Epidermal Growth Factor Receptor*], ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4) gebildet, die wie alle RTK eine ligandenbindende extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne aufweisen. Letztere ist hoch konserviert und zeichnet sich durch eine Tyrosinkinase (TK)-Aktivität und durch eine C-terminale regulatorische Region aus. Die Aktivierung der TK geschieht durch Ligandenbindung und gleichzeitige Dimerisierung von Rezeptormonomeren [Olayioye *et al.*, 2000; Yarden, 2001].

EGFR und ErbB4 sind autonome Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie, die durch Ligandenbindung aktiviert werden. Im Gegensatz dazu stehen die nicht-autonomen Mitglieder ErbB2 und ErbB3. Während ErbB3 eine defiziente TK-Aktivität aufweist, bindet ErbB2 keinen bekannten Liganden. ErbB2 stellt den präferierten Dimerisierungspartner aller anderen ErbB-Rezeptoren dar [Avraham und Yarden, 2011; Citri *et al.*, 2003; Graus-Porta *et al.*, 1997; Guy *et al.*, 1994; Lurje und Lenz, 2009; Tzahar *et al.*, 1997].

Die Aktivierung der ErbB-Rezeptoren durch Bildung von Hetero- und Homodimeren führt zu einem komplexen Netzwerk an Signalwegen. Die Diversität dieses ErbB-Signalings wird durch das Vorhandensein mehrerer Liganden erhöht, die verschiedene ErbB-Rezeptoren binden und aktivieren können.

1.1.2 Die Liganden der ErbB-Rezeptoren

Die Aktivierung von ErbB-Rezeptoren geschieht in der Regel durch Liganden, die als Agonisten der ErbB-Rezeptoren wirken und sich durch gewebespezifische Expression, posttranslationale Prozessierungsschritte sowie unterschiedliche Rezeptoraffinität und -spezifität (siehe Abb. 1-1) ausweisen. Zu den Liganden der ErbB-Rezeptoren gehören der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierende Wachstumsfaktor alpha (TGFA), Amphiregulin (AREG), Epigen (EPG), Betacellulin (BTC), Heparin-bindender (HB)-EGF, Epi-regulin (EREG) und die Neureguline, NRG1-6 [Wilson *et al.*, 2009]. Die Liganden sind Typ I Transmembranproteine und gliedern sich in eine N-terminale Proregion, ein EGF-Motiv, eine kurze juxtamembranständige Domäne, eine hydrophobe Transmembrandomäne und ein C-terminales Fragment. Das EGF-Motiv wird von drei intramolekularen Gruppen gebildet, die durch drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, und verleiht dem Liganden seine Bindungsspezifität [Harris *et al.*, 2003].

Die Freisetzung löslicher Liganden geschieht durch das sogenannte *ectodomain shedding*, bei dem die Liganden von der Membran proteolytisch gespalten werden. Sobald die Liganden löslich vorliegen, können sie auf benachbarte Zellen (parakrin), auf weit entfernt liegende Zellen (endokrin) oder auf die Zellen wirken, in denen die Liganden synthetisiert wurden (autokrin). Neben der Rezeptoraktivierung durch lösliche Liganden wurde noch ein juxtakriner Mechanismus beschrieben, bei dem membranständige Liganden Rezeptoren benachbarter Zellen stimulieren können [Anklesaria *et al.*, 1990; Harris, 2003; Singh und Harris, 2005].

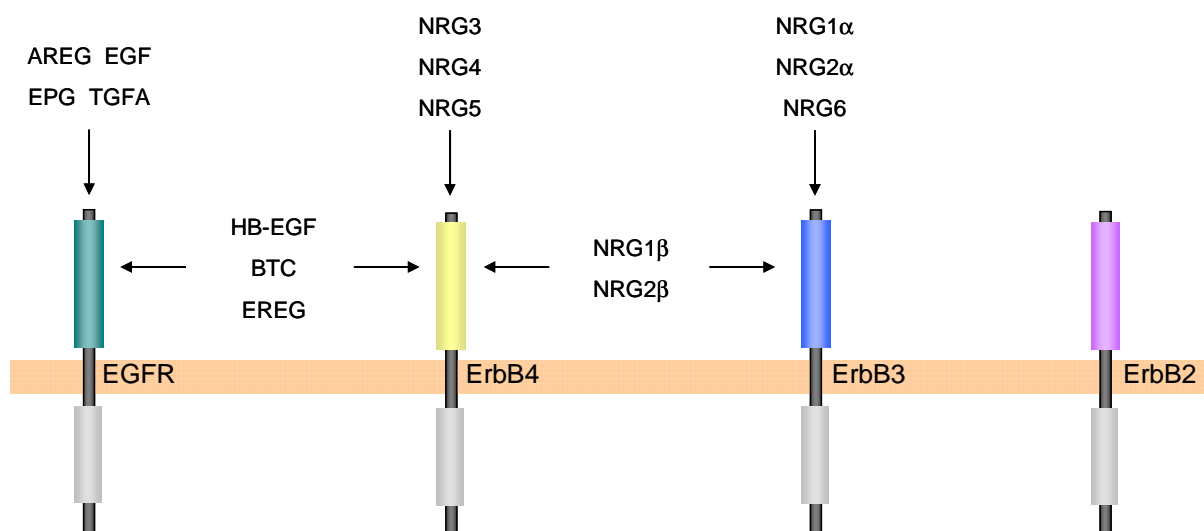


Abb. 1-1: Rezeptoraffinität der ErbB-Liganden.

Einige Liganden (z.B. EGF und NRG3) binden nur an einen Rezeptor, während andere (z.B. BTC und EREG) mit zwei Rezeptoren interagieren können [verändert nach Wilson *et al.*, 2009].

Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften der ErbB-Liganden wirken sich auf die Diversität des ErbB-Signalings aus: So werden Signalstärke und -dauer durch die unterschiedliche Rezeptoraffinität und -bindungsspezifität der Liganden gelenkt. Außerdem wirkt sich die pH-Sensibilität der Ligand-Rezeptor-Interaktion auf das Rezeptor-Trafficking aus und beeinflusst somit auf diese Weise das ErbB-Signaling [Olayioye *et al.*, 2000]. EGF induziert beispielsweise die Degradierung des EGFR, während AREG, EREG und TGFA zu Rezeptor-Recycling führen [Roepstorff *et al.*, 2008 und 2009].

1.1.3 EGFR-Signaling

1.1.3.1 Die Aktivierung des EGFR

Die EGFR-Signaltransduktion beginnt mit der Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGFR. Diese lässt sich in vier Bereiche (I-IV) unterteilen: Die leucinreichen Domänen I und III (L1 und L2) sind für die Ligandenbindung verantwortlich. Domäne II und IV (CR1 und CR2) weisen cysteinreiche Regionen auf und interagieren miteinander in Rezeptormonomeren, die keinen Liganden gebunden haben. In dieser inaktiven Rezeptorkonformation ist der Dimerisierungsarm von Domäne II durch Interaktion mit Domäne IV verdeckt (siehe Abb. 1-2) [Lemmon, 2009; Ogiso *et al.*, 2002].

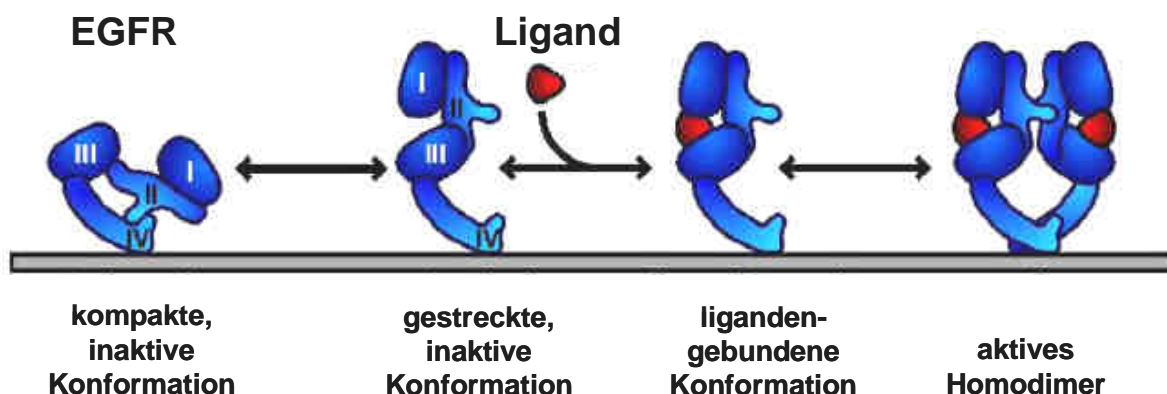


Abb. 1-2: Darstellung der Liganden-induzierten EGFR-Dimerisierung.

Die extrazelluläre Region des EGFR nimmt ohne Liganden eine kompakte, autoinhibierte Konformation an, in der Domäne II und IV miteinander interagieren. In der gestreckten Konformation ist der Dimerisierungsarm von Domäne II freigelegt, wodurch die extrazellulären EGFR-Regionen dimerisieren können. Die dimerisierungskompetente Konformation wird durch Bindung des Liganden stabilisiert. Dargestellt sind die kompakte, inaktive Konformation (links), das aktive Homodimer (rechts) und konzeptionelle Zwischenprodukte [verändert nach Schmitz und Ferguson, 2009].

Bei der Dimerisierung des EGFR werden zwei Rezeptormonomere durch die Interaktion ihrer Dimerisierungsarme zusammengeführt. Alle Kontakte der Monomere sind rezeptorvermittelt; der Ligand ist folglich nicht an den Kontaktstellen des Dimers beteiligt. Stattdessen interagiert der Ligand sowohl mit Domäne I als auch mit Domäne III eines Monomers und stabilisiert die gestreckte, dimerisierungskompetente Konformation. In dieser Konformation ist die Interaktion zwischen Domäne II und Domäne IV aufgebrochen und der Dimerisierungsarm freigelegt (siehe Abb. 1-2) [Burgess *et al.*, 2003; Lemmon, 2009].

1.1.3.2 Die Signaltransduktion des EGFR

Der EGFR leitet viele, miteinander vernetzte Signalwege ein, welche multiple zelluläre Antworten auslösen können, die zentrale Prozesse wie Differenzierung, Adhäsion, Wachstum, Migration und Apoptose steuern. Welche Signalwege aktiviert werden, ist stark kontextabhängig und wird auf der Ebene der Zellmembran unter anderem von den aktivierenden Liganden sowie den Dimerisierungspartnern beeinflusst (siehe Abb. 1-3).

Die Dimerisierung zweier EGFR-Monomere nach Ligandenbindung resultiert in der Zusammenführung und konsequenten Aktivierung der TK-Domänen [Zhang *et al.*, 2006]. Dies wiederum führt zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosin (Y)-Reste in der zytosolischen Domäne des EGFR. Die Phosphorylierung geschieht dabei durch die intrinsische TK-Aktivität (z.B. bei den Resten Y1045, Y1148, Y1173) oder c-Src (z.B. bei den Resten Y845, Y891, Y920, Y1101). Einige Y-Reste werden sowohl von c-Src als auch durch die intrinsische TK-Aktivität phosphoryliert (z.B. Y992, Y1068, Y1086) [Morandell *et al.*, 2008; Stover *et al.*, 1995].

Die Phosphorylierungsstellen des EGFR spielen bei der Diversität der Signaltransduktion eine große Rolle, da sie von unterschiedlichen Adaptorproteinen gebunden werden, die verschiedene Signalwege bedienen [Hynes *et al.*, 2001].

Zu den prominentesten Signalwegen des EGFR gehören der RAS-RAF-ERK- und der PI3K-AKT-Signalweg. Die Adaptorproteine Grb2 und Shc können durch Bindung an den EGFR den RAS-RAF-ERK-Signalweg einleiten. Dabei wurden Y1068 und Y1086 als EGFR-Bindestellen für Grb2 und Y1173 und Y1148 als EGFR-Bindestellen für Shc beschrieben [Olayioye *et al.*, 2000]. Die Bindung dieser Adaptorproteine an den EGFR bewirkt die Aktivierung von RAS (*Rat sarcoma*)-Proteinen, die eine Phosphorylierungskaskade induzieren. Diese führt zur Aktivierung von ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) und endet in der Regulierung von Transkriptionsprozessen, die mit Proliferation, Differenzierung, Überleben und Migration in Verbindung gebracht werden [Hill und Treisman, 1995; Liebmann, 2001].

Der PI3K-AKT-Signalweg wird durch Bindung der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) an die intrazelluläre Domäne von ErbB3 oder indirekt über Bindung von Gab1 an Y1148 und Y1173 des EGFR eingeleitet [Morandell *et al.*, 2008] und führt zur Aktivierung der Protein Serin/Threonin Kinase AKT (Proteinkinase B). Diese gilt als regulatorisches Protein für eine Vielfalt an wichtigen Zellfunktionen wie Glukosemetabolismus, Proliferation und Überleben von Zellen [Mattoon *et al.*, 2004; Vivanco und Sawyers, 2002;].

STAT (*Signal transducer and activator of transcription*)-Proteine binden die phosphorylierten Y1068 und Y1086 des EGFR. Die direkte Interaktion mit dem EGFR aktiviert STAT-Proteine [Shao *et al.*, 2003], was zur Bildung von STAT-Dimeren führt. Diese translozieren in den Kern, wo sie spezifische DNA-Abschnitte binden und dadurch die Transkription bestimmter Gene auslösen [Siavash *et al.*, 2004]. Die Proteinkinase C (PKC) führt zu Calcium-vermittelten Änderungen im Zytoskelett und zu Zelladhäsion und wird durch das Adaptorprotein Phospholipase C gamma (PLC γ) aktiviert, welches primär an Y1173 bindet [Patterson *et al.*, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 1999]. Die Bindung des Adaptorproteins Cbl an den EGFR wird mit der Regulierung der EGFR-Internalisierung und -Degradierung assoziiert [Levkowitz *et al.*, 1999]. Dabei bindet Cbl entweder direkt an Y1045 oder indirekt durch das Adaptorprotein Grb2, das den phosphorylierten EGFR an Y1068 und Y1086 bindet [Waterman *et al.*, 2002].

Die Dauer und die Intensität der EGFR-Signaltransduktion kann durch die Internalisierung des Rezeptors reguliert werden. Nach Internalisierung verschmelzen die endozytotischen Vesikel mit den frühen Endosomen, in denen sich entscheidet, ob der Rezeptor wieder an die Membranoberfläche gelangt oder in den Lysosomen degradiert wird [Roepstorff *et al.*, 2008]. Daneben kann der Rezeptor aber auch in den Nukleus transportiert werden [Wang *et al.*, 2010]. Dort kann der EGFR als Transkriptionsfaktor wirken und durch die Interaktion mit STAT3, STAT5 und E2F1 die Transkription von *Cyclin D1*, *B-Myb*, *iNOS* und *Aurora-A* regulieren [Hanada *et al.*, 2006; Hung *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2005].

Daneben wurde die EGFR-vermittelte Phosphorylierung des PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) beobachtet, welche in DNA-Replikation und -Reparatur resultierte [Wang *et al.*, 2006]. Ebenso wurde eine Rolle des nukleären EGFR in der DNA-Reparatur durch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) nach Bestrahlung von Zellen beschrieben [Dittmann *et al.*, 2005a].

Der EGFR ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, die mit Proliferation, Migration, Adhäsion, Apoptoseresistenz und Invasion von Zellen assoziiert sind. Fehlregulation der Rezeptorfunktion und/oder die Störung eines oder mehrerer EGFR-assoziiierter Prozesse kann deshalb in der Transformation von Zellen resultieren (siehe 1.2).

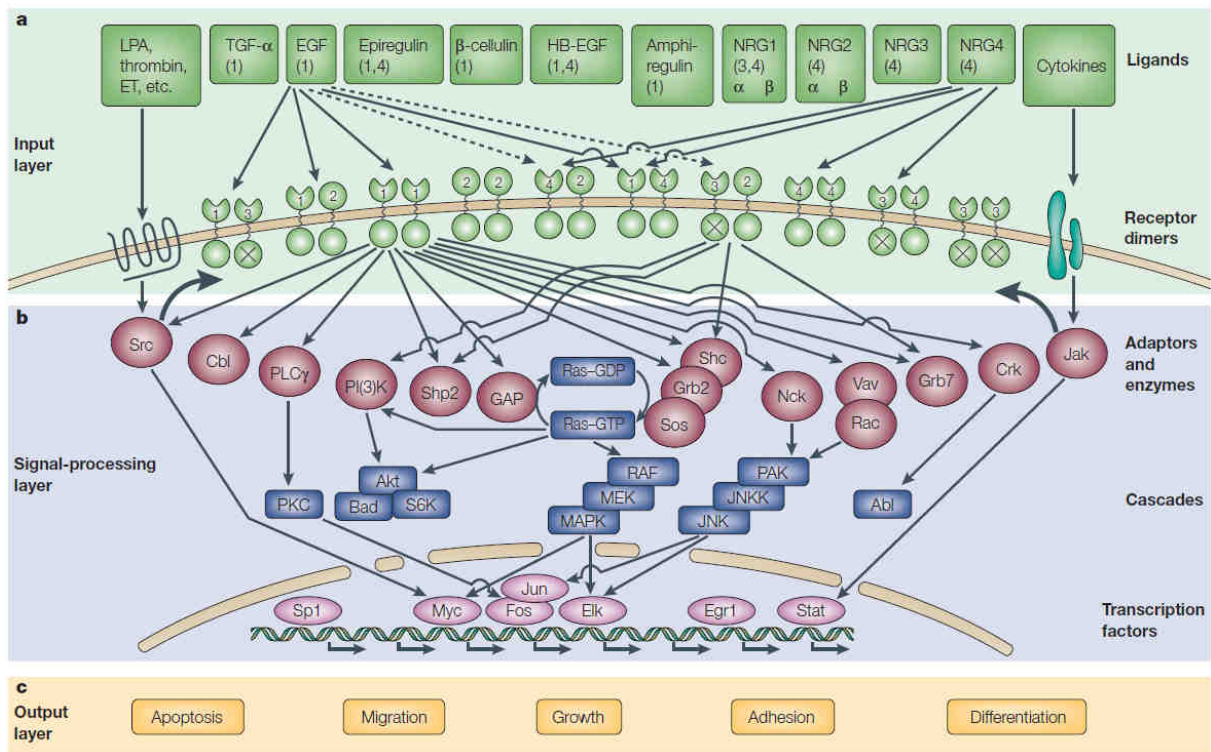


Abb. 1-3: Signalwege, die durch Aktivierung des EGFR induziert werden können.

(a) Signale werden an der Zelloberfläche eingeleitet (*input layer*), an der Ligand-Rezeptor-Interaktionen stattfinden und zur Rezeptordimerisierung und -aktivierung führen. Gezeigt sind hier die ErbB-Liganden und mögliche Kombinationen an Rezeptordimeren. Zahlen in den Ligandenblöcken verweisen auf den ErbB-Rezeptor, an den dieser Ligand hochaffin bindet. ErbB2 bindet keinen Liganden und ErbB3 ist katalytisch inaktiv. (b) Das Signal wird mit Hilfe eines komplexen Systems von Proteinen übertragen und amplifiziert (*signal-processing layer*). Die Signaltransduktion ist nur für ErbB1-Homodimere, ErbB2-ErbB3-Heterodimere und für einige zentrale Signalwege und Transkriptionsfaktoren gezeigt. (c) Der Prozess der Signaltransduktion führt zur Aktivierung bestimmter Gene im Nucleus (*output layer*), die zu wichtigen zellulären Prozessen, wie Differenzierung, Adhäsion, Wachstum, Migration und Apoptose führen [Yarden und Sliwkowski, 2001].

1.1.4 Die physiologische Rolle des EGFR und der Liganden

In den meisten fötalen und adulten Geweben sind die ErbB-Rezeptoren und deren Liganden exprimiert [Burgess, 2008].

Alle ErbB-Rezeptoren spielen eine Rolle in der Entwicklung des Fötus. Dabei reicht ihr Einfluss von der frühen Embryogenese bis hin zur Entwicklung des Zentralnervensystems, des Herzens und der Haut. Das Fehlen eines ErbB-Rezeptors oder mehrerer ErbB-Rezeptoren hat dramatische Auswirkungen auf den Organismus und führt bei homozygoten Mäusen meist zu letalen Defekten in frühen Entwicklungsphasen. EGFR-defiziente Mäuse sterben im Embryonalstadium oder kurz nach der Geburt aufgrund von neuralen Defekten und Fehlentwicklung in epithelialen Geweben [Citri und Yarden, 2006]. Die fehlende Expression von

ErbB2, ErbB3 oder ErbB4 führt in Mäusen zu neuronaler und myozytischer Fehlentwicklung [Burgess, 2008; Normanno *et al.*, 2006].

Mäuse, die einen ErbB-Liganden nicht exprimieren, haben weniger ausgeprägte Phänotypen als Mäuse, die defizient an ErbB-Rezeptoren sind. So konnte beim *Knockout* der Liganden EGF oder AREG kein signifikanter Phänotyp beobachtet werden [Luetteke *et al.*, 1999]. Dagegen wiesen Mäuse, die kein TGFA exprimierten, Augenabnormalitäten und fehlentwickelte Haarfollikel auf [Mann *et al.*, 1993]. *Knockout* der drei Liganden AREG, TGFA und HB-EGF führte zu krankhaften Veränderungen im Dünndarm [Troyer *et al.*, 2001]. Diese Beobachtungen zeigen, dass das Fehlen eines Liganden komplett oder teilweise kompensiert werden kann und somit eine funktionelle Redundanz zwischen den Liganden besteht [Citri und Yarden, 2006].

1.2 Die Rolle des EGFR im Tumorgeschehen

Der EGFR spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Tumoren. Zur malignen Transformation von Zellen kann es durch die Deregulierung der EGFR-Signaltransduktion kommen, welche zum einen durch Überexpression des EGFR oder seiner Liganden und zum anderen durch konstitutive Aktivierung des Rezeptors (durch Mutationen) geschehen kann [Harari *et al.*, 2007].

Sowohl die Überexpression des EGFR als auch autokrine oder parakrine Sekretion der EGFR-Liganden durch den Tumor selbst oder das umgebende Stroma kann zu verstärktem EGFR-Signaling führen [Salomon *et al.*, 1995]. In Tumorzellen wiederum kann dies in verstärkter Proliferation, Überleben, Angiogenese, Invasion und Metastasierung und somit in der Unabhängigkeit von äußeren Signalen aber auch in der Abhängigkeit vom EGFR-Signaling resultieren [Baselga, 2002; Oliveira *et al.*, 2006].

Die Überexpression des EGFR tritt bei einer Reihe von Tumoren auf, wie z.B. bei Tumoren von Kopf- und Hals (80-100%), Kolon (25-77%), Pankreas (30-50%) Niere (50-90%), Brust (14-91%), Ovarien (35-70%), Blase (31-48%), bei nichtkleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) (40-80%) und Gliomen (40-63%) [Herbst und Shin, 2002].

Mutationen im EGFR können eine weitere Ursache von dereguliertem EGFR-Signaling darstellen. Die häufigste Mutante, EGFRvIII, resultiert aus einer Deletion in der extrazellulären Domäne des EGFR. Diese EGFRvIII-Mutante liegt konstitutiv aktiv vor [Pedersen *et al.*, 2001]. Mutationen in der intrazellulären Kinasedomäne des EGFR kommen häufig in NSCLC vor und modulieren sowohl die Qualität des EGFR-Signaling als auch die Effektivität der EGFR-TK-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib [Irmer *et al.*, 2007].

1.3 Der EGFR als therapeutisches Target in der Onkologie

Hohe EGFR-Expressionslevel in Tumoren wurden mit aggressivem Krankheitsverlauf, schlechter Prognose und vermindertem Überleben der Patienten assoziiert [Baselga, 2002]. Die Tatsache, dass die Blockade des EGFR-Signalwegs durch EGFR-Inhibitoren in der Wachstumsinhibition von Tumoren *in vitro* und *in vivo* resultieren kann, führte zur Entwicklung von EGFR-Inhibitoren als Tumorthapeutika. Zu den zielgerichteten Therapeutika gegen den EGFR gehören monoklonale Antikörper (mAb) und TK-Inhibitoren (TKI) [Arteaga 2002; Ciardiello *et al.*, 2001]. Da in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf den Effekten von therapeutischen mAb lag, wird im Folgenden nur kurz auf die EGFR-TKI eingegangen.

1.3.1 EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI)

TKI, die gegen den EGFR gerichtet sind, binden an die intrazelluläre ATP-bindende Domäne des Rezeptors und inhibieren so dessen Autophosphorylierung und die konsequente Signalweiterleitung. Zu den anti-tumoralen Effekten der EGFR-TKI gehören reduzierte Proliferation, verringerte Tumorangiogenese und Induktion von Apoptose [Siegel-Lakhai *et al.*, 2005]. Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts können TKI Tumore infiltrieren und effektiv in Zellen eindringen [Irmer, 2008]. Zu den bekanntesten TKI, die bereits in der Klinik Anwendung finden, gehören Erlotinib (Tarceva® von Roche Registration Ltd.) und Gefitinib (Iressa® von AstraZeneca AB), die den EGFR reversibel binden [De Bono und Rowinsky, 2002; Laskin und Sandler, 2004].

Gefitinib wird bei Patienten angewandt, die an fortgeschrittenem oder metastasierendem NSCLC leiden, und deren Tumor aktivierende Mutationen in der EGFR-TK aufweist [European Medicines Agency (1)]. Ebenso wird Erlotinib als Erstlinien-Monotherapie bei fortgeschrittenem NSCLC mit aktivierenden EGFR-Mutationen verabreicht [European Medicines Agency (2)].

1.3.2 Monoklonale Antikörper (mAb) gegen den EGFR

Im Gegensatz zu TKI binden mAb die extrazelluläre Domäne des EGFR. Zwar ist auch hier wie bei den TKI der direkte Wirkmechanismus die Inhibition der Signalweiterleitung, allerdings wurden zusätzliche Effekte durch die Behandlung von Tumorzellen mit mAb beobachtet. Diese beinhalten die Internalisierung des EGFR [Oliveira *et al.*, 2006] und die Interaktion

mit Immunzellen [Mellstedt, 2003], welche zusätzlich zur anti-tumoralen Wirkung der Antikörper beitragen (siehe 1.3.2.1). Außerdem unterscheiden sich die mAb von den TKI durch eine längere Verweildauer im Organismus und eine geringere Toxizität [Irmer, 2008].

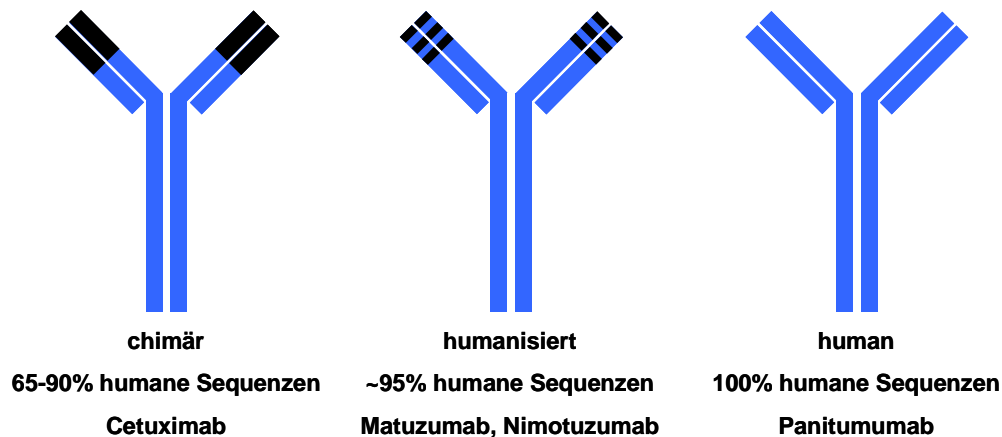


Abb. 1-4: Vergleich der Antikörpervarianten.

Gezeigt sind modifizierte Antikörper für die therapeutische Anwendung. Einige therapeutische Antikörper sind stellvertretend für die jeweilige Variante genannt. Blaue Balken: humane Sequenzen; schwarze Balken: murine Sequenzen [verändert nach Saif, 2010].

Der klinische Einsatz von mAb wurde erst durch die Konversion der bisher rein murinen in chimäre, humanisierte und humane mAb ermöglicht (siehe Abb. 1-4). Bei chimären Antikörpern ist die variable Region murinen Ursprungs, während die konstante Region durch eine humane IgG-Sequenz ersetzt wurde. Humanisierte mAb haben murine Antigenbindestellen; der restliche Antikörper besteht aus humanen IgG-Sequenzen. Humane mAb bilden sich aus 100% humanen Sequenzen [Carter, 2001; Chung und Saltz, 2005].

Im Folgenden werden die vier therapeutischen anti-EGFR Antikörper Cetuximab, Matuzumab, Panitumumab und Nimotuzumab, welche in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen, beschrieben.

1.3.2.1 Cetuximab

Durch Immunisierung von Mäusen mit A431-Zellen wurde der murine mAb 225 generiert, der dann zu dem chimären Antikörper Cetuximab (C225, Erbitux® von ImClone Systems, Bristol-Myers Squibb, Merck KGaA) modifiziert wurde [Cunningham, 2004; Gill *et al.*, 1984]. Cetuximab ist ein IgG1-Antikörper, der an die EGFR-Domäne III bindet und so sterisch mit

der aktiven Konformation des EGFR interferiert. Außerdem blockiert Cetuximab die Bindung der EGFR-Liganden an den Rezeptor, indem er mit einer höheren Affinität als die natürlichen Liganden an den Rezeptor bindet [Goldstein *et al.*, 1995]. Des Weiteren kann Cetuximab die Internalisierung und Degradierung des Rezeptors induzieren, wodurch es zu einer verminderten EGFR-Oberflächenexpression kommt [Feng *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2003]. Diese Wirkmechanismen resultieren in einer effektiven Blockade der EGFR-Signaltransduktion, was zu einer Inhibition EGFR-vermittelter Prozesse im Tumorgeschehen wie Zellzyklusprogression, Apoptoseresistenz, Angiogenese, Invasivität und Metastasierung führt [Quatralo *et al.*, 2011].

Als Auswirkung der Cetuximab-Behandlung auf Tumorzellen wurde die Induktion des Zellzyklusarrests in der G1-Phase beobachtet [Harari *et al.*, 2007; Raben *et al.*, 2005; Vincenzi *et al.*, 2008]. Blockade des EGFR durch Cetuximab kann zur Aktivierung von proapoptischen oder Inhibition von anti-apoptischen Signalwegen und dadurch zur Induktion von Apoptose führen [Harari *et al.*, 2007; Huether *et al.*, 2005].

In präklinischen *in vitro* und *in vivo* Modellen konnte gezeigt werden, dass Cetuximab das Tumorstadium durch die Inhibition von Angiogenese verhindert. Cetuximab-Behandlung resultierte in einer reduzierten Expression und Sekretion von angiogenen Faktoren wie VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) und IL-8 (Interleukin-8) *in vitro* und *in vivo*, was zu einer verringerten Dichte an Blutgefäßen in *in vivo* Modellen und somit in reduziertem Tumorstadium resultierte [Huang *et al.*, 2002; Moehler *et al.*, 2008; Perrotte *et al.*, 1999]. Des Weiteren konnte die Migration und Invasivität *in vitro* und Invasivität und Metastasierung *in vivo* durch Behandlung mit Cetuximab in vielen Tumormodellen inhibiert werden. Es wurde gezeigt, dass Cetuximab die Expression und Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen, die bei Migration und Invasivität eine wichtige Rolle spielen, *in vitro* und *in vivo* inhibiert [Huang *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2009].

Cetuximab kann in Kombination mit Chemotherapie oder Bestrahlung additive/synergistische anti-tumorale Effekte auslösen und Tumorzellen zugänglicher für DNA-schädigende Therapien machen. Cetuximab-vermittelte Prozesse wie die Induktion der Apoptose und Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase können die Sensitivität der Zelle gegen DNA-schädigende Therapien beeinflussen [Vincenzi *et al.*, 2008]. Außerdem inhibiert Cetuximab die nukleäre Translokation des EGFR (siehe 1.1.3.2) und blockiert so EGFR-abhängige DNA-Reparaturmechanismen [Dittmann *et al.*, 2005b und 2010].

Die eben beschriebenen, Cetuximab-vermittelten Effekte sind Folge der direkten Inhibition der EGFR-Signaltransduktion in der Tumorzelle. Neben diesem direkten Wirkmechanismus kann Cetuximab durch die Aktivierung immunologischer Prozesse auch indirekt auf die Zerstörung der Tumorzelle wirken. Bei der sogenannten Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) bindet der Fc-Teil des Antikörpers an Fc- γ Rezeptoren von

Immuneffektorzellen, was der Immunzelle signalisiert, in der Zielzelle Apoptose zu induzieren [Bergmann, 2007; Kurai *et al.*, 2007; Naramura *et al.*, 1993].

Die Wirksamkeit von Cetuximab gegen eine Reihe unterschiedlicher Karzinome wie z.B. metastasierende Kolorektaltumore (mCRC) und Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals (*Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck*, SCCHN) konnte in verschiedenen klinischen Studien gezeigt werden [Capdevila *et al.*, 2009]. Als typische Nebenwirkung der Cetuximab-Therapie wurden häufig Hautreaktionen in Form von akneähnlichem Ausschlag beobachtet, die mit Ansprechen auf die Therapie korreliert werden konnten [Capdevila *et al.*, 2009]. Weiterhin wurden in einer Reihe unabhängiger Studien aktivierende Mutationen in dem *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)-Gen in mCRC mit Resistenz gegen Cetuximab assoziiert [Baker *et al.*, 2011; Khambata-Ford *et al.*, 2007; Saridaki *et al.*, 2011]. Cetuximab wurde von der *European Medicines Agency* (EMA) für mCRC-Patienten zugelassen, deren Tumore EGFR exprimieren und unmutiertes (Wildtyp) *KRAS* besitzen. Cetuximab wird verabreicht (1) in Kombination mit Chemotherapie oder (2) als Monotherapie, wenn die vorherige Irinotecan- oder Oxaliplatin-basierte Behandlung fehlgeschlagen und der Patient Irinotecan-intolerant ist [European Medicines Agency (3)].

Des Weiteren ist Cetuximab für Patienten mit SCCHN zugelassen. Cetuximab wird verabreicht (1) in Kombination mit Bestrahlung, wenn der Tumor lokal begrenzt vorkommt oder (2) in Kombination mit Platinumbasierter Chemotherapie bei rezidiven oder metastasierenden Tumoren [European Medicines Agency (3)].

1.3.2.2 Panitumumab

Panitumumab (ABX-EGF, VectibixTM von Amgen Europe B.V.) wurde durch Immunisierung von transgenen Mäusen generiert, die humane Antikörper exprimieren [Lonberg, 2005]. Panitumumab ist ein IgG2-Antikörper, der ebenso wie Cetuximab an Domäne III des EGFR bindet und die Bindung von Liganden an den Rezeptor blockiert [Quatralo *et al.*, 2011]. In Xenograft-Modellen konnte gezeigt werden, dass Panitumumab gegen humane solide Tumore von verschiedenen Geweben wie Brust, Pankreas, Prostata und Niere aktiv ist [Yang *et al.*, 2001]. Die Effekte von Panitumumab auf Zellen sind vergleichbar mit denen, die Cetuximab auslöst und betreffen die Rezeptorinternalisierung, die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose sowie die Inhibition der Angiogenese [Foon *et al.*, 2004].

Verschiedene Phase II Studien, in denen Chemotherapie-refraktäre CRC-Patienten mit Panitumumab in Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie behandelt wurden, zeigten neben der Aktivität und Verträglichkeit der Therapie eine Beziehung zwischen der Schwere des Hautausschlags und dem Überleben der Patienten [Martinelli *et al.*, 2009].

Ebenso wie bei Cetuximab wurden Mutationen in dem *KRAS*-Gen mit der Ansprechrate auf Panitumumab-Therapie in Verbindung gebracht. Ansprechen auf Panitumumab-Monotherapie und eine Erhöhung des progressionsfreien Überlebens war nur bei Patienten zu sehen, deren Tumore unmutiertes *KRAS* exprimierten. Tumore mit mutiertem *KRAS* sprachen nicht an [Martineli *et al.*, 2009].

Die EMA hat Panitumumab als Monotherapie von mCRC-Patienten zugelassen, deren Tumore EGFR und unmutiertes *KRAS* exprimieren, und bei denen anti-tumorale Therapien, die Fluoropyrimidin, Oxaliplatin oder Irinotecan beinhalten, nicht mehr wirken [European Medicines Agency (4)].

1.3.2.3 Matuzumab

Matuzumab (EMD72000) ist die humanisierte Form des murinen mAb 425 (EMD55900), der durch Immunisierung von Mäusen mit humanen A431 Zellen generiert wurde [Murthy *et al.*, 1987; Kettleborough *et al.*, 1991]. Matuzumab ist ein IgG1-Antikörper, der ein Epitop der Domäne III des EGFR bindet, das weder mit der Ligandenbindestelle noch mit dem Epitop, welches von Cetuximab gebunden wird, überlappt. Die Bindung von Matuzumab bewirkt deshalb auch einen anderen Mechanismus der Rezeptorblockade als Cetuximab: die Ligandenbindung an den Rezeptor wird nicht verhindert, sondern die für die Dimerisierung notwendige Konformationsänderung des Rezeptors wird sterisch blockiert [Schmiedel *et al.*, 2008]. Bezüglich der Affinität von Matuzumab, den EGFR zu binden, gibt es unterschiedliche Daten: Während Biacore-Untersuchungen darauf hinweisen, dass die Affinität von Matuzumab etwa 10-fach geringer ist als die von Cetuximab und Panitumumab [Alvarenga, 2010], zeigen Bindungsstudien an A431-Zellen, dass die mAb Matuzumab, Cetuximab und Panitumumab den EGFR mit ähnlicher Affinität binden [Stroh *et al.*, 2010].

In präklinischen Xenograft-Modellen konnte die anti-tumorale Aktivität von Matuzumab in Kombination mit Chemotherapie auf unterschiedliche humane Tumore in Mäusen gezeigt werden. Die Anwendung von Matuzumab führte zu einer Inhibition der Migration und Proliferation und zur Induktion von Apoptose *in vitro* ebenso wie zur Inhibition des Tumorwachstums und der Metastasierung *in vivo* [Kleespies *et al.*, 2008, Yoshida *et al.*, 2008]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Matuzumab ebenso wie Cetuximab ADCC vermitteln kann [Bier, *et al.*, 1998].

Klinische Phase II Studien wurden mit Matuzumab in Kombination mit Chemotherapie in Karzinomen von Magen und Speiseröhre und fortgeschrittenem NSCLC durchgeführt [www.clinicaltrials.gov].

1.3.2.4 Nimotuzumab

Nimotuzumab (TheraCIM®, h-R3 von YM Biosciences) ist ein humanisierter IgG1-Antikörper, der an ein Epitop in Domäne III des EGFR bindet, welches mit der Bindestelle von Cetuximab überlappt. Die Bindung von EGF wird somit blockiert, allerdings erlaubt die Bindung von Nimotuzumab weiterhin die aktive Konformation des Rezeptors [Talavera *et al.*, 2009]. Die Affinität von Nimotuzumab, den EGFR zu binden, ist im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab 20-fach geringer [Alvarenga, 2010]. Die anti-tumoralen Effekte von Nimotuzumab *in vitro* wurden mit anti-proliferativer, anti-angiogener und pro-apoptotischer Aktivität assoziiert [Crombet-Ramos *et al.*, 2002].

Nimotuzumab wurde in verschiedenen nicht-europäischen Ländern für die Behandlung von SCCHN und Gliomen zugelassen. Der Antikörper erhielt von der EMA *Orphan-Drug-Status* für die Behandlung von Gliomen und Pankreastumoren [European Medicines Agency (5); Ramakrishnan *et al.*, 2009].

1.3.3 Biomarker für therapeutische anti-EGFR Antikörper

Die Identifizierung und Selektion von Patienten, die von therapeutischen anti-EGFR Antikörpern den größten Nutzen ziehen, ist in der klinischen Anwendung dieser Therapeutika von zentraler Bedeutung. In vielen klinischen Studien wurden potenzielle prädiktive Biomarker identifiziert, die die anti-tumorale Aktivität von anti-EGFR Therapien vorhersagen können.

Ein zentraler Wirkmechanismus der anti-EGFR Antikörper ist die effektive Inhibition der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in Tumorzellen. Diese Inhibition resultiert in der Verringerung der Proliferation, Invasivität und Metastasierung, der Induktion von Apoptose, der Inhibition von Angiogenese sowie von DNA-Reparaturmechanismen. Um diese Effekte zu erreichen, ist die Abhängigkeit eines Tumors vom EGFR-*Signaling* eine wichtige Voraussetzung [Weinstein und Joe, 2008]. Zentrale Faktoren, die die Abhängigkeit der Tumorzellen vom EGFR-*Signaling* beeinflussen, sind z.B. (1) hohe EGFR-Expressionslevel, (2) autokrine/parakrine stimulierende EGFR-Liganden/EGFR-Signalwege und (3) genetische Veränderungen in *downstream* Komponenten des EGFR-Signalwegs, die direkt oder indirekt das EGFR-*Signaling* modulieren.

Die ersten beiden Faktoren wurden mit Aktivität von anti-EGFR Antikörpern korreliert und deuten auf die aktive Nutzung des EGFR durch die Tumorzelle hin. Dagegen können genetische Veränderungen in Komponenten (wie Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen) der EGFR-aktivierten Signalwege die Abhängigkeit des Tumors von dem EGFR verringern und

sind oft mit Resistenz gegen therapeutische anti-EGFR Antikörper assoziiert [Sartore-Bianchi *et al.*, 2010; Siena *et al.*, 2009].

Der jeweilige Einfluss dieser Faktoren ist stark kontextabhängig. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, ist der EGFR Teil eines sehr komplexen Netzwerks, das aus verschiedenen ErbB-Rezeptoren und -Liganden besteht und verschiedene Signalwege aktiviert (siehe 1.1.1 - 1.1.3). Je nach Tumorart können unterschiedliche Komponenten des einen oder anderen Signalwegs verändert sein [Axelsen *et al.*, 2007; Hopper-Borge *et al.*, 2009]. Ebenso kann die Expression verschiedener Komponenten des EGFR-Signalwegs variieren. Somit ist die Funktion des EGFR-*Signaling* von Indikation zu Indikation unterschiedlich.

Beispiele aus der Klinik für die oben angeführten Faktoren, die die Abhängigkeit eines Tumors vom EGFR beeinflussen können, sind das Proto-Onkogen *KRAS* sowie die EGFR-Liganden *AREG* und *EREG*. Der Mutationsstatus von *KRAS* konnte in mCRC-Patienten mit der klinischen Effektivität von Cetuximab- oder Panitumumab-Behandlung assoziiert werden (siehe 1.3.3.3). *KRAS* ist als prädiktiver Biomarker validiert und findet in der klinischen Praxis Anwendung für die Selektion von mCRC-Patienten zur Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab.

Ebenso konnten hohe tumorale mRNA-Level an *AREG* und *EREG* in mCRC mit der Effektivität von Cetuximab und Panitumumab korreliert werden (siehe 1.3.3.2). Durch die Bestimmung des Expressionsniveaus von *AREG* und *EREG* könnten in Zukunft mCRC-Patienten identifiziert werden, die von der Therapie mit anti-EGFR Antikörpern bestmöglich profitieren. Neben diesen Biomarkern, deren prädiktiver Charakter für therapeutische anti-EGFR Antikörper in mCRC bereits in kontrollierten Studien gezeigt wurde, wird derzeit eine Vielzahl an weiteren Biomarkerkandidaten für therapeutische anti-EGFR Antikörper diskutiert, die in klinischen Studien in mCRC und anderen Indikationen identifiziert wurden. Dazu gehören hohe Proteinexpressionslevel des EGFR, die Erhöhung der *EGFR gene copy number* (GCN), EGFR-Polymorphismen, die relative Expression von anderen Mitgliedern der ErbB-Rezeptoren sowie Mutationen von weiteren Komponenten des EGFR-Signalwegs [Kruser und Wheeler, 2010; Hopper-Borge *et al.*, 2009].

In den meisten Fällen wurden prädiktive Biomarkerkandidaten für anti-EGFR Therapien durch eine Assoziation von Biomarkerstatus und klinischer Aktivität identifiziert. Auch wenn für viele der Kandidaten eine biologische Rationale existiert (wie z.B. durch ihre direkte oder indirekte Beteiligung an der EGFR-Signaltransduktion), so sind die molekularen Mechanismen, durch die Resistenz oder Sensitivität vermittelt werden, jedoch größtenteils unverstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden zugrundeliegende Mechanismen für die folgenden prädiktiven Biomarkerkandidaten untersucht: der EGFR-Polymorphismus R521K, die EGFR-

Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG, ErbB3 und verschiedene KRAS-Mutationen. Sie sind im Folgenden beschrieben.

1.3.3.1 Der EGFR-Polymorphismus R521K

Ausgehend von der Beobachtung, dass EGF und TGFA in den meisten Zellen ähnliche Effekte ausüben, aber auf die humane Magenkrebszelllinie T₃M₄ unterschiedliche Wirkung bezüglich Proliferation und EGFR-Internalisierung haben, untersuchten Moriai *et al.* (1993) die Nukleotidsequenz des *EGFR* der Zelllinie T₃M₄. Dies führte zu der Entdeckung eines neuen EGFR-Polymorphismus, bei dem in Exon 13 in Codon 521 (in manchen Quellen auch Codon 497) ein einzelnes Nukleotid ersetzt wird (142285G>A). Dadurch kommt es in der extrazellulären Domäne IV des EGFR zu einem Aminosäureaustausch von Arginin (R) zu Lysin (K).

Zur Charakterisierung dieses EGFR-Polymorphismus generierte die Arbeitsgruppe um Moriai CHO-Zellen, die stabil die humane EGFR-Variante 521K oder 521R exprimierten und behandelten sie mit EGF und TGFA. Dabei konnten Unterschiede zwischen den EGFR-Varianten bezüglich der Bindung und Dissoziation von TGFA festgestellt werden. Während bei EGFR 521R ähnliche hoch- und geringaffine Bindestellen für EGF und TGFA entdeckt wurden, zeigten sich bei EGFR 521K nur für EGF ähnliche hoch- und geringaffine Bindestellen; für TGFA konnten keine hochaffinen Bindestellen gefunden werden. Ebenso konnte für die EGFR-Variante 521K eine stärkere Dissoziation von TGFA unter basischen Bedingungen festgestellt werden. EGFR 521K exprimierende Zellen zeigten im Vergleich zu EGFR 521R exprimierenden Zellen unter EGF- oder TGFA-Behandlung eine reduzierte Proliferation und eine geringere Induktion der Proto-Onkogene *Myc*, *Fos* und *Jun*. Des Weiteren hatten hohe Konzentrationen an TGFA (5 nM) einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum der mit EGFR 521K transfizierten Zellen [Moriai *et al.*, 1994].

Seit der Entdeckung des Polymorphismus häufen sich klinische Studien, in denen dieser Polymorphismus als prognostischer und prädiktiver Marker untersucht wurde.

Die EGFR-Variante 521K wurde sowohl in NSCLC-Patienten mit befallenen Lymphknoten [Sasaki *et al.*, 2009] als auch in mCRC-Patienten als prognostischer Marker beschrieben: So zeigten Patienten, die an mCRC erkrankt waren und die EGFR-Variante 521K exprimierten, reduzierte Tumorinvasion, geringere Metastasierung und längeres krankheitsfreies und Gesamtüberleben. Tumore dieser Patienten fielen auch durch eine reduzierte EGFR-Phosphorylierung und geringere c-Myc Aktivierung auf [Wang *et al.*, 2007].

Interessanterweise scheint auch das Geschlecht der Patienten eine Rolle zu spielen: Frauen, die an mCRC erkrankt waren und deren Tumore die EGFR-Variante 521R exprimierten, hatten ein erhöhtes Gesamtüberleben, wohingegen bei Männern ein höheres Gesamtüberleben festgestellt werden konnte, wenn sie EGFR 521R/521K oder EGFR 521K in ihren Tumorzellen exprimierten [Press *et al.*, 2008].

In mehreren Studien wurde der Einfluss des EGFR-Polymorphismus R521K auf das Ansprechen von NSCLC-Patienten auf Gefitinib untersucht. Dabei konnte keine signifikante Assoziation zwischen dem EGFR-Polymorphismus R521K und dem Ansprechen auf Gefitinib in Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC festgestellt werden [Ma *et al.*, 2009].

Gegensätzliche Daten existieren für mCRC im Hinblick auf den Behandlungserfolg mit Cetuximab und dem Auftreten des Polymorphismus. So beschreiben Goncalves *et al.* (2008), dass die Therapie von mCRC-Patienten mit Cetuximab plus Irinotecan ein höheres progressionsfreies Überleben sowie ein höheres Gesamtüberleben erzielt, wenn die Patienten die EGFR-Variante 521K exprimieren. Im Gegensatz dazu konnte erhöhtes progressionsfreies Überleben signifikant mit der Expression der EGFR-Variante 521R in Patienten assoziiert werden, die refraktär für Chemotherapie waren und mit Cetuximab-Monotherapie behandelt wurden [Lurje *et al.*, 2008].

Ebenso scheint sich die Expression des EGFR 521R bei SCCHN unter Cetuximab plus Docetaxel Behandlung positiv auf das progressionsfreie Überleben auszuwirken. Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen der Expression dieser EGFR-Variante und stärkerem Hautausschlag als Reaktion auf die Therapie diskutiert [Klinghammer *et al.*, 2010].

1.3.3.2 Die Expression der EGFR-Liganden

Eine überdurchschnittliche Expression von autokrinen stimulierenden EGFR-Liganden deutet auf einen aktiven Gebrauch des EGFR und somit auf Abhängigkeit des Tumors vom EGFR-Signaling hin.

In einigen *in vitro* Modellen wurde gezeigt, dass die Expression der EGFR-Liganden die Sensitivität der Zelllinien gegen Cetuximab modulieren kann [Karnes *et al.*, 1992; Yonesaka *et al.*, 2008]. Diese präklinischen Beobachtungen konnten in klinischen Untersuchungen bestätigt werden: Erhöhte mRNA-Level an *AREG* und *EREG* in mCRC-Tumoren wurden mit Sensitivität gegen Cetuximab-basierte Therapie korreliert [Baker *et al.*, 2011; Khambata-Ford *et al.*, 2007]. Diese Assoziation wurde vor allem in Patienten gesehen, deren Tumore KRAS Wildtyp exprimierten; hier konnte die Überexpression von *AREG*- und *EREG*-mRNA mit erhöhtem Gesamtüberleben korreliert werden [Jacobs *et al.*, 2009; Saridaki *et al.*, 2011]. Die Frage, weshalb in mCRC nur *AREG* und *EREG* diesen Effekt vermitteln und nicht auch andere EGFR-Liganden, blieb bisher ungeklärt.

1.3.3.3 Der KRAS-Mutationsstatus

Präklinische *in vitro* Befunde weisen darauf hin, dass die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Cetuximab-Behandlung davon abhängt, wie effektiv die Inhibition der Signalwege RAS-RAF-ERK und PI3K-AKT ausfällt [Amann *et al.*, 2005; Janmaat *et al.*, 2003]. Beide Signalwege spielen bei der EGFR-vermittelten Signaltransduktion eine wichtige Rolle (siehe 1.1.3.2). In vielen Tumoren sind Komponenten des einen oder anderen Signalwegs mutiert, was zur konstitutiven Aktivierung des Signalwegs unabhängig von der EGFR-Aktivierung und als Konsequenz zu erhöhter Resistenz gegen anti-EGFR Therapien führen kann [Sartore-Bianchi *et al.*, 2010].

Ein zentrales Protein in der EGFR-Signalkaskade ist das monomere kleine G-Protein KRAS. In Tumoren führt dessen Aktivierung durch den EGFR zu erhöhter Proliferation und Überleben der Zelle und zu erhöhter Produktion von pro-angiogenen Faktoren [Roberts und Der, 2007; Shelton *et al.*, 2005]. Mutationen des *KRAS*-Gens kommen gehäuft in Codon 12, 13 und 61 vor und resultieren in der konstitutiven Aktivierung des Proteins [Kranenburg, 2005]. In mCRC-Patienten konnte der KRAS-Mutationsstatus mit der klinischen Effektivität von Cetuximab- oder Panitumumab-Behandlung assoziiert werden. Patienten, deren Tumore KRAS Wildtyp exprimieren, haben einen signifikant größeren Nutzen von anti-EGFR Therapien als solche, deren *KRAS*-Gen mutiert ist [Amado *et al.*, 2008; Benvenuti *et al.*, 2007; Bokemeyer *et al.*, 2009; Di Fiore *et al.*, 2007; Lievre *et al.*, 2006; Van Cutsem *et al.*, 2009]. Dagegen wurde in NSCLC keine Assoziation zwischen dem KRAS-Mutationsstatus und der Cetuximab-Effektivität gefunden [Khambata-Ford *et al.*, 2010; O'Byrne *et al.*, 2011]. Dies unterstützt die Vermutung, dass der prädiktive Einfluss eines Biomarkers von der zugrundeliegenden Tumorbilogie abhängig ist und somit nicht zwangsläufig von einer Indikation auf eine andere übertragen werden kann.

1.3.3.4 Die Expression von ErbB3

Im Tumorgeschehen kommt dem PI3K-AKT-Signalweg eine zentrale Bedeutung zu: Beispielsweise wurde dessen Aktivierung mit dem Überleben von Tumorzellen in Verbindung gebracht. Der PI3K-AKT-Signalweg wird durch Aktivierung der PI3K eingeleitet. Dies kann indirekt über EGFR und ErbB2 oder direkt über ErbB3 und ErbB4 erfolgen [Baselga und Swain, 2009].

Da ErbB3 eine defiziente Kinaseaktivität hat, findet Signalweiterleitung nur in Heterodimeren statt. ErbB2/ErbB3-Heterodimere können neben dem MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg, der durch ErbB2 bedient wird, auch den PI3K/AKT-Signalweg durch Bindung von PI3K an ErbB3 einleiten. Diese Signalwege führen zu Proliferation und

Überlebenssignalen, und die Anwesenheit von ErbB2/ErbB3-Heterodimeren in Tumoren wurde mit schlechter Prognose assoziiert [Citri *et al.*, 2003; Friedländer *et al.*, 2008]. Ebenso kann durch Dimerisierung von ErbB3 und EGFR der PI3K/AKT-Signalweg eingeleitet werden [Kruser und Wheeler, 2010].

Resistenz von Tumorzellen gegen EGFR- oder ErbB2-TKI wurde in Zusammenhang mit ErbB3-Expression und PI3K-AKT-Signaling gebracht [Engelman *et al.*, 2007; Hamburger, 2008; Sergina *et al.*, 2007]. Ebenso könnte ErbB3 Resistenz gegen Cetuximab vermitteln [Baselga und Swain, 2009] und somit einen negativen Biomarker für die Therapie mit anti-EGFR Antikörpern darstellen.

1.4 Ziel der Arbeit

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) spielt bei Proliferation, Differenzierung und Überleben von normalen und malignen Zellen eine wichtige Rolle [Shelton *et al.*, 2005]. Therapeutische anti-EGFR Antikörper inhibieren die Ligandenbindung an den EGFR und somit dessen Aktivierung. Dabei ist das Ansprechen auf therapeutische Antikörper vom Expressionsstatus des EGFR und seiner Liganden oder von weiteren Biomarkern abhängig, die in der EGFR-Signaltransduktion eine Rolle spielen [Bardelli und Siena, 2010].

In dieser Arbeit wurden Einfluss und Mechanismen folgender potentieller Biomarker bezüglich des Ansprechens auf die therapeutischen Antikörper Cetuximab, Matuzumab, Panitumumab und Nimotuzumab *in vitro* untersucht: (1) die EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG, EREG, (2) der EGFR-Polymorphismus R521K, (3) ErbB3 und (4) KRAS.

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Effekte der EGFR-Liganden auf Proliferation, EGFR-Signaltransduktion und Genexpression sowie den Einfluss der EGFR-Liganden auf die Wirksamkeit der therapeutischen Antikörper zu charakterisieren. Dies wurde im Zusammenhang mit dem EGFR-Polymorphismus R521K untersucht, indem NIH3T3-Zellen stabil mit humanem EGFR 521R oder humanem EGFR 521K transfiziert und mit humanen EGFR-Liganden und den therapeutischen anti-EGFR Antikörpern behandelt wurden.

Ein weiteres Ziel war es, den Effekt von ErbB3 auf das Ansprechen von Tumorzellen auf EGFR-Liganden und therapeutische anti-EGFR Antikörper zu erforschen. Dazu wurden CHO-Zellen, die stabil humanen EGFR oder humanen EGFR und humanen ErbB3 exprimierten, mit humanen EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt.

Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener KRAS-Mutationen auf die Ligandenvermittelte EGFR-Signaltransduktion und die Proliferation unter Cetuximab- und Oxaliplatin-Behandlung untersucht. Hierzu wurde ein isogenes Zellsystem (SW48-Zellen), das in einem genetisch definierten Hintergrund verschiedene KRAS-Mutationen exprimiert, verwendet.

2. Material

2.1 Laborgeräte

Axioskop 2 mot plus Mikroskop	Zeiss
Axiovert 25 Invers-Durchlichtmikroskop	Zeiss
Bio-Plex™ 200 System	BioRad
Einkanalpipetten	Eppendorf
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Kleinschüttler: VF2	IKA-Labortechnik
Labor pH-Meter pH 211	Hanna
Magnetrührer (MR3001K)	Heidolph
Mikrowelle	NEFF
Mehrkanalpipetten	Thermo Labsystems
Multipette	Eppendorf
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Zeiss
PCR-Gerät GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Pipettierhilfe, PIPETBOY	Integra Biochiences
Plattenlesegerät Mithras LB 940	Berthold Technologies
Plattenlesegerät Infinite M200	Tecan
Power Supply für SDS-PAGE und Blotting, PowerPac HC	BioRad
Power Supply für Agarosegelelektrophorese	Amersham pharmacia biotech
Präzisionswaage: LP 1200S	Sartorius AG Göttingen
Schüttel-Inkubator „Innova 4000“	New Brunswick
SDS-PAGE Kammern Criterion	BioRad
SONOPLUS Ultraschall-Homogenisator HD 2070	Bandelin
Thermomixer comfort	Eppendorf
UV-Dokumentationssystem	Syngene
VersaDoc™ Imaging System, Modell 5000	BioRad
Western Blot Transferkammer „Criterion Blotter“	BioRad
Zellkultur-Inkubator	Heraeus
Zentrifuge (RC5C)	Sorvall Instruments
Zentrifuge (Omnifuge 2.0RS)	Heraeus Septatech
Zentrifuge (5417R)	Eppendorf

2.2 Software

Adobe Reader 9	Adobe
CellQuest™	Becton Dickinson
GeneSnap™	Syngene
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
i-control 1.5	Tecan
IPA Software	Ingenuity Systems
Lasergene: EditSeq™, SeqMan™	DNASTAR
Luminex 100 IS	Luminex
MicroWin 2000™	Berthold
Microsoft Office 2003 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
NanoDrop™ ND-1000 3.1.2	PEQLAB
Quantity One 4.5.0	BioRad

2.3 Kits

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
BCA Protein Assay	Pierce
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
human amphiregulin ELISA Kit	RayBiotech
human EGF ELISA Kit	RayBiotech
human TGF-alpha ELISA Kit	RayBiotech
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Wizard Plus SV Minipreps "DNA Purification Kit"	Promega
WideScreen® BeadPlex® Assays	EMD Millipore
EGFR Capture Beads (10x)	
HER-3 Capture Beads (10x)	
Human Receptor Tyrosine Kinase (RTK) 10-plex	
Human Receptor Phospho-Tyrosine Kinase (RTK) 10-plex	
Phospho-EGFR Profiling Panel 9-Plex Complete Assay Kit	

2.4 Laborchemikalien und Reagenzien

Agar	Merck
Agarose	Invitrogen
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
Bovines Serum Albumin (BSA), Albumin Fraktion V	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Essigsäure	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethanol	Merck
Glycerol	Merck
Glycin	Merck
HEPES	Sigma
Isopropanol	Merck
Kanamycinsulfat	AppliChem
Luria Bertani (LB) Broth	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat ($MgCl_2$)	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natronlauge	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Propidiumiodid (PI)	Invitrogen
Ponceau S	Merck
Salzsäure	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck

2.5 Einmalartikel

96-Well Platten für ELISA	Costar
Deckglas	VWR
Multipette CombiTips plus	Eppendorf AG
PCR-Mikroröhrchen	Biozym Scientific GmbH
Petrischalen für die Mikrobiologie	VWR
Pipettenspitzen, RNase-frei (SafeSeal-Tips)	Biozym Diagnostic GmbH

Polypropylen Rundboden-Röhrchen, 5 mL	BD Falcon
Polypropylen Röhrchen, 12 mL	Greiner Bio-One
Polypropylen Röhrchen, 15 mL und 50 mL	Becton Dickinson
QIAshredder	QIAGEN
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL)	Eppendorf
Reaktionsgefäße, RNase-frei (Biopur Safe-Lock)	Eppendorf
Steriflip	Millipore
Zellkulturbedarf	NUNC
6-Well Zellkulturplatten „Nunclon™ Surface“	
96-Well Zellkulturplatten „Nunclon™ Surface“	
75 cm ² Zellkulturflaschen (T-75) „Nunclon™ Surface“	
10 cm Zellkulturschale „Nunclon™ Surface“	
Kryoröhrchen	
Zellschaber	

2.6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien für proteinbiochemische Methoden:

Criterion Blotting Sandwiches	BioRad
Criterion XT Precast Gele 4-12% BisTris	BioRad
Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Substrate	Roche
Magic Mark XP Western Standard	Invitrogen
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
Phosphatase Inhibitor Set II	Calbiochem
Protease Inhibitor Set III	Calbiochem
SeeBlue Plus2 Prestained Proteinstandard	Invitrogen
XT MOPS Running Buffer (20x)	BioRad
XT Reducing Agent (20x)	BioRad
XT Sample Buffer (4x)	BioRad

Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische Methoden:

dNTP Mix, 10 mM	Invitrogen
DNA Typing Grade 50x TAE	Invitrogen
GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array	Affymetrix
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas
Loading Dye Solution für Nukleotide (6x)	Fermentas
Rnase free Dnase Set	QIAGEN
S.O.C Medium	Invitrogen

2.7 Medien, Zusätze und Reagenzien für die Zellkultur

Cell Detachment Solution HyQTase	HyClone
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche
CellTiter-Blue, Cell Viability Assay	Promega
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Invitrogen
Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)	Invitrogen
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH
HAM F12	Invitrogen
Hygromycin B (50 mg/mL)	Invitrogen
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen
Minimum Essential Media (MEM) alpha powder	Invitrogen
McCoy's 5A Medium	Invitrogen
Natriumbicarbonat, 7,5%	Invitrogen
Natriumpyruvat, 100 mM	Invitrogen
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Invitrogen
Trypsin, 0,25% (1x) mit EDTA	Invitrogen
Zeocin Selection Reagent (100 mg/mL)	Invitrogen

2.8 Wachstumsfaktoren und Therapeutika

Amphiregulin, rekombinant, human	R&D Systems
Cetuximab (Erbix®)	Merck
EGF, rekombinant, human	Millipore
Epiregulin, rekombinant, human	R&D Systems
Matuzumab (EMD 72000)	Merck
Nimotuzumab (CIMAher®)	CIMAB SA
TGF alpha, rekombinant, human	R&D Systems
Oxaliplatin	Sigma-Aldrich
Panitumumab (Vectibix®)	Amgen Europe B.V.

2.9 Bakterienstämme

Chemisch kompetente <i>E.coli</i> , One Shot TOP10	Invitrogen
XL10-Gold, ultrakompetente Zellen	Stratagene

2.10 Vektoren und Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon bezogen und bei -20°C gelagert.

1) Oligonukleotide für die ortsspezifische Mutagenese des *EGFR*

EGFR_R521K_F	GGGGCCCGGAGCCCAAGGACTGCGTCTCTTG
EGFR_R521K_R	CAAGAGACGCAGTCCTTGGGCTCCGGGCCCC

2) Oligonukleotide für die Sequenzierung des *EGFR*

EGFR_S4	CAACATGTCGATGGACTTCCA
EGFR_S5	GCAAAGTGTGTAACGGAATAGG
EGFR_S6	GTGAAAACAGCTGCAAGGCC
EGFR_S7	GCCTAAGATCCCGTCCATCG
EGFR-S9	AGAGTGATGTCTGGAGCTACGGGGTGAC
EGFR-S10	CCAGCGCTACCTTGTCTTTC
EGFR-RS2	GGCAGTTCTCCTCTCCTGC
EGFR-RS3	CTGTGGATCCAGAGGAGGAGTAT
EGFR-RS5	AGAGTTCTCCACAAACTCCC
EGFR-RS6	TTCGCATGAAGAGGCCGATCC
EGFR-RS7	CCAGTTGAGCAGGTAAGGGA
EGFR-RS8	GGGTTCCAGAGGCTGATTGTGAT

3) sonstige Oligonukleotide

T7_F	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH_R	TAGAAGGCACAGTCGAGG

4) Vektoren und Plasmide

Amphiregulin-pcDNA3.1(+)_A009	Geneart
EGF-pcDNA3.1(+)_A009	Geneart
Epiregulin-pcDNA3.1(+)_A009	Geneart
pEF5/FRT/V5-D-TOPO®	Invitrogen
pOG44	Invitrogen
TGFA-pcDNA3.1(+)_A009	Geneart

2.11 Antikörper

Antigen	Quelle	Anbieter	Artikelnummer	Verdünnung
Primärantikörper				
AKT [pS ⁴⁷³]	Kaninchen	CellSignaling	#4060	1:1000
c-Jun [pT ⁹³]	Kaninchen	Epitomics	#2591-1	1:1000
Cyclin D1	Kaninchen	Diagnostic BioSystems	RMAB003	1:500
Cofilin	Kaninchen	CellSignaling	#3312	1:500
EGFR	Kaninchen	CellSignaling	#4267	1:1000
EGFR [pY ¹⁰⁶⁸]	Kaninchen	Invitrogen	#44788G	1:1000
ERK1/2 [pT ²⁰² /pY ²⁰⁴]	Kaninchen	CellSignaling	#9101	1:1000
GAPDH	Kaninchen	CellSignaling	#2118	1:1000
p27Kip	Kaninchen	CellSignaling	#3688	1:1000
p38 MAPK [pT ¹⁸⁰ /pY ¹⁸²]	Kaninchen	CellSignaling	#9215	1:500
p70S6 Kinase [pT ³⁸⁹]	Kaninchen	CellSignaling	#9234	1:1000
S6RP [pS ^{235/236}]	Kaninchen	CellSignaling	#4858	1:1000
SAP/JNK [pT ¹⁸³ /pY ¹⁸⁵]	Kaninchen	CellSignaling	#4668	1:1000
STAT3 [pY ⁷⁰⁵]	Kaninchen	CellSignaling	#9145	1:1000
Sekundärantikörper				
Rabbit-IgG	Ziege	CellSignaling	#7074	1:2000

2.12 Medien und Puffer

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit MilliQ-Wasser aus der hauseigenen Anlage von Merck angesetzt und, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur gelagert.

Antikörperlösung		Lagerung bei 4°C
TBS (20x)	5% (v/v)	
Tween 20 (20%)	0,25% (v/v)	
BSA	5% (w/v)	
Natriumazid (1%)	0,01% (v/v)	
mit sterilem MilliQ-Wasser aufgefüllt und sterilfiltriert		

Blockierlösung		frisch angesetzt
Milchpulver	5% (w/v)	
TBS (20x)	5% (v/v)	
Tween 20 (20%)	0,25% (v/v)	

HGNT-Lysepuffer		Lagerung bei 4°C
HEPES, pH 7,4	20 mM	
Glycerol	10% (v/v)	
Natriumchlorid	150 mM	
Triton X-100	1% (v/v)	
EDTA	2 mM	
LB (Luria Bertani)-Medium		
LB-Broth	20% (w/v)	
mit sterilem MilliQ-Wasser aufgefüllt und autoklaviert		
LB-Agar		Lagerung bei 4°C
LB-Broth	20% (w/v)	
Agar	1,5% (w/v)	
mit sterilem MilliQ-Wasser aufgefüllt und autoklaviert		
MEM-Medium (2x)		Lagerung bei 4°C
MEM alpha Pulver	10 g	
Fötale Kälberserum (FCS)	20% (v/v)	
L-Glutamin	2% (v/v)	
Natriumpyruvat	2% (v/v)	
Natriumbicarbonat	6% (v/v)	
Hygromycin B	400 µg/mL	
mit sterilem MilliQ-Wasser auf 500 mL aufgefüllt und sterilfiltriert		
Ponceau S Färbe-Lösung		
Ponceau S	0,25% (w/v)	
Essigsäure	10% (v/v)	
RIPA-Lysepuffer (pH 7,6)		Lagerung bei 4°C
HEPES, pH 7,4	20 mM (v/v)	
Magnesiumchlorid	1,5 mM	
Natriumchlorid	200 mM	
EDTA, pH 8,6	0,4 mM	
Triton X-100	1% (v/v)	
SDS	0,3% (v/v)	
SDS-Probenpuffer (BioRad)		frisch angesetzt
XT Probenpuffer (4x)	25% (v/v)	
XT Reduktionsmittel (20x)	5% (v/v)	

Softagar			Lagerung bei 4°C
Basalagar:	Agar	1% (w/v)	
Topagar:	Agar	0,8% (w/v)	
mit sterilem MilliQ-Wasser aufgefüllt und autoklaviert			

TBS (<i>Tris buffered saline</i>), 20x (pH 7,4)		
Tris, pH 8,3		1 M
Natriumchlorid		3 M

TBST		
TBS (20x)		5% (v/v)
Tween 20 (20%)		0,25% (v/v)

Transferpuffer (10x)		
Tris		184 mM
Glycin		1,6 M

Transferpuffer (1x)			frisch angesetzt
Transferpuffer (10x)		10% (v/v)	
Methanol		20% (v/v)	

2.13 Säugerzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Zellkulturmedium
SW48 Parental (Bardelli) SW48 KRAS (G13D) SW48 KRAS (G12V) SW48 KRAS (G12A) SW48 KRAS (G12D) SW48 KRAS (G12C)	Isogene Zelllinien, die sich durch den Mutationsstatus von KRAS unterscheiden. Bezugsquelle: Horizon Fuel Cell Technologies	McCoy's 5A Medium + 10% FCS
Flp-In TM CHO-EGFR Flp-In TM CHO-ErbB3 Flp-In TM CHO-EGFR/ErbB3	Flp-In TM CHO-Zellen, die mit EGFR und/oder ErbB3 stabil transfiziert wurden. Bezugsquelle: Dr. Christa Burger (Merck KGaA)	HAMs F5 + 10% FCS + 2 mM L-Glutamin + 200 µg/mL Hygromycin B
Flp-In TM 3T3 Flp-In TM 3T3-EGFR 521K Flp-In TM 3T3-EGFR 521R Flp-In TM 3T3-Leervektor	Bezugsquelle: Invitrogen Flp-In TM 3T3-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit mit EGFR 521K, EGFR 521R oder Leervektor stabil transfiziert wurden.	D-MEM + 10% FCS + 2 mM L-Glutamin + 100 µg/mL Zeocin D-MEM + 10% FCS + 2 mM L-Glutamin + 200 µg/mL Hygromycin B

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurden 50 µL chemisch kompetente *E. coli* TOP10 mit 10 ng des zu amplifizierenden Plasmids versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte die Aufnahme des Plasmids in die Bakterien durch Hitzeschock bei 42°C für 30 s; danach wurden die Bakterien für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µL S.O.C. Medium wurden die Bakterien bei 37°C für 60 min geschüttelt (300 rpm). 50 µL des Ansatzes wurden auf vortemperierten LB-Platten ausplattiert, welche das geeignete Antibiotikum enthielten (Kanamycin bzw. Ampicillin mit einer Arbeitskonzentration von 50 µg/mL bzw. 100 µg/mL). Die ausplattierten Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.2 Anzucht und Einfrieren von transformierten Bakterien

Eine auf LB-Platten gewachsene, transformierte *E. coli* Kolonie wurde in 5 mL mit Antibiotikum versetztes LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 230 rpm herangezüchtet. Am nächsten Tag wurden 300 µL der Bakterienkultur mit 300 µL Glycerol (60%) versetzt und bei -80°C gelagert. Die restliche Bakterienkultur wurde entweder zur Isolierung von Plasmid-DNA (siehe 3.1.3) oder zum Animpfen einer größeren Kultur (200 – 300 mL) genutzt, die dann über Nacht bei 37°C und 230 rpm herangezüchtet wurde.

3.1.3 Präparation bakterieller Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparation aus den Übernachtskulturen (siehe 3.1.2) erfolgte bei großem Volumen an Kultur (200 – 300 mL) mittels des *HiSpeed Plasmid Maxi Kits* (QIAGEN) oder bei kleinem Volumen (ca. 5 mL) mit Hilfe des *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde anschließend in 1 mL bzw. 50 µL DNase-freiem Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

3.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentration und die Qualität von Nukleinsäuren wurde an dem UV/Vis Spektrophotometer NanoDrop 1000 bestimmt.

Bei der Messung wurden 1,5 µL unverdünnter Probe eingesetzt und die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Die Probe wurde als rein beurteilt, wenn das Verhältnis $OD_{260/280}$ bei 1,8 (bei DNA) bzw. 2 (bei RNA) lag.

3.1.5 *In vitro* Mutagenese von Vektorkonstrukten

Durch einen Basenaustausch von AGG zu AAG wurde an Codon 521 des EGFR die Aminosäure Arginin (R) in die Aminosäure Lysin (K) geändert und somit die EGFR-Mutante 521K generiert. Dazu wurde das *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) verwendet, welches das Einfügen von Punktmutationen in eine vorliegende DNA-Sequenz ermöglicht. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Als Ausgangsplasmid diente der schon vorhandene Vektor pEF5/FRT/v5-D-TOPO, in den die Sequenz des *EGFR 521R*-Gens eingefügt worden war [Irmer, 2008]. Das Plasmid wurde mit Polymerase und zwei komplementären Oligonukleotiden, welche die mutierte Sequenz aufwiesen (siehe 2.10), versetzt. Nach erfolgter PCR (siehe unten) wurde dem PCR-Ansatz *DpnI*-Restriktionsenzym zugegeben, welches die parentale, methylierte DNA degradiert, während die neu synthetisierte DNA erhalten bleibt. XL 10-Gold ultrakompetente Zellen wurden mit der DNA transformiert und auf Nährboden mit Ampicillin (100 µg/mL) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht wurden am nächsten Tag Klone isoliert und per Sequenzierung überprüft, ob die Mutagenese erfolgreich war.

Folgender PCR-Ansatz wurde verwendet:

- 5 µL *Reaction Buffer* (10x)
- 3 µL *Quick Solution*
- 25 ng Ausgangs-DNA
- 125 ng *forward* Primer
- 125 ng *reverse* Primer
- 1 µL dNTP-Mix
- 1 µL *PfuUltra HF DNA-Polymerase*
- mit MilliQ-H₂O auf 50 µL auffüllen

Temperatur- und Zeitschema der PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	01:00 min	1
Denaturierung	95°C	00:50 min	18
Hybridisierung der Primer	60°C	00:50 min	
Elongation	68°C	13:00 min	
Finale Elongation	68°C	07:00 min	1

3.1.6 Sequenzierung

Die Ermittlung der Basensequenz von synthetisierter DNA erfolgte nach der Didesoxysequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1992).

Folgender Ansatz wurde für die PCR-Reaktion verwendet:

500 ng DNA

1 µL *forward* oder *reverse* Primer (Sequenzen siehe 2.10)

4 µL Premix (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100)

2 µL 5x Sequencing Buffer (BigDye Terminator v1.1, v3.1)

mit MilliQ-H₂O auf 20 µL auffüllen

Temperatur- und Zeitschema der PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	04:00 min	1
Denaturierung	95°C	00:20 min	35
Hybridisierung der Primer	55°C	00:20 min	
Elongation	60°C	04:00 min	

Die Sequenzanalyse der DNA-Proben wurde in dem Labor Dr. Detlev Güssow (Abteilung MS-DTB-B Molecular Biology, Firma Merck) ausgeführt. Die Auswertung der Analyse erfolgte mit Hilfe der Programme SeqMan und EditSeq.

3.1.7 Isolierung der RNA aus Säugerzellen

Für Untersuchungen der Genexpression auf mRNA-Ebene wurde die RNA von Zellen mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* nach Herstellerangaben (QIAGEN) isoliert. Das Zelllysat wurde nach Homogenisieren per *QIAshredder* (QIAGEN) bei -70°C gelagert, bis die RNA aufgereinigt wurde. Für Genexpressionsstudien mit Affymetrix-Arrays (siehe 3.1.11) wurde die RNA mit zusätzlichem DNase-Verdau, wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, isoliert.

3.1.8 Reverse Transkription (RT) von RNA

Die in sterilem Wasser eluierte RNA wurde für kurze Perioden bei -20°C gelagert und diente dem Nachweis der Expression bestimmter Gene mittels RT-PCR. Dazu wurde mit dem *OneStep RT-PCR Kit* nach Herstellerangaben gearbeitet (QIAGEN).

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA (reverse Transkription) erfolgte durch reverse Transkriptasen, während die anschließende PCR-Amplifikation des gewünschten Gens durch die HotStar *Taq* DNA Polymerase geschah. Die folgenden Schritte entsprachen denen einer herkömmlichen PCR-Reaktion.

Ansatz für reverse Transkription und anschließende PCR

- 5 µL QIAGEN *OneStep RT-PCR Buffer* (5x)
- 1 µL QIAGEN *OneStep RT-PCR Enzyme Mix*
- 1 µL dNTP Gemisch
- 1 µL Primer, *forward* (10 pmol/L)
- 1 µL Primer, *reverse* (10 pmol/L)
- 1 µg RNA
- mit MilliQ-H₂O auf 25 µL aufgefüllt

Temperatur- und Zeitschema der PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Reverse Transkription	50°C	30:00 min	1
Initialer PCR Aktivierungsschritt	95°C	15:00 min	1
Denaturierung	94°C	1:00 min	35
Hybridisierung der Primer	56-65°C	1:00 min	
Elongation	72°C	1:00 min	
Finale Elongation	72°C	10:00 min	1

3.1.9 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte durch horizontale Agarosegelelektrophorese. Agarose (1%) wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer (1x) gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. Das Agarose-TAE-Puffer-Gemisch wurde in eine Agarosegelkammer gegossen und bei RT erstarren gelassen. Nach dem Aushärten des Gels wurden in die Taschen je 10 µL Probe geladen, die zuvor mit 1/6 Volumen an Ladebuffer (6x) versetzt worden war. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 V. Die DNA wurde unter UV-Licht visualisiert und die DNA-Banden durch ein integriertes Dokumentationssystem von Syngene und durch das Programm GeneSnap™ festgehalten. Die Größe der DNA-Moleküle wurde mit Hilfe eines 1 kb DNA-Größenmarkers ermittelt, der parallel zu den Proben aufgetragen und aufgetrennt wurde.

3.1.10 Quantitative Real-Time PCR-Analyse

Die Real-Time PCR-Analyse wurde in dieser Arbeit genutzt, um das mRNA-Expressionsniveau der EGFR-Liganden in den isogenen SW48-Zellen zu vergleichen. Dazu wurden 1×10^6 Zellen je Zelllinie in PBS gewaschen und abzentrifugiert (5 min bei 1200 rpm; Omnifuge 2.0RS). Das Zellpellet wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Real-Time PCR-Analyse wurde in dem Labor von Dr. Tobias Haas (Abteilung WL-ABB4, Firma Merck KGaA) durchgeführt.

3.1.11 Genexpressionsanalyse mit Affymetrix-Arrays

Die Genexpressionsanalyse mit Hilfe eines *Mouse Genome Arrays* der Firma Affymetrix wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um eine Veränderung der Genexpression durch die Stimulation der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen mit EGFR-Liganden nachzuweisen.

Die isolierte RNA (siehe 3.1.7) wurden an das Labor Dr. Catherine Salvat (Abteilung Exploratory Biomarker/Biomarker Technologies/NCD, Firma Merck KGaA) übergeben, in dem die cDNA-Synthese, ihre Markierung und die Hybridisierung der Genexpressions-Chips durchgeführt wurde. Die statistische Auswertung der Genexpressionsdaten wurde von Dr. Eike Staub (Abteilung Bioinformatics, Firma Merck KGaA) durchgeführt.

3.2 Allgemeine Zellkulturtechniken

3.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Alle Arbeiten mit humanen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Brutschränken bei 37°C in 5% CO₂ Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen in serumhaltigem Medium (siehe 2.13) kultiviert und einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 10 mL D-PBS gewaschen. Die Ablösung der stabil transfizierten NIH3T3- bzw. CHO-Zellen erfolgte mit 1 mL HyQTase; die isogenen SW48-Zellen wurden mit 1 mL Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Ein Teil der mit Medium resuspendierten Zellen wurde in eine neue Flasche mit frischem Vollmedium übertragen.

Zellwachstum und Zelldichte wurden regelmäßig mit einem Invers-Durchlicht-Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung geprüft.

3.2.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde durch manuelles Zählen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde die Zellsuspension je nach Zelldichte verdünnt. Mit Hilfe der 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops wurden 4 x 16 kleine Quadrate ausgezählt und daraus die Zellzahl pro mL nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellzahl [1/mL]} = (\text{gezählte Zellzahl} / 4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu 70% - 90% Konfluenz kultiviert. Nachdem die Zellen mit D-PBS gewaschen worden waren, wurden sie vom Flaschenboden gelöst und in Vollmedium resuspendiert. Nach Zentrifugation (für 5 min bei 1200 rpm; Omnifuge 2.0RS) der Zellsuspension wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in D-PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem Vollmedium mit zusätzlichen 10% FCS und 10% DMSO vorsichtig resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann für 48 h bei -80°C aufbewahrt, um dann in flüssigen Stickstoff überführt zu werden.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte im 37°C warmen Wasserbad. Die Zellen wurden sofort in frisches, vortemperiertes Vollmedium überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das für die Zellen toxische DMSO zu entfernen.

3.2.4 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Das Einbringen von Plasmid-DNA in Zellen erfolgte liposomenvermittelt mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) als Transfektionsreagenz.

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät und unter Standardbedingungen über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden hierfür so verdünnt, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70-80% konfluent waren. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden je Well 500 µL Transfektionslösung, bestehend aus 2 µg DNA und 7,5 µL Lipofectamine 2000 in Opti-MEM, eingesetzt.

Für Untersuchungen des Zellwachstums im Monolayer (siehe 3.2.7) wurde eine reverse Transfektion der Zellen durchgeführt: hierbei wurden je Well einer 96-Well Platte 50 µL der Transfektionslösung (enthielt 0,1 µg DNA und 0,4 µL Lipofectamine 2000) vorgelegt. Je 100 µL der Zellsuspension wurden in die Wells pipettiert und bei Standardbedingungen inkubiert.

3.2.5 Stabile Transfektion von NIH3T3-Säugerzellen

Für die Generierung von Zellen, die stabil EGFR 521K oder EGFR 521R exprimieren, wurde das Flp-InTM System (Invitrogen) verwendet. Zu diesem System gehören genetisch manipulierte NIH3T3-Zellen (Flp-InTM 3T3), die in ihrem Genom eine einzige *Flp Recombination target* (*FRT*)-Stelle besitzen. Diese ist in der Sequenz eines Zeocin-Resistenzgens lokalisiert.

Zu dem System gehören außerdem das Expressionsplasmid pOG44, das die Flp-Rekombinase kodiert, und das pEF5/FRT/V5-D-TOPO Expressionskonstrukt. Letzteres kodiert zum einen eine Hygromycin-Resistenz und zum anderen das zu untersuchende Gen (*EGFR 521K* oder *EGFR 521R*), welches zuvor in das Expressionskonstrukt kloniert wurde (siehe 3.1.5).

Die Flp-Rekombinase-vermittelte Integration des Expressionskonstruktes in das Genom der Zellen erfolgte durch Kotransfektion mit dem Expressionsplasmid und dem Expressionskonstrukt. Durch das spezifische Einfügen des Konstruktes zwischen den FRT-Stellen wird das Zeocin-Resistenzgen zerstört, und die Zellen verlieren ihre Resistenz gegenüber Zeocin,

verfügen dann aber über eine Resistenz gegen Hygromycin B. Die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte mittels Inkubation in Hygromycin-haltigem Medium.

Die untransfizierten NIH3T3-Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen in Zeocin-haltigem Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch antibiotikafreies Medium ersetzt, und die Zellen wurden durch Lipofectamine 2000 transfiziert (siehe 3.2.4). Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen vom Boden der 6-Well Platte gelöst und in geringer Dichte in 10 cm Schalen ausgesät. Nach Anheften der Zellen an den Boden der Kulturschale wurde das serumfreie Medium durch Medium ersetzt, dem zuvor Hygromycin B zugesetzt worden war. Die Hygromycin-Sensitivität der Zellen wurde zuvor bestimmt (200 µg/mL). Die Zellen wurden nun alle 3-4 Tage mit frischem Hygromycin-haltigem Medium versorgt, bis einzelne Zellkolonien per Auge erkannt werden konnten. Je 10 cm Schale wurden 2-4 Kolonien isoliert und expandiert.

Untransfizierte Zellen, die als Kontrolle in Hygromycin-haltigem Medium kultiviert worden waren, konnten nach wenigen Tagen nicht mehr detektiert werden.

Die stabile Expression wurde einerseits durch Western Blot Analyse (siehe 3.3.5) und Durchflusszytometrie (siehe 3.2.9) und andererseits durch Isolierung der zellulären RNA mit anschließender reverser Transkription (siehe 3.1.8) und Sequenzierung (siehe 3.1.6) verifiziert. Je ein Klon der EGFR 521K-, EGFR 521R- und Leervektor-Zellen wurde für die Versuchsreihen ausgewählt.

3.2.6 Behandlung von Zellen

Um Effekte auf die Signaltransduktion und Genexpression darstellen zu können, wurden die Zellen mit humanen EGFR-Liganden und mit monoklonalen anti-EGFR Antikörpern behandelt.

Dazu wurden 4×10^5 der NIH3T3- bzw. der CHO-Zellen oder 8×10^5 der SW48-Zellen in 6-Well Platten ausgesät und über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und mit 2 mL serumfreien Medium über Nacht inkubiert. Je nach Fragestellung erfolgte dann die Behandlung wie folgt:

(1) Zur Untersuchung der Frage, inwiefern die Signaltransduktion der Zellen durch die therapeutischen Antikörper in Kombination mit den EGFR-Liganden beeinflusst wird, wurden die Zellen mit den therapeutischen Antikörpern für 1 h behandelt und danach für 10 min mit den EGFR-Liganden inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen, die nicht mit therapeutischen Antikörpern behandelt worden waren, für 10 min mit den EGFR-Liganden stimuliert. Die finale

Konzentration der anti-EGFR mAb betrug 100 µg/mL und die der EGFR-Liganden 10 ng/mL (EGF, TGFA oder EREG) bzw. 20 ng/mL (AREG). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit serumfreien Medium behandelt wurden.

(2) Die Länge und Intensität der durch die EGFR-Liganden verursachten Aktivierung von Signalproteinen sollte untersucht werden. Dazu wurden die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen mit je 10 ng/mL EGF, TGFA bzw. EREG oder 20 ng/mL AREG unterschiedlich lange (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten mit serumfreien Medium behandelte Zellen.

(3) Des Weiteren sollten Veränderungen in der Genexpression nachgewiesen werden, die sich durch die Stimulation der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen mit den humanen EGFR-Liganden ergaben. Dazu wurden die Zellen mit je 10 ng/mL EGF, TGFA bzw. EREG oder 20 ng/mL AREG für 1 h, 3 h, 6 h und 24 h stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Für jeden Zeitpunkt wurden zur Sicherung der statistischen Signifikanz Triplikate ausgesät.

Nach erfolgter Behandlung wurden Proteinlysate (siehe 3.3.1) oder RNA-Lysate (siehe 3.1.7) erstellt. Expression und Aktivierung ausgewählter Signalproteine wurde zum einen durch SDS-PAGE (siehe 3.3.4) und darauf folgende Western Blot-Analyse (siehe 3.3.5) und zum anderen durch *WideScreen® BeadPlex® Assays* (siehe 3.3.6) untersucht. Genexpressionsstudien wurden mit *Genom-Arrays* (Affymetrix) durchgeführt (siehe 3.1.11).

3.2.7 Monolayer-Assay

Proliferationsassays im Monolayer-Format wurden durchgeführt, um die Effekte der EGFR-Liganden, der therapeutischen anti-EGFR mAb und Oxaliplatin zu bestimmen.

Zur Bestimmung der Proliferation diente das WST-1 Reagenz (Roche), ein Tetrazoliumsalz, das von viablen Zellen zu Formazan gespalten wird. Alle Versuche wurden in mindestens drei unabhängigen Ansätzen wiederholt. Alle Messungen inklusive Kontrollen erfolgten als Fünffachbestimmungen. Je nach Zelllinie wurden die Assays wie folgt durchgeführt:

Stabil transfizierte NIH3T3-Zellen

Die Zellen wurden vom Boden der Kulturflasche gelöst, in D-PBS gewaschen und in serumhaltigem Medium resuspendiert. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde auf

5×10^4 Zellen / mL eingestellt, und je 100 μ L dieser Zellsuspension wurden in die Wells einer 96-Well Platte pipettiert.

Nachdem sich die Zellen am Boden des Wells angeheftet hatten, wurde der Überstand abgenommen, und die Zellen wurden in 100 μ L serumfreiem Medium / Well über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 100 μ L serumfreiem Medium überschichtet, dem die therapeutischen mAb (finale Konzentration: 100 μ g/mL) und die EGFR-Liganden (finale Konzentration von EGF, TGFA und EREG: 100 ng/mL und 10 ng/mL; finale Konzentration von AREG: 200 ng/mL und 20 ng/mL) in unterschiedlichen Kombinationen zugesetzt worden waren. Zur Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) der EGFR-Liganden wurden die Zellen mit 100 μ L / Well der Liganden in zehn unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert (finale Konzentrationen für EGF, TGFA und EREG: 100 ng/mL, 33 ng/mL, 10 ng/mL, 3,3 ng/mL, 1 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,03 ng/mL, 0,01 ng/mL, 0,003 ng/mL; finale Konzentrationen für AREG: 200 ng/mL, 66 ng/mL, 20 ng/mL, 6,6 ng/mL, 2 ng/mL, 0,6 ng/mL, 0,2 ng/mL, 0,06 ng/mL, 0,02 ng/mL, 0,006 ng/mL).

NIH3T3-Zellen, die im 96-Well Format revers transfiziert worden waren, wurden nach Transfektion über Nacht in serumhaltigem Medium und erst am nächsten Tag in serumfreiem Medium (100 μ L / Well) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 100 μ L / Well der anti-EGFR mAb (finale Konzentration: 100 μ g/mL) inkubiert.

72 h nach Behandlung wurden die Zellen in 100 μ L frischem, serumfreiem Medium, dem zuvor 10 μ L WST-1 Reagenz zugegeben worden waren, für 2 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte an einem Mithras-Plattenlesegerät bei 405 nm.

Isogene SW48-Zellen

Die Zellen wurden in Vollmedium aufgenommen, und 100 μ L der Zellsuspension wurden in die Wells einer 96-Well Platte pipettiert; die Zellzahl betrug $2,5 \times 10^4$ Zellen / Well. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 100 μ L serumfreiem Medium überschichtet, dem Cetuximab oder Oxaliplatin in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt worden waren (finale Konzentrationen für Cetuximab: 100 000 ng/mL, 11 111 ng/mL, 1 235 ng/mL, 412 ng/mL, 206 ng/mL, 137 ng/mL, 69 ng/mL, 46 ng/mL, 15 ng/mL, 5 ng/mL; finale Konzentrationen für Oxaliplatin: 10 000 nM, 3 333 nM, 1 111 nM, 370 nM, 185 nM, 123 nM, 62 nM, 41 nM, 14 nM, 4,6 nM).

72 h nach Behandlung der Zellen wurden 20 μ L WST-1 Reagenz in jedes Well zugegeben und für 2 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte an einem Mithras-Plattenlesegerät bei 405 nm.

3.2.8 Softagar-Assay

Im Softagar-Assay wird das dreidimensionale, adhäsionsunabhängige Wachstum von Tumorzellen simuliert. Dabei verhindert die Einbettung der Zellen in Softagar deren Anheften an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes. Das adhäsionsfreie Wachstum der Zellen resultiert in einer dreidimensionalen Kolonienbildung, so dass proliferierende Zellen nach ein paar Tagen als Kolonien erkannt werden können. Durch Inkubation der in Softagar eingebetteten Zellen mit verschiedenen Substanzen kann untersucht werden, ob und inwiefern diese Substanzen die Kolonienbildung und somit das Zellwachstum beeinflussen.

Die stabil transfizierten NIH3T3-Zelllinien wurden im Softagar-Assay im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit auf therapeutische mAb unter Ligandeneinfluss untersucht. Außerdem wurde die mittlere EC_{50} der Liganden bestimmt.

Jede Zelllinie wurde mindestens dreimal unabhängig getestet; die unterschiedlichen Substanzkonzentrationen wurden stets in Fünffachbestimmungen aufgetragen. Unbehandelte Zellen als Wachstumskontrollen wurden ebenso wie der Leerwert fünffach bestimmt.

Die Unterschicht bestand aus 2x MEM-Vollmedium, dem aufgekochter Agar (1%) zu einer Endkonzentration von 0,5% zugesetzt wurde. In jedes Well einer 96-Well Platte wurden mit einer Mehrkanal-Pipette 100 μ L des MEM-Agar-Gemischs pipettiert. Die Platten wurden bei 4°C gelagert, bis die Unterschicht erhärtet war.

Während die Unterschicht erstarrte, wurde die Zellschicht vorbereitet: Dazu wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst, in D-PBS gewaschen und in 2x MEM-Vollmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit vortemperiertem (~52°C) Agar (0,8%) zu gleichen Teilen versetzt (Endkonzentration 0,4%). Je 100 μ L dieser Agar-Zellsuspension wurden mit einer Mehrkanal-Pipette auf die Unterschicht pipettiert. Die ausgesäte Zellzahl / Well betrug 1×10^3 Zellen. Alle Platten wurden im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Leerwert und Kontrollzellen mit je 50 μ L serumfreiem Medium überschichtet. Die zu therapierenden Zellen wurden mit je 50 μ L der in serumfreiem Medium gelösten EGFR-Liganden und therapeutischen mAb in unterschiedlichen Kombinationen behandelt. Dabei betrug die finale Konzentration der anti-EGFR mAb stets 100 μ g/mL. Die finale Konzentration für EGF, TGFA und EREG betrug 100 ng/mL und 10 ng/mL, die für AREG 200 ng/mL und 20 ng/mL. Zur Bestimmung der EC_{50} der EGFR-Liganden wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Liganden inkubiert (finale Konzentrationen für EGF, TGFA und EREG: 100 ng/mL, 33 ng/mL, 10 ng/mL, 3,3 ng/mL, 1 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,03 ng/mL, 0,01 ng/mL, 0,003 ng/mL; finale Konzentrationen für AREG: 200 ng/mL, 66 ng/mL, 20 ng/mL, 6,6 ng/mL, 2 ng/mL, 0,6 ng/mL, 0,2 ng/mL, 0,06 ng/mL, 0,02 ng/mL, 0,006 ng/mL).

Alle Zellen wurden für 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Wachstum der Zellen regelmäßig mit Hilfe eines Lichtmikroskops überprüft. Waren die Kolonien gut sichtbar gewachsen, wurden die Zellen mit 50 µL / Well *Cell Titer Blue* Reagenz überschichtet und für 6 h unter Standardbedingung inkubiert. Das Reagenz enthält den Redoxfarbstoff Resazurin, der in metabolisch aktiven Zellen durch Komponenten der Atmungskette in Resorufin umgewandelt wird. Die relative Zellzahl wurde über die Fluoreszenzintensität am Plattenlesegerät bestimmt (540 nm Extinktion / 600 nm Emission).

3.2.9 Durchflusszytometrie

Die Expression des humanen EGFR auf der Zelloberfläche der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt.

Dazu wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst, in D-PBS gewaschen, zentrifugiert (5 min bei 1200 rpm; Omnifuge 2.0RS), und das Zellpellet wurde in D-PBS mit 1% BSA resuspendiert. Je 1 x 10⁶ Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5 min bei 1200 rpm und 4°C; Omnifuge 2.0RS). Das resultierende Zellpellet wurde mit 20 µg/mL Antikörper (Matuzumab-FITC) versetzt und 15 min unter ständigem Schütteln auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer (D-PBS mit 1% BSA) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 mL Puffer, der 5 µg/mL Propidiumiodid (PI) enthielt, aufgenommen.

Die Zellen wurden im Durchflusszytometer FACScan von Becton-Dickinson analysiert. Messung und Auswertung erfolgten mit Hilfe des Programms CellQuest™.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus humanen Zellen

Die Lyse von Zellen wurde mit HGNT- oder RIPA-Puffer durchgeführt, dem zuvor Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt worden waren. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Zunächst wurde der Überstand abgenommen, und die Zellen wurden mit eiskaltem D-PBS gewaschen. Durch Zugabe von 125 µL Lysepuffer für ein Well einer 6-Well Platte und der Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden gelöst. Bei HGNT-Zelllysaten erfolgte anschließend eine Inkubation auf einem Orbitalschüttler (30 min bei 4°C), um eine optimale

Lyse sicherzustellen. Dagegen wurde das RIPA-Zelllysat sonifiziert (5 s ohne Intervall bei 40% Leistung). Nach Zentrifugation (4000 rpm bei 4°C für 20 min; Zentrifuge 5417R) des HGNT- und RIPA-Lysats wurde der Überstand abgenommen und in eine 96-Well Platte überführt. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgte bei -80°C.

Zellen, deren EGFR- oder ErbB3-Gehalt bzw. EGFR- oder ErbB3-Phosphorylierung mit Hilfe der *WideScreen BeadPlex Assays* untersucht werden sollten, wurden mit dem im Kit enthaltenen *Extraction Reagent* nach Herstellerangaben lysiert. Dieses Lysat wurde sowohl im *WideScreen Luminex-Assay* (siehe 3.3.6) als auch für SDS-PAGE (siehe 3.3.4) und darauf folgende Western Blot Analysen (siehe 3.3.5) eingesetzt.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kits* (Pierce) ermittelt, der auf einer Bindung von Kupfer an Proteine unter alkalischen Bedingungen beruht. Zum Erstellen einer Standard-Eichgeraden wurden BSA-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 2 mg/mL und 0,125 mg/mL bereitet. Als Leerwert wurde Lysepuffer verwendet. Alle Proben wurden als Doppelbestimmung aufgetragen. In einer 96-Well Platte wurden je Well 10 µL Probe, Standard und Leerwert vorgelegt und 200 µL *Working Reagent* (enthält 50 Teile *Reagent A* und 1 Teil *Reagent B*) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Proteinkonzentration photometrisch bei 564 nm am Platten-Lesegerät (Tecan) gemessen. Mit Hilfe der Eichgeraden wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt und der Mittelwert der Doppelbestimmung berechnet.

3.3.3 Vorbereitung der Lysate für die elektrophoretische Trennung

Nach erfolgter Quantifizierung wurden die Lysate mit dem entsprechenden Lysepuffer und Probenpuffer auf eine Proteinkonzentration von 400 µg/mL verdünnt. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Aufkochen der Lysate bei 99°C für 5 min.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der Proteine eines Lysats erfolgte durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), bei der die Proteine des Lysats durch ein angelegtes elektrisches Feld nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

In der Regel wurden Gele mit einem Vernetzungsgradienten von 4-12%, BisTris gepuffert, verwendet. Die Proben (15 μ L je Tasche) und Molekulargewichtsmarker (7,5 μ L je Tasche) wurden auf das Gel aufgetragen und in MOPS-Laufpuffer und Criterion-Laufkammern bei konstanter Spannung von 200 V getrennt.

3.3.5 Western Blot-Analyse

Der Transfer und die Immobilisierung der elektrophoretisch getrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einer Nasstransferkammer bei 100 V für 50 min. Zuvor wurden die Schwämme, die Membran und die *Whatman*-Papiere im Transferpuffer equilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte nach der *Sandwich*-Methode gemäß Herstelleranweisung (BioRad). Der Transfer wurde anschließend durch Färben der Membran mit einer *Ponceau S*-Lösung kontrolliert.

Freie Proteinbindungsstellen der Membran wurden mit Blockierlösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt, um unspezifisches Binden des Antikörpers an die Oberfläche der Membran zu verhindern.

Die Membran wurde danach in Primärantikörperlösung bestehend aus TBST mit 5% BSA und dem Primärantikörper in spezifischer Verdünnung inkubiert (siehe 2.11). Je nach experimentellem Rahmen erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT. Nachfolgend wurde die Membran bei RT dreimal je 5 min in TBST zur Entfernung ungebundener Antikörper gewaschen. Der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtete Sekundärantikörper wurde in Blockierlösung verdünnt, und die Membran wurde in dieser Antikörperlösung für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschriffe für je 5 min in TBST bei RT, um nichtgebundenen Antikörper zu entfernen.

Die Proteine wurden indirekt über die am Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP = *horse radish peroxidase*) visualisiert. Durch Benetzung der Membran mit *LumiLight^{PLUS} Western Blotting Substrate* kommt es zur Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase, wobei das Lichtsignal mittels eines VersaDoc-Systems visualisiert und dokumentiert wurde. Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe der *Quantity One Software*.

Die Primärantikörper, Zweitantikörper und Entwicklerlösung wurden immer frisch angesetzt. Alle Inkubationsschritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

3.3.6 WideScreen® BeadPlex® Assays

Zur Untersuchung verschiedener Phosphorylierungsstellen des EGFR wurde hier das *Phospho-EGFR Profiling Panel 9-Plex Complete Assay Kit* (EMD Millipore) verwendet. Die

Gesamtphosphorylierung des EGFR und von ErbB3 wurde mit dem *Human Receptor Phospho-Tyrosine Kinase (RTK) 10-plex Kit* (EMD Millipore) durchgeführt.

Die Lyse der Zellen wurde mit dem im Kit enthaltenen *Extraction Reagent* nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe 3.3.1). Nach erfolgter Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 3.3.2) wurden die Lysate mit *Extraction Reagent* auf eine Proteinkonzentration von 400 µg/mL verdünnt. Die geforderte finale Proteinkonzentration von 100 µg/mL wurde durch Verdünnung mit *Assay diluent* im Verhältnis 1:4 erreicht. Je Well kamen 100 µL der Verdünnung - also 10 µg Protein - zum Einsatz.

Leerwert, Kontrollpeptidmix und Lysate wurden zweifach bestimmt. Bei der Durchführung wurde das Protokoll des Herstellers (EMD Chemicals) befolgt. Die Messung der Platte erfolgte am Luminex 100 System.

3.3.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Expression der humanen EGFR-Liganden wurde im Überstand der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen mit Hilfe eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) nachgewiesen. Zellen, die zuvor im 96-Well Format mit humanen EGFR-Liganden entweder transfiziert oder behandelt worden waren, wurden mit therapeutischen mAb für 72 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden je Well 150 µL Überstand abgenommen, in einer 96-Well Platte gesammelt und bei -20°C gelagert.

Überstände von Zellen, die zuvor mit humanem EGF transfiziert worden waren, wurden auf Vorhandensein von humanem EGF untersucht. Ebenso wurde mit Überständen von Zellen verfahren, die zuvor mit TGFA oder mit AREG transfiziert worden waren. Zusätzlich wurden Überstände von Zellen, welche mit humanen Liganden und therapeutischen mAb behandelt worden waren, auf die Gegenwart von humanen Liganden untersucht.

Rekombinantes Protein wurde nach Herstellerangaben (RayBio) verdünnt und eine Standardreihe aufgetragen. Die Überstände wurden unverdünnt aufgetragen oder - wenn nötig - 1:2 oder 1:3 verdünnt. Der Nachweis der humanen EGFR-Liganden EGF, TGFA und AREG geschah mittels der von RayBio angebotenen ELISAs nach Herstellerangaben.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung des EGFR-Polymorphismus R521K

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellte die Untersuchung des EGFR-Polymorphismus R521K und die Untersuchung der EGFR-Liganden dar.

Zurzeit sind sieben Liganden bekannt, die den EGFR binden und aktivieren können. Dazu gehören EGF, TGFA, AREG und EREG, die sich z.B. durch die Affinität, mit der sie den EGFR binden, unterscheiden. *In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene Liganden, die denselben Rezeptor binden, unterschiedliche biologische Antworten auslösen können [Wilson *et al.*, 2009]. Des Weiteren wurde die Expression spezifischer EGFR-Liganden in bestimmten Tumoren mit Ansprechen auf anti-EGFR Antikörper assoziiert [Baker *et al.*, 2011].

Der EGFR-Polymorphismus R521K wird derzeit als prädiktiver Biomarker für die Behandlung von Tumorpatienten mit anti-EGFR Antikörpern diskutiert. Je nach Indikation und Therapie wirkt sich das Vorhandensein der EGFR-Varianten jedoch unterschiedlich auf den Behandlungserfolg aus [Goncalves *et al.*, 2008; Klinghammer *et al.*, 2010].

Welche Mechanismen für die Effekte der EGFR-Liganden und des EGFR-Polymorphismus verantwortlich sind, ist bisher nur gering verstanden. Daher werden in diesem Kapitel Unterschiede, die sich bezüglich Proliferation und Signaltransduktion von Zellen durch Expression der EGFR-Varianten 521K und 521R, durch Stimulierung mit den EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG und durch Behandlung mit therapeutischen anti-EGFR monoklonalen Antikörpern (mAb) ergaben, dargestellt.

4.1.1 Etablierung und Validierung des zellulären Systems

Murine NIH3T3-Fibroblasten (Flp-InTM 3T3) wurden gewählt, um Effekte des EGFR-Polymorphismus R521K, der humanen EGFR-Liganden und der therapeutischen mAb auf Signaltransduktion und Proliferation zu untersuchen, weil (1) das in die Zellen eingebrachte Gen in eine definierte Stelle integriert wird und somit Transfektionsartefakte minimiert werden, (2) die Zellen nur geringe Mengen an murinem EGFR exprimieren [Helin und Beguinot, 1991; Velu *et al.*, 1989] und (3) die Expression von humanem EGFR und die gleichzeitige Behandlung mit humanem EGF zur Transformation dieser Zellen führen kann [Di Fiore *et al.*, 1987].

Nach stabiler Transfektion der NIH3T3-Zellen mit humanem EGFR 521K, humanem EGFR 521R oder dem Leervektor wurde die Expression des humanen EGFR mittels Durchflusszytometrie (Abb. 4- 1) und Western Blot (Abb. 4- 2 B) bestätigt. Die EGFR-Expression an der Zelloberfläche konnte in den mit EGFR 521R und den mit EGFR 521K transfizierten NIH3T3-Zellen gemessen werden, erwartungsgemäß aber nicht in den mit Leervektor transfizierten Zellen. Bei beiden EGFR-Transfektanten konnte sowohl bei der Oberflächenexpression als auch bei der EGFR-Gesamtproteinexpression das gleiche EGFR-Expressionsniveau gezeigt werden. Des Weiteren wurde durch Sequenzierung bestätigt, dass die gewünschte EGFR-Variante in den Zellen vorlag (Daten nicht gezeigt).

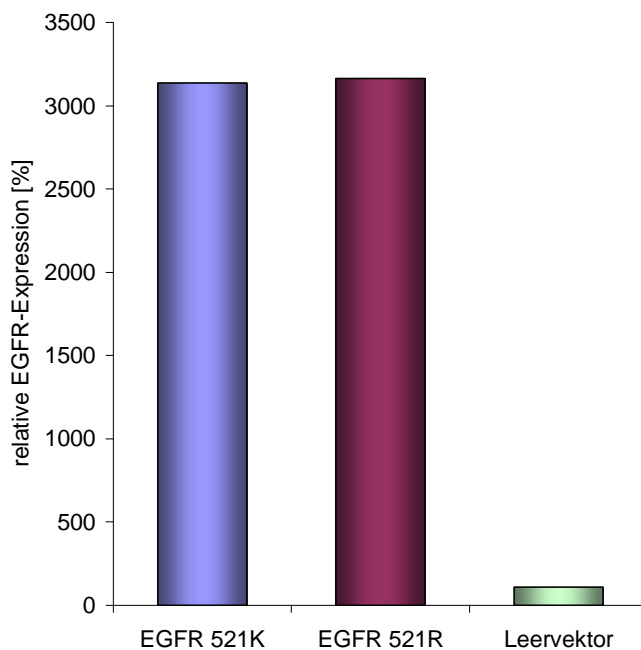


Abb. 4- 1: Oberflächenexpression von humanem EGFR auf stabil transfizierten NIH3T3-Zellen.

NIH3T3-Zellen wurden mit humanem EGFR 521K und EGFR 521R stabil transfiziert. Die Oberflächenexpression des Rezeptors wurde mittels Durchflusszytometrie nach Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Matuzumab für 15 min an einem Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) gemessen.

Die relative EGFR-Expression wurde durch Normalisierung gegen ungefärbte Zellen ermittelt. Abkürzungen: EGFR, epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor.

Zur Überprüfung, ob das gewählte Zellsystem für Experimente mit humanen EGFR-Liganden tatsächlich geeignet war, wurden alle stabil transfizierten Zellen mit humanem EGF behandelt. Es sollte gezeigt werden, dass humanes EGF nur auf Zellen Einfluss hat, die humanen EGFR exprimieren, und dass sowohl Wachstum als auch Signaltransduktion der mit Leervektor transfizierten Zellen von humanem EGF unbeeinflusst bleiben.

Sowohl im Monolayer (Daten nicht gezeigt) als auch im Softagar-Assay (Abb. 4- 2 A) konnte durch Behandlung der Zellen mit EGF eine stärkere Proliferation der EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen gesehen werden. Dagegen war bei den Leervektor-Zellen durch Behandlung mit Ligand kein Ansprechen zu sehen.

Die Aktivierung des EGFR konnte nur in EGFR 521R- und EGFR 521K-Zellen nachgewiesen werden. Die hier ausgewählten Signalproteine STAT3, AKT, S6RP und ERK wurden nur in den mit humanen EGFR transfizierten Zellen phosphoryliert. In der Signaltransduktion der Leervektor-Zellen wurde kein Effekt von EGF sichtbar (Abb. 4- 2 B).

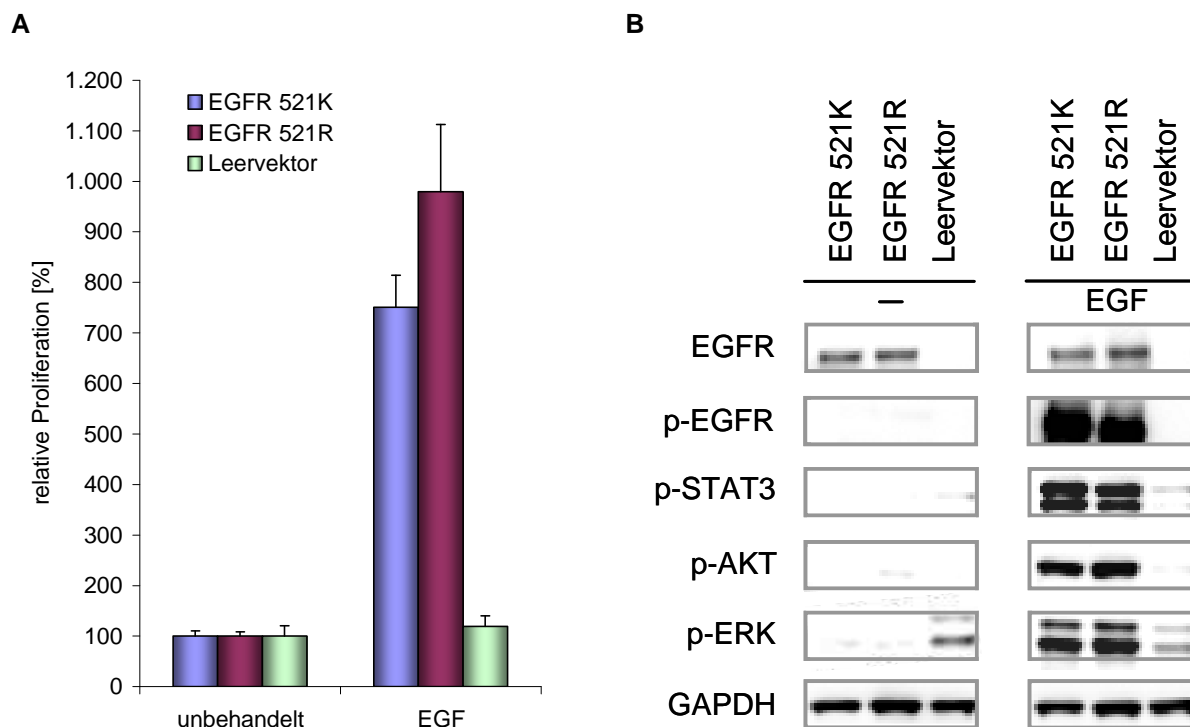


Abb. 4- 2: Effekt von humanem EGF auf Proliferation und Signaltransduktion stabil transfizierter NIH3T3-Zellen.

(A) NIH3T3-Zellen, die stabil EGFR 521K, EGFR 521R und Leervektor exprimierten, wurden in Soft-agar ausgesät, mit EGF (10 ng/mL) stimuliert und für 7 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Fluoreszenz gemessen, nachdem die Zellen 6 h mit dem *Cell Titer Blue* Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünf-fachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. (B) Stabil transfizierte NIH3T3-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und am nächsten Tag mit EGF (10 ng/mL) für 10 min stimuliert. Danach wurden Zelllysate hergestellt, und folgende Proteine wurden im Western Blot analysiert: EGFR, p-EGFR [Y1068], p-STAT3 [pY705], p-AKT [S473], p-ERK [T202/Y204]. **Abkürzungen:** -, unbehandelt; AKT, Proteinkinase B; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; ERK, *Extracellular-signal regulated kinase*; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; p, phospho; STAT, *Signal transducer and activator of transcription*.

4.1.2 Proliferation unter dem Einfluss der EGFR-Liganden

In dieser Arbeit wurde der Effekt der EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG auf die Proliferation der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen

sowohl im Monolayer- als auch im Softagar-Assay mit zehn aufsteigenden Konzentrationen eines jeden Liganden inkubiert. Die Proliferation der mit EGFR-Liganden behandelten Zellen wurde mit dem Wachstum der unbehandelten Kontrollzellen verglichen und mittels der GraphPad Prism Software ausgewertet. Anhand der Dosis-Wirkungskurven wurde die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) der EGFR-Liganden für beide EGFR-Varianten ermittelt. Je drei repräsentative Experimente sowohl der Monolayer-Assays als auch der Softagar-Assays wurden herangezogen, um eine Aussage über das Zellwachstum treffen zu können.

4.1.2.1 Proliferation im Monolayer-Assay

Zur Bestimmung der EC_{50} der EGFR-Liganden wurden die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen im Monolayer ausgesät, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und am nächsten Tag mit zehn aufsteigenden Konzentrationen eines jeden Liganden für 72 h inkubiert.

Die Liganden wirkten sich unterschiedlich auf das Wachstum der Zellen aus. AREG hatte auf das Zellwachstum die schwächste Wirkung. Erst Konzentrationen über 3,3 ng/mL (bei EGFR 521K) bzw. über 10 ng/mL (bei EGFR 521R) stimulierten Zellwachstum. Eine Annäherung an einen maximalen Wert konnte unter den eingesetzten Konzentrationen nicht erkannt werden (Abb. 4- 3); dementsprechend stellte die EC_{50} von AREG einen sehr hohen Wert ($EC_{50} >80$) dar (Tab. 4- 1). Dagegen führten EREG-Konzentrationen ab 1 ng/mL in den meisten Fällen zu einem sehr starken Wachstum (Abb. 4- 3). TGFA führte erst bei höheren Konzentrationen zu Zellwachstum. EGF stellte den potentesten Liganden dar, der allerdings in den meisten Fällen eine geringere maximale Stimulierung zu bewirken schien als die anderen Liganden (Abb. 4- 3). Dementsprechend lag die EC_{50} für EGF stets unter den EC_{50} -Werten der anderen drei Liganden (Tab. 4- 1).

Tab. 4- 1: Bestimmung der mittleren EC_{50} aus drei unabhängigen Monolayer-Experimenten.

	EGFR 521K-Zellen				EGFR 521R-Zellen			
	EGF	TGFA	AREG	EREG	EGF	TGFA	AREG	EREG
EC_{50} [ng/mL] - E1	3	7	>>80	6	5	12	>>80	6
EC_{50} [ng/mL] - E2	5	46	>80	13	10	53	>80	25
EC_{50} [ng/mL] - E3	2	18	>80	6	4	30	>80	9

Abkürzungen: AREG, Amphiregulin; E, Experiment; EC_{50} , effektive Konzentration; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

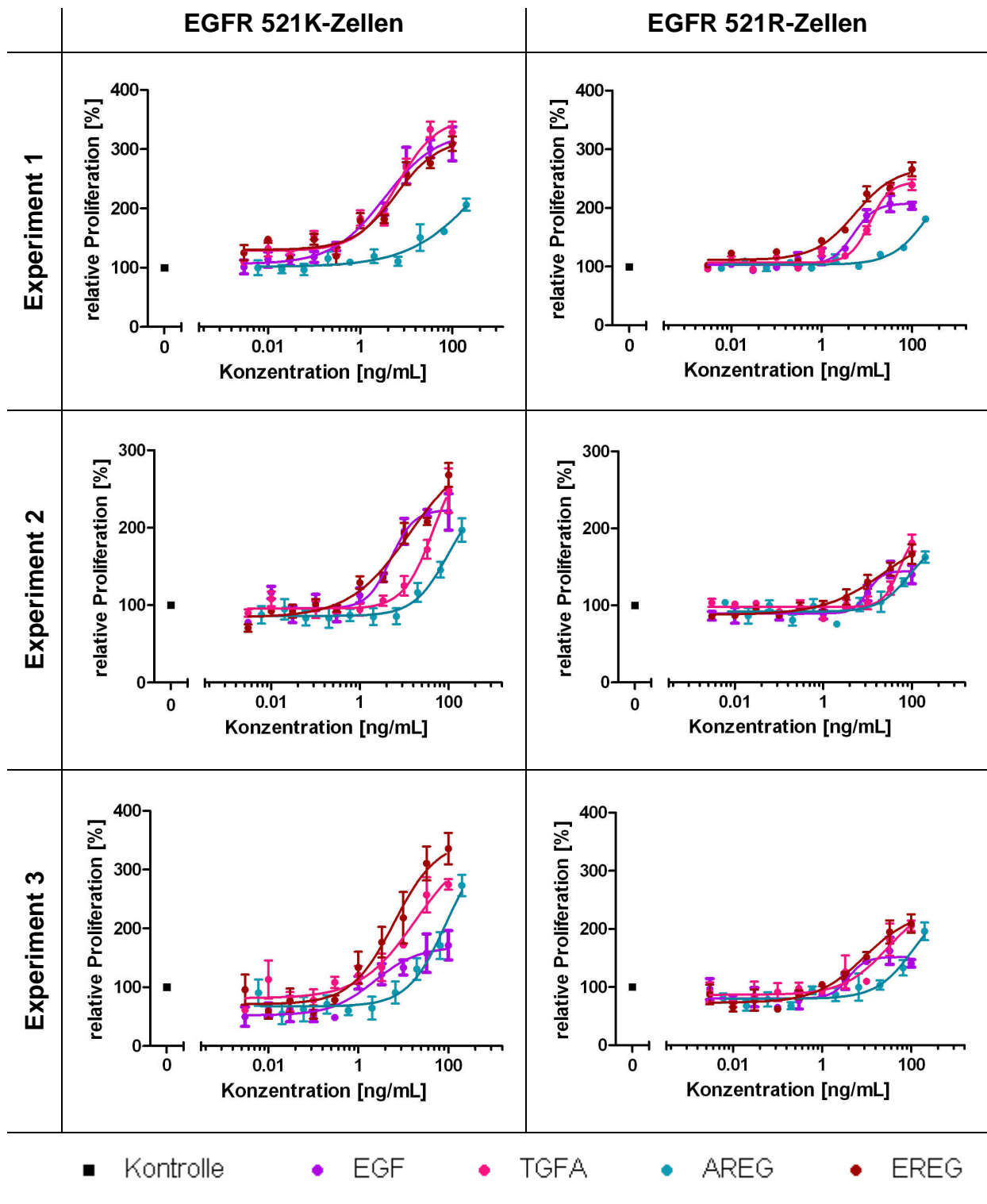


Abb. 4- 3: Konzentrations-Wirkungskurve der EGFR-Liganden bei NIH3T3-Zellen im Monolayer. Die stabil transfizierte NIH3T3-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert, am nächsten Tag mit EGFR-Liganden in verschiedenen Konzentrationen (zwischen 100 ng/mL und 0,003 ng/mL für EGF, TGFA und EREG und zwischen 200 ng/mL und 0,006 ng/mL für AREG) stimuliert und für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Absorption gemessen, nachdem die Zellen 2 h mit dem WST-1 Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. **Abkürzungen:** AREG, Amphiregulin; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epregulin; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Ebenso hatte der EGFR-Polymorphismus unterschiedlichen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Beim Vergleich der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen, die ohne Liganden inkubiert worden waren, zeigte sich, dass EGFR 521K-Zellen langsamer wuchsen als EGFR 521R-Zellen (Abb. 4- 4). Allerdings ließ sich das Wachstum der EGFR 521K-Zellen durch die EGFR-Liganden stärker stimulieren als das Wachstum der EGFR 521R-Zellen. Bei EGFR 521K-Zellen setzte das Wachstum bei geringeren Ligandenkonzentrationen ein als bei EGFR 521R-Zellen, und sie erreichten ein stärkeres maximales Wachstum (Abb. 4- 3). Dementsprechend lag die EC_{50} der Liganden bei EGFR 521K-Zellen niedriger als bei EGFR 521R-Zellen (Tab. 4-1).

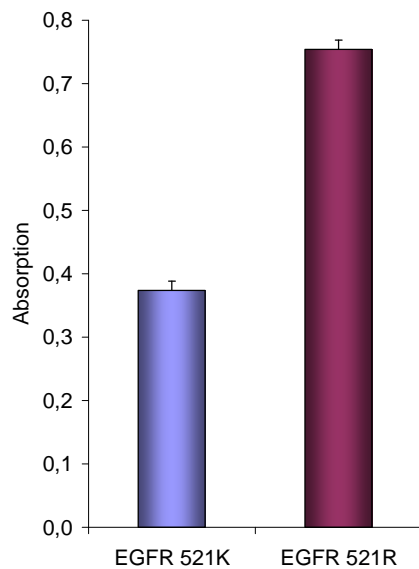


Abb. 4- 4: Proliferationsverhalten von stabil transfizierten NIH3T3-Zellen unter serumfreien Bedingungen.

Die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen wurden in Zellkulturplatten in serumhaltigem Medium ausgesät und über Nacht anheften lassen. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch serumfreies Medium ersetzt. Die Zellen wurden 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 2 h Inkubation der Zellen mit dem WST-1 Reagenz wurde die Absorption an einem Plattenlesegerät gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Abkürzungen: EGFR, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor.

4.1.2.2 Proliferation im Softagar-Assay

Neben dem Liganden-abhängigen Wachstum der Zellen im Monolayer wurde auch das dreidimensionale Wachstum untersucht. Die Zellen wurden in Softagar ausgesät und mit zehn aufsteigenden Konzentrationen eines jeden Liganden für 7 Tage inkubiert.

Die EGFR-Liganden konnten aufgrund des unterschiedlichen Verlaufs der Wachstumskurven, die sich aus der Inkubation der Zellen mit den Liganden ergaben, in zwei Gruppen, EGF/TGFA und AREG/EREG, eingeteilt werden. Die Liganden EGF und TGFA hatten bei vergleichbarer Konzentration einen stärkeren wachstumsstimulierenden Effekt als die Liganden AREG und EREG (Abb. 4- 5).

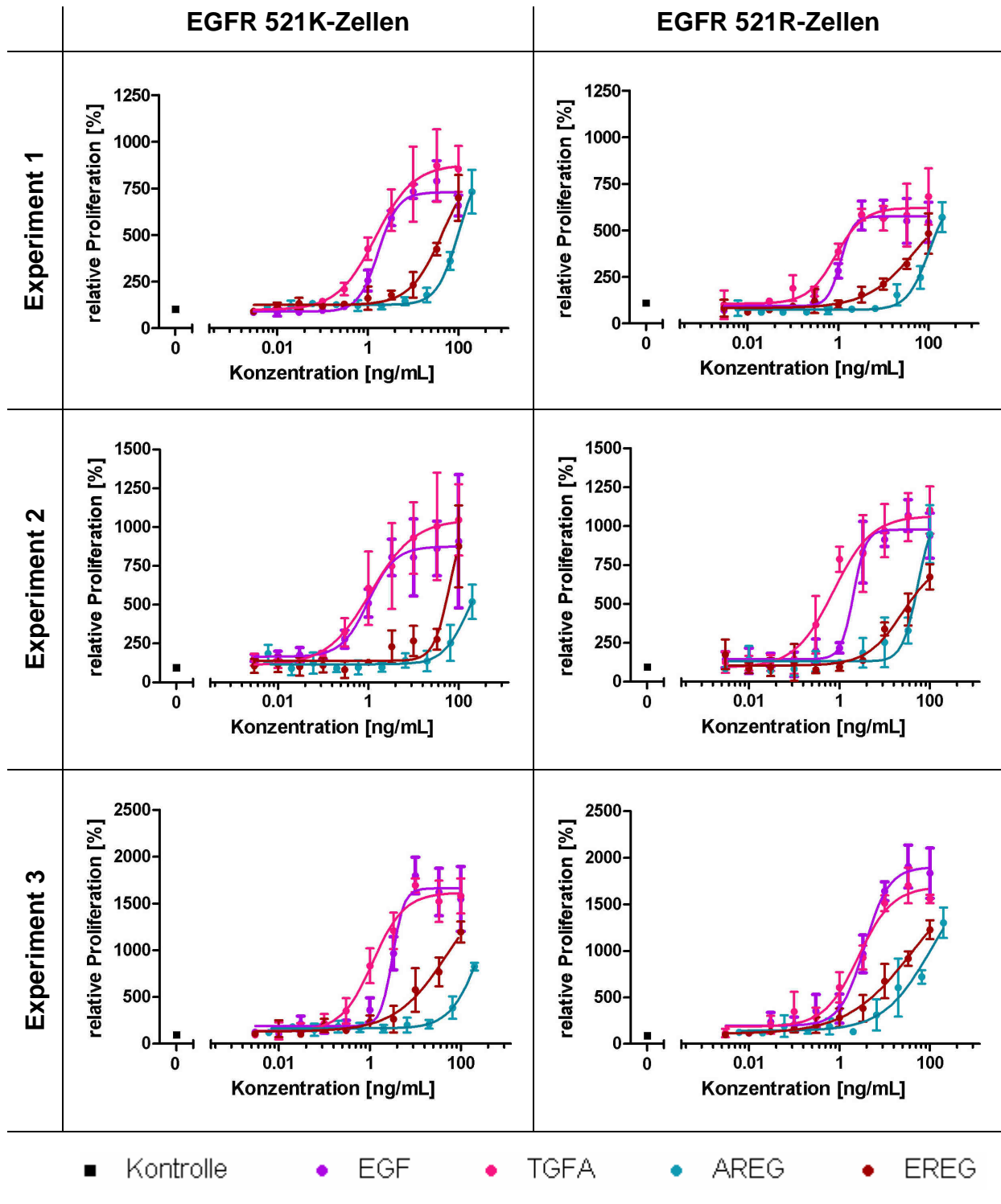


Abb. 4- 5: Konzentrations-Wirkungskurve der EGFR-Liganden bei NIH3T3-Zellen im Softagar.

Stabil transfizierte NIH3T3-Zellen wurden in Softagar ausgesät, mit unterschiedlichen Konzentrationen an EGFR-Liganden (zwischen 100 ng/mL und 0,003 ng/mL für EGF, TGFA und EREG und zwischen 200 ng/mL und 0,006 ng/mL für AREG) behandelt und für 7 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Fluoreszenz gemessen, nachdem die Zellen 6 h mit dem *Cell Titer Blue* Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: AREG, Amphiregulin; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Bei den meisten Experimenten stimulierte TGFA das Zellwachstum stärker als EGF, was auch in der niedrigeren EC_{50} für TGFA erkennbar war (Tab. 4- 2). Die Proliferation der Zellen setzte bei EGF meistens ab 1 ng/mL und bei TGFA vorwiegend ab 0,1 ng/mL ein. Bei EGF- und TGFA-Konzentrationen ab 10 ng/mL wurde bereits maximales Zellwachstum stimuliert, und Konzentrationen >10 ng/mL führten zu keiner weiteren Wachstumszunahme (Abb. 4- 5). Im Gegensatz dazu stimulierten AREG und EREG erst bei sehr hohen Konzentrationen das Wachstum der Zellen. Dabei konnte generell ab 3,3 ng/mL EREG und ab 20 ng/mL AREG Zellwachstum gesehen werden, das stärker war als das der unbehandelten Kontrollzellen. Das im Fall der mit EGF und TGFA behandelten Zellen beobachtete maximale Wachstum konnte nur durch die höchste Konzentration an EREG (100 ng/mL) und AREG (200 ng/mL) erreicht werden (Abb. 4- 5). In den meisten Fällen war die EC_{50} von AREG >100 (Tab. 4- 2).

Tab. 4- 2: Bestimmung der mittleren EC_{50} aus drei unabhängigen Softagar-Experimenten.

	EGFR 521K-Zellen				EGFR 521R-Zellen			
	EGF	TGFA	AREG	EREG	EGF	TGFA	AREG	EREG
EC_{50} [ng/mL] - E1	2	2	>100	45	1	1	>100	52
EC_{50} [ng/mL] - E2	1	1	>100	63	2	1	53	25
EC_{50} [ng/mL] - E3	3	1	>>100	52	4	3	>100	41

Abkürzungen: AREG, Amphiregulin; E, Experiment; EC_{50} , effektive Konzentration; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Wie auch im Monolayer-Assay beobachtet werden konnte, wuchsen EGFR 521R-Zellen unter unstimulierten Bedingungen stärker als EGFR 521K-Zellen (Abb. 4- 6). Im Gegensatz zum Monolayer-Assay waren zwischen den EGFR-Varianten keine starken Unterschiede im Liganden-abhängigen Ansprechen zu erkennen. Bei der Stimulierung der Zellen mit AREG und EREG gab es im Softagar-Assay eher einen Trend zu einem sensitiveren Ansprechen der EGFR 521R-Variante auf diese Liganden (Trend zu niedrigeren EC_{50} -Werten, Tab. 4- 2). Allerdings ergaben sich bei der Bestimmung der EC_{50} -Werte für EREG und AREG zum Teil große Schwankungen, die man durch die zur Bestimmung einer EC_{50} nicht optimalen Wachstumskurven erklären kann (Abb. 4- 5).

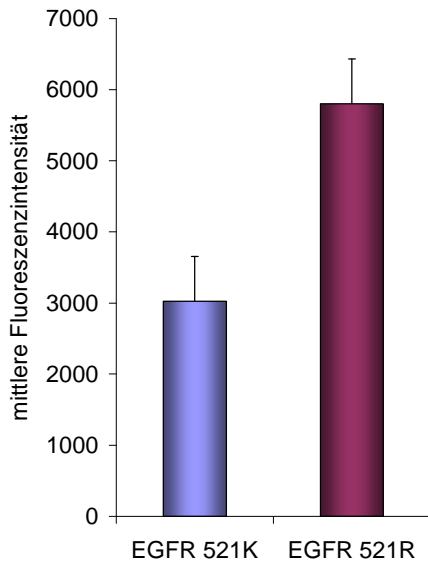


Abb. 4- 6: Proliferationsverhalten von stabil transfizierten NIH3T3-Zellen ohne Zugabe von EGFR-Liganden.

Stabil transfizierte NIH3T3-Zellen wurden in Softagar ausgesät, mit serumfreiem Medium überschichtet und für 7 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 6 h Inkubation der Zellen mit dem *Cell Titer Blue* Reagenz wurde die Fluoreszenz an einem Plattenlesegerät bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Abkürzungen: EGFR, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor.

4.1.2.3 Zusammenfassung des Kapitels 4.1.2

NIH3T3-Zellen, die stabil EGFR 521K oder EGFR 521R exprimierten, wurden mit den EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG oder EREG stimuliert. Effekte, die sich aus der Stimulierung der Zellen mit EGFR-Liganden oder aus der Expression der unterschiedlichen EGFR-Varianten ergaben, wurden sowohl im zwei- als auch im dreidimensionalen Wachstum untersucht.

Im Softagar-Assay stimulierten EGF und TGFA das Wachstum der Zellen schon bei relativ geringen Konzentrationen, während höhere Konzentrationen an AREG und EREG nötig waren, um Zellwachstum zu stimulieren. Im Monolayer-Assay wurden für EGF und AREG ähnliche Effekte gesehen wie im Softagar-Assay (AREG hatte die schwächste Wirkung auf das Wachstum der Zellen, EGF stimulierte starkes Wachstum). Dagegen war EREG im Monolayer-Assay potenter als TGFA, im Softagar-Assay stellte TGFA den potenteren Liganden dar.

Beim Vergleich der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen, die ohne Liganden inkubiert worden waren, zeigte sich, dass EGFR 521K-Zellen sowohl im Monolayer-Assay als auch im Softagar-Assay langsamer wuchsen als EGFR 521R-Zellen. Im zweidimensionalen Monolayer-Assay profitierten EGFR 521K-Zellen stärker von der Stimulierung mit Liganden und erreichten eine höhere maximale Proliferation, während im Softagar-Assay die Tendenz zu erkennen war, dass EGFR 521R-Zellen sensitiver als EGFR 521K-Zellen auf Stimulierung mit AREG und EREG reagierten.

4.1.3 Zeitverlauf der EGFR-Signaltransduktion

Nachdem die Effekte der EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG auf die Proliferation der Zellen betrachtet worden waren, stellte die EGFR-Signaltransduktion einen weiteren Aspekt dar, der im Zusammenhang mit den Unterschieden zwischen den EGFR-Liganden und zwischen den EGFR-Polymorphismen untersucht wurde. Dafür wurde sowohl die Phosphorylierung verschiedener Tyrosine des EGFR als auch die Aktivierung ausgewählter Proteine im EGFR-Signalweg geprüft.

4.1.3.1 Phosphorylierung des EGFR nach Stimulation mit Liganden

Zur Untersuchung der zeitabhängigen Phosphorylierung verschiedener Tyrosine (Y) des EGFR wurden die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen mit den EGFR-Liganden stimuliert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. Die Phosphorylierung der EGFR-Y wurde mit Hilfe eines Luminex-Assays untersucht, der folgende Vorteile bietet: (1) selbst geringe Mengen an (phosphoryliertem) Protein können detektiert werden, (2) die Ergebnisse können quantifiziert werden, (3) die Methode bietet einen hohen Durchsatz, wodurch die Proben eines Transfektanten in Doppelbestimmung auf einer Platte aufgetragen und miteinander verglichen werden konnten.

Die Phosphorylierungskurven, die sich aus der Stimulierung beider EGFR-Varianten mit unterschiedlichen Liganden ergaben, zeigten einen ähnlichen Verlauf für EGF und TGFA zum einen und für AREG und EREG zum anderen (Abb. 4- 7). Die Intensität der EGFR-Phosphorylierung nach EGF- oder TGFA-Behandlung fiel sehr viel stärker aus als nach AREG- oder EREG-Behandlung. Dabei war der Kurvenverlauf von EGF und TGFA näherungsweise linear, während für AREG und EREG ein oszillierender Kurvenverlauf festzustellen war.

Die Phosphorylierung der Y-Reste Y1068, Y1173 und Y845 war stärker als die der Y-Reste Y1045 und Y1086. Die Phosphorylierungskurven von Y1068, Y1173 und Y845, die sich aus der Stimulation eines Liganden ergaben, verliefen ähnlich. Auch bei Y1045 und Y1086 stimmten die Kurvenverläufe bei einem Liganden größtenteils überein (Abb. 4- 7).

Die stärkste Phosphorylierung aller untersuchten Y-Reste durch EGF und TGFA konnte bei beiden EGFR-Varianten nach 5 - 30 min detektiert werden. Danach nahm die Phosphorylierung ab. 24 h nach Stimulierung der Zellen mit EGF oder TGFA lag das Phosphorylierungsniveau aller Y-Reste auf oder unter dem Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4- 7).

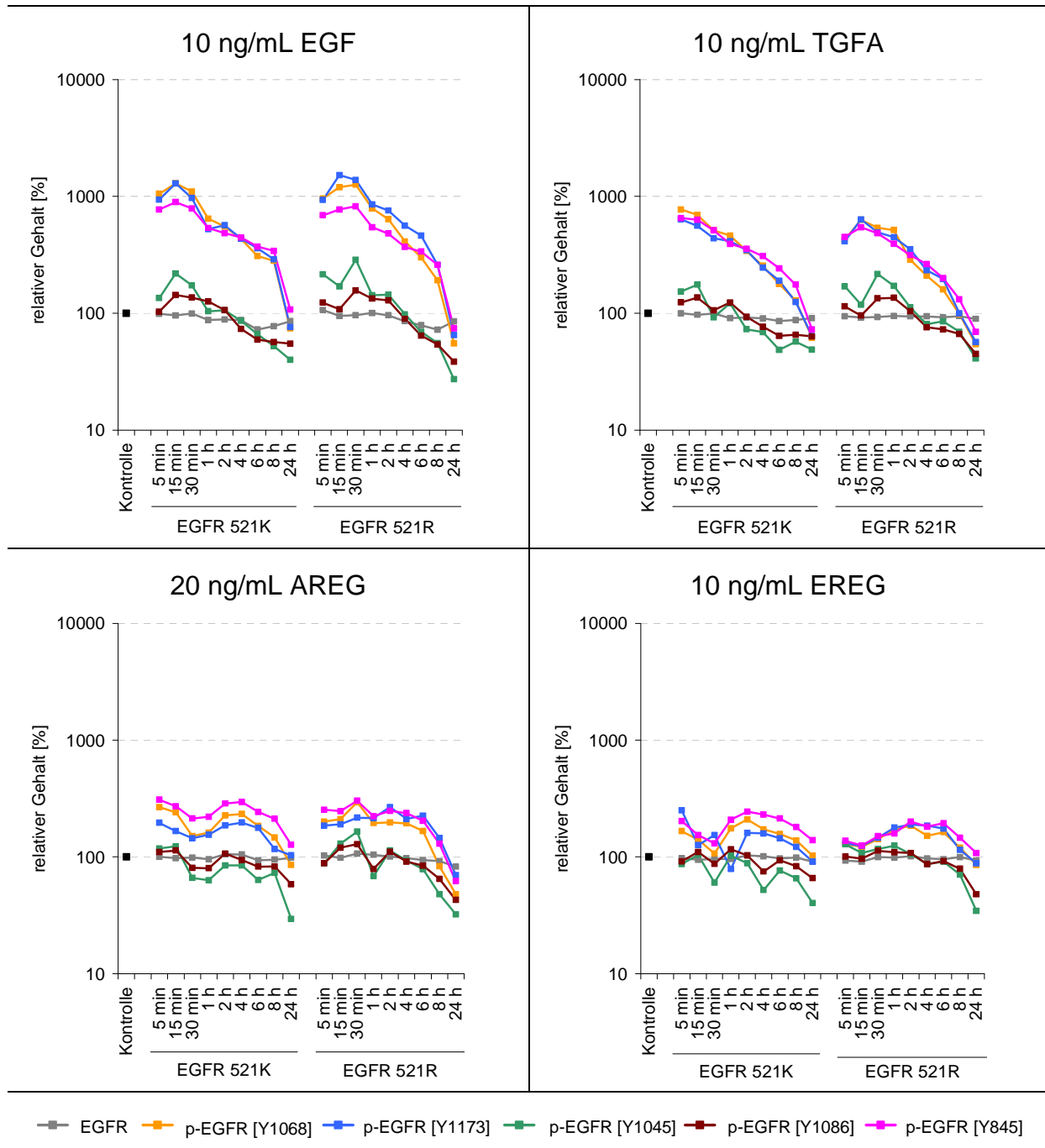


Abb. 4- 7: Zeitabhängige Expression und relative Phosphorylierung der EGFR-Varianten 521K und 521R nach Stimulierung mit EGFR-Liganden.

NIH3T3-Zellen, die stabil EGFR 521K oder EGFR 521R exprimierten, wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den EGFR-Liganden in den gezeigten Konzentrationen stimuliert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. Die Phosphorylierung verschiedener EGFR-Tyrosinreste (Y) und die EGFR-Expression wurden mittels eines Luminex-Assays untersucht. Es sind hier die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung gezeigt. Die Phosphorylierung der unbehandelten Kontrolle entspricht 100%; die Phosphorylierung aller Proben wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: AREG, Amphiregulin; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; p, phospho; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha; Y, Tyrosin.

Nach Stimulation mit AREG oder EREG ergab sich ein oszillierender Verlauf der EGFR-Phosphorylierung. Dabei wurde bei EGFR 521K eine anfangs erhöhte Phosphorylierung gesehen, welche bis 30 min nach Ligandenstimulierung abfiel. Dann begann ein erneuter Anstieg der Phosphorylierung, welcher 2 - 4 h nach Stimulierung seinen Höhepunkt erreichte. Der Phosphorylierungsverlauf der Y-Reste von EGFR 521R ähnelte grundsätzlich dem der Y-Reste von EGFR 521K, fiel aber vor allem nach EREG-Stimulation abgeflachter aus. Wie auch schon nach EGF- oder TGFA-Behandlung sank die Phosphorylierung der meisten EGFR-Y 24 h nach Behandlung mit AREG oder EREG auf oder unter das Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4- 7).

Neben der EGFR-Phosphorylierung wurde auch die Gesamtexpression des EGFR untersucht. Der EGFR-Gehalt änderte sich in Zellen, die mit TGFA, AREG oder EREG stimuliert wurden, nicht signifikant. Eine nennenswerte Degradierung des EGFR fand nur in Zellen statt, die mit EGF behandelt worden waren. Die Degradierung war 6 h bzw. 8 h nach Stimulierung am stärksten, 24 h nach Stimulierung näherte sich der EGFR-Gehalt wieder dem anfänglichen Niveau an (Abb. 4- 7).

In dieser Untersuchung konnten in den Kurvenverläufen der EGFR-Phosphorylierung zwischen den EGFR-Varianten kaum Unterschiede gefunden werden. Dagegen ließen die beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Kinetik der EGFR-Phosphorylierung eine Einteilung der EGFR-Liganden in die zwei Gruppen EGF/TGFA und AREG/EREG zu, wobei EGF und TGFA eine stärkere EGFR-Phosphorylierung bedingten als AREG und EREG. Des Weiteren stimmten die Kurvenverläufe in den Ligandengruppen überein: Der Kurvenverlauf bei EGF und TGFA war annähernd linear, bei AREG und EREG dagegen oszillierend (Abb. 4- 7).

Diese Beobachtungen reflektieren die Effekte, die sich bei den Konzentrations-Wirkungskurven im dreidimensionalen Wachstum gezeigt haben. Dabei stimulierten EGF und TGFA das Wachstum der Zellen schon bei geringeren Konzentrationen, während AREG und EREG Zellproliferation erst bei höheren Konzentrationen hervorriefen (Abb. 4- 5). Die Beobachtung, dass EREG im Monolayer auf das Zellwachstum potenter wirkte als TGFA, konnte mit dem Kurvenverlauf der EGFR-Phosphorylierung nicht korreliert werden.

4.1.3.2 Aktivierung von Signalproteinen nach Stimulation mit Liganden

Um Unterschiede zwischen den EGFR-Liganden einerseits und den EGFR-Varianten 521K und 521R andererseits zu beleuchten, wurde die zeitabhängige Aktivierung relevanter Proteine des EGFR-Signalwegs (ERK, p38 MAPK, SAPK/JNK, AKT, S6RP und c-Jun) nach Stimulierung der in serumfreiem Medium inkubierten NIH3T3-Zellen mit den vier EGFR-

Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG im Western Blot untersucht. Die hier gezeigten Western Blots stellen repräsentative Ergebnisse dar. Dabei sind aufgrund des Versuchsaufbaus nur bestimmte Vergleiche zulässig: Zwischen verschiedenen Liganden und/oder den EGFR-Varianten können nur die Phosphorylierungsverläufe verglichen werden, nicht aber die Intensität der Phosphorylierung.

Die Phosphorylierung von ERK war nach Behandlung der Zellen mit den EGFR-Liganden nach 5 - 30 min am intensivsten und hatte bis zu 1 h nach Stimulierung ein relativ hohes Niveau, das dann langsam abnahm.

Die Phosphorylierung von p38 MAPK begann 5 min nach Stimulierung der Zellen und konnte auch 1 h nach Stimulierung gut detektiert werden. Ab diesem Zeitpunkt fand eine Abnahme statt, und 24 h nach Stimulierung war keine Phosphorylierung mehr detektierbar (Abb. 4- 8).

Die stärkste SAPK/JNK-Phosphorylierung konnte 5 - 15 min nach Stimulierung der Zellen mit den EGFR-Liganden gemessen werden. 1 h nach Stimulierung entsprach das Niveau der Phosphorylierung etwa dem der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4- 8).

Bei S6RP konnte 5 min nach Stimulierung der Zellen mit den EGFR-Liganden eine leichte Phosphorylierung detektiert werden, die bei den nächsten Zeitpunkten weiter anstieg und 30 min – 2 h nach Stimulierung die stärkste Intensität erreichte. Nachdem die Phosphorylierung ihren Höhepunkt erreicht hatte, nahm sie ab und war 24 h nach Behandlung der Zellen nicht mehr detektierbar (Abb. 4- 8).

Die Aktivierung von c-Jun konnte 5 min nach Stimulierung der Zellen mit den EGFR-Liganden festgestellt werden. 15 min nach Stimulierung wurde die stärkste Phosphorylierung gemessen, die 30 min nach Behandlung der Zellen schwächer wurde. 4 h – 6 h nach Stimulierung konnte ein erneuter Anstieg der Phosphorylierung gesehen werden, der nach 8 h am stärksten war.

In der zeitabhängigen Phosphorylierung von ERK, p38 MAPK, SAPK/JNK, S6RP und c-Jun konnten kaum Unterschiede zwischen den EGFR-Varianten oder den Effekten der einzelnen Liganden gesehen werden (Abb. 4- 8).

Unterschiedliche Effekte der EGFR-Liganden konnten bei der Phosphorylierung von AKT gesehen werden: In allen Zellen konnte 5 min nach Stimulierung mit den EGFR-Liganden eine starke Phosphorylierung von AKT detektiert werden. Während 5 - 30 min nach Stimulierung der Zellen mit EGF oder TGFA die stärkste AKT-Phosphorylierung gefunden wurde und eine Abnahme der Phosphorylierung 1 - 2 h nach Stimulation der Zellen gesehen werden konnte, wurde bei AREG- bzw. EREG-stimulierten Zellen keine lineare Abnahme der Phosphorylierung festgestellt. Stattdessen war 5 min nach Stimulation der Zellen eine starke AKT-Phosphorylierung zu sehen, die im Zeitverlauf zuerst abnahm, dann aber erneut an

Intensität gewann (Abb. 4- 8). Dieser oszillierende Verlauf könnte den der EGFR-Phosphorylierung nach Stimulation mit AREG oder EREG widerspiegeln (Abb. 4- 7).

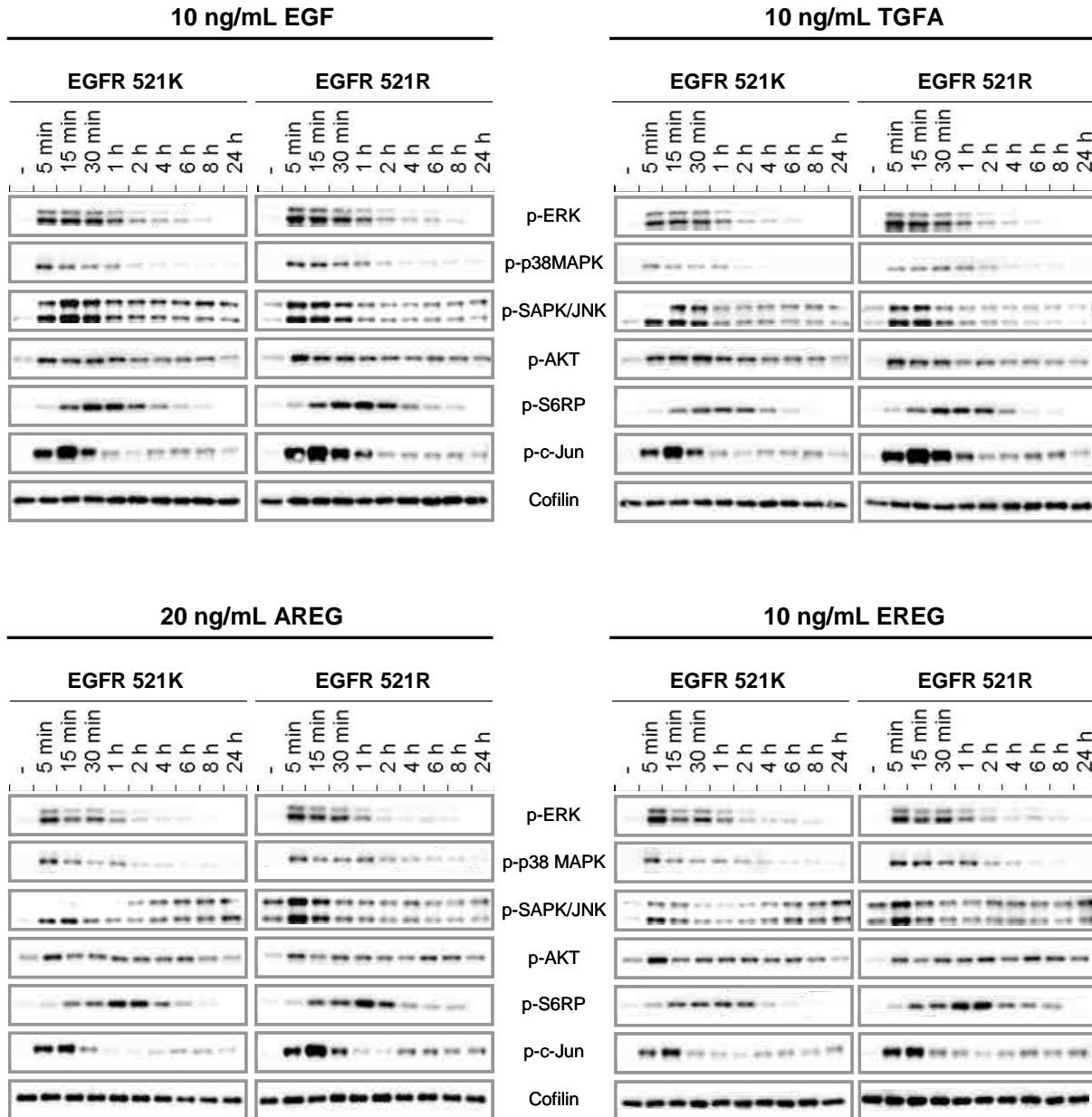


Abb. 4- 8: Zeitabhängige Aktivierung von Signalproteinen in EGFR 521K- bzw. EGFR 521R-Zellen nach Stimulierung mit EGFR-Liganden.

NIH3T3-Zellen, die stabil EGFR 521K oder EGFR 521R exprimierten, wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG oder EREG in den gezeigten Konzentrationen stimuliert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. Folgende Proteine wurden im Western Blot analysiert: p-ERK [T202/pY204], p-p38 MAPK [T180/Y182], p-SAPK/JNK [T183/Y185], p-AKT [S473], p-S6RP [S235/236], p-c-Jun [T93]. **Abkürzungen:** –, unbehandelt; AKT, Proteinkinase B; AREG, Amphiregulin; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epregulin; ERK, *Extracellular-signal regulated kinase*; MAPK, *Mitogen-activated protein kinase*; p, phospho; S6RP, S6 ribosomales Protein; SAPK/JNK, *stress-activated protein kinase / c-Jun N-terminal kinase*; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

4.1.3.3 Zusammenfassung des Kapitels 4.1.3

Die EGFR-Phosphorylierung und die Aktivierung von Signalproteinen wurde in EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen nach deren Stimulierung mit den EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG oder EREG untersucht, um unterschiedliche Effekte der Liganden und des EGFR-Polymorphismus näher zu beleuchten.

Wie auch schon im dreidimensionalen Wachstum erkannt werden konnte, vermittelten EGF/TGA einerseits und AREG/EREG andererseits ähnliche Effekte: Die EGFR-Liganden EGF und TGFA bedingten eine stärkere EGFR-Phosphorylierung und einen annähernd linearen Phosphorylierungsverlauf, während die EGFR-Liganden AREG und EREG eine geringe EGFR-Phosphorylierung auslösten und einen oszillierenden Kurvenverlauf bedingten. Dagegen konnten Unterschiede in der Liganden-vermittelten Signaltransduktion nur bei der AKT-Phosphorylierung detektiert werden, die allerdings die Einteilung der Liganden in die Gruppen EGF/TGFA und AREG/EREG unterstützten.

Die Expression der EGFR-Varianten führte zu keinem veränderten Ansprechen auf EGFR-Liganden in der EGFR-Signaltransduktion.

4.1.4 Genprofil nach Stimulation mit EGFR-Liganden

Unterschiede, die sich durch die Expression der EGFR-Varianten und durch die Stimulierung der Zellen mit unterschiedlichen EGFR-Liganden ergaben, wurden mit Hilfe von Transkriptom-Analysen mittels Genexpressions-Chips (Affymetrix) bestimmt. Dafür wurden in serumfreiem Medium inkubierte NIH3T3-Zellen, die stabil EGFR 521K, EGFR 521R oder Leervektor exprimierten, mit den EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG oder EREG stimuliert und nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h lysiert. Als Kontrollen wurden Zellen für jeden Zeitpunkt sowie zum Zeitpunkt 0 h mit serumfreiem Medium behandelt. Für alle Zeitpunkte wurden Triplikate angefertigt (Tab. 4- 3). Von den Leervektor-Zellen wurden Proben herangezogen, die 0 h und 6 h nach Stimulierung genommen wurden. Auf weitere Zeitpunkte wurde verzichtet, da in einem Vorversuch gezeigt wurde, dass Stimulation der Leervektor-Zellen mit den EGFR-Liganden keine signifikanten Effekte auf die Expression von Genen auslöste (Daten nicht gezeigt). Die Planung der nachfolgenden Analysen erfolgte in gemeinsamen Gesprächen mit Dr. Eike Staub (Abteilung Bioinformatics, Firma Merck KGaA), der anschließend alle statistischen Verfahren implementiert hat. Alle Resultate und Abbildungen, die in diesem Kapitel gezeigt sind, wurden von Dr. Eike Staub bereitgestellt.

Tab. 4- 3: Versuchsaufbau für die Affymetrix-Analyse

Zellen	stimuliert mit	0 h	1 h	3 h	6 h	24 h
EGFR 521R	–	+++	+++	+++	+++	+++
	EGF		+++	+++	+++	+++
	TGFA		+++	+++	+++	+++
	AREG		+++	+++	+++	+++
	EREG		+++	+++	+++	+++
EGFR 521K	–	+++	+++	+++	+++	+++
	EGF		+++	+++	+++	+++
	TGFA		+++	+++	+++	+++
	AREG		+++	+++	+++	+++
	EREG		+++	+++	+++	+++
Leervektor	–	+++			+++	
	EGF				+++	
	TGFA					
	AREG				+++	
	EREG					

Abkürzungen: –, unbehandelt; +++, Triplikat; AREG, Amphiregulin; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; h, Stunde(n); TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

4.1.4.1 Unterschiede zwischen den EGFR-Varianten

Die globalen Effekte auf die Gentranskription, die sich aus der stabilen Transfektion der EGFR-Variante 521K oder 521R oder des Leervektors ergaben, wurden mit Hilfe der Proben untersucht, die 0 h und 6 h nach Stimulation genommen wurden.

Abb. 4- 9 stellt die Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA) der Microarray-Studie für die Proben bei den Zeitpunkten 0 h und 6 h dar. Durch die PCA wurde das multidimensionale Genprofil, das sich aus der Analyse von 20448 untersuchten Genen ergab, auf einen dreidimensionalen Raum reduziert. Dabei steht ein Punkt für einen experimentellen Ansatz. Die PCA zeigt, dass die Unterschiede für die Gruppierung der Experimente eher durch die EGFR-Varianten als durch die Stimulation mit den EGFR-Liganden zustande kamen.

Dies weist einerseits auf Unterschiede in der Genexpression zwischen den Zellen hin, die den EGFR und den Leervektor exprimieren, aber auch auf Unterschiede, die sich ohne zusätzliche Stimulation aus der Expression der EGFR-Varianten ergaben.

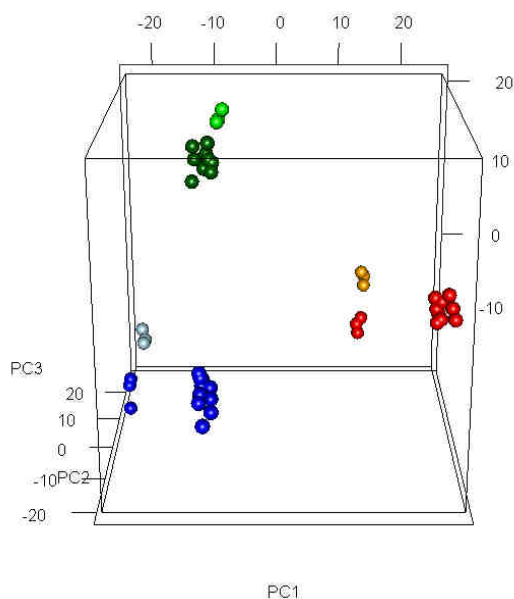


Abb. 4- 9: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Genexpressionsprofile von stimulierten und unstimulierten NIH3T3-Zellen, die stabil humanen EGFR 521K, EGFR 521R oder Leervektor exprimieren.

Stabil transfizierte NIH3T3-Zellen wurden 0 h oder 6 h nach Stimulierung mit EGFR-Liganden (10 ng/mL EGF, TGFA, EREG oder 20 ng/mL AREG) bzw. Medium lysiert. Die mittels Microarray-Analyse ermittelten Genexpressionsprofile wurden durch eine PCA auf ein dreidimensionales Profil reduziert. Triplikate sind durch drei gleichfarbige Punkte dargestellt.

Hellgrün: Leervektor bei 0 h. Dunkelgrün: Leervektor nach 6 h. Hellblau: EGFR 521R bei 0 h. Dunkelblau: EGFR 521R nach 6 h. Orange: EGFR 521K bei 0 h. Rot: EGFR 521K nach 6 h.
Abkürzungen: PC, *principal component*.

Um die von EGFR 521R und EGFR 521K induzierten Expressionsunterschiede näher zu untersuchen, wurden die Expressionsprofile einzelner Gene von unstimulierten Proben der Zeitpunkte 0 h und 1 h mit Hilfe eines linearen Modells der Genexpression in Abhängigkeit von Zeitpunkt und EGFR-Variante untersucht. Der Einfluss der EGFR-Variante auf die Genexpression wurde bei einem Regressionskoeffizienten von $|\beta(521R/521K)| > 1.5$ (entspricht ca. 2,8-facher Überexpression einer Variante) und einem p-Wert von $p < 0,0001$ als signifikant erachtet. Dies resultierte in 221 hochregulierten Genen für EGFR 521K und 217 hochregulierten Genen für EGFR 521R. Die 110 Gene, die am stärksten reguliert wurden, sind in Tab. 4- 4 dargestellt.

Besonders auffällig war die Expression des murinen *Egfr*, die im Vergleich zu Leervektor-Zellen verringert in EGFR 521K-Zellen und erhöht in EGFR 521R-Zellen war (Abb. 4- 10). Dagegen blieb die Expression von *ErbB2*, *ErbB3* und *ErbB4* durch die Expression der EGFR-Varianten annähernd unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Ebenso wirkte sich die Expression der EGFR-Varianten kaum auf die Expression der EGFR-Liganden *Egf* und *Tgfa* aus. *Areg* und *Ereg* waren in EGFR 521R-Zellen geringer exprimiert als in EGFR 521K-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Auch die Expression von Zellzyklus-assoziierten Genen wurde durch die EGFR-Varianten beeinflusst: So konnte in EGFR 521K-Zellen eine Expression des Tumorsuppressorgens *Cdkn1a* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) detektiert werden, die stärker war als in Leervektor-Zellen. Dagegen exprimierten EGFR 521R-Zellen weniger *Cdkn1a* als Leervektor-Zellen (Abb. 4- 10).

Tab. 4- 4 Gene, die durch Expression der EGFR-Varianten 521K und 521R differentiell exprimiert wurden.

Probeset ID	Gensymbol	Genname	beta (521R/521K)	p-Wert
1453223_s_at	Dppa2	developmental pluripotency associated 2	-6,36	4,6E-14
1437195_x_at	Mapk10	mitogen-activated protein kinase 10	-5,01	9,8E-12
1426865_a_at	Ncam1	neural cell adhesion molecule 1	-4,76	1,9E-12
1424927_at	Glipr1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	-4,73	8,6E-12
1447886_at	0610040B09Rik	RIKEN cDNA 0610040B09 gene	-4,30	3,0E-13
1430667_at	Pcdh10	protocadherin 10	-4,29	2,8E-11
1429687_at	Cox7b2	cytochrome c oxidase subunit VIIb2	-4,14	2,1E-11
1457179_at	Nlrp4e	NLR family, pyrin domain containing 4E	-3,80	1,1E-11
1429573_at	Dmrtc1a	DMRT-like family C1a	-3,62	3,5E-11
1434191_at	Tmem195	transmembrane protein 195	-3,56	3,5E-13
1430762_at	4833427G06Rik	RIKEN cDNA 4833427G06 gene	-3,40	6,1E-11
1448592_at	Crtap	cartilage associated protein	-3,37	6,8E-12
1420553_x_at	Serpina1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A	-3,26	2,5E-09
1436683_at	1700011M02Rik	RIKEN cDNA 1700011M02 gene	-3,25	2,6E-09
1460226_at	Trap1a	tumor rejection antigen P1A	-3,14	1,0E-08
1429511_at	4933402E13Rik	RIKEN cDNA 4933402E13 gene	-2,89	3,5E-09
1436825_a_at	A630095E13Rik	RIKEN cDNA A630095E13 gene	-2,84	6,0E-11
1427301_at	Cd48	CD48 antigen	-2,82	1,1E-11
1419704_at	Cyp3a41a	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 41A	-2,75	2,7E-08
1452249_at	Prickle1	prickle homolog 1 (Drosophila)	-2,69	2,9E-08
1416645_a_at	Afp	alpha fetoprotein	-2,61	2,9E-12
1430162_at	3830417A13Rik	RIKEN cDNA 3830417A13 gene	-2,56	5,5E-09
1434051_s_at	Hspa12a	heat shock protein 12A	-2,56	1,6E-11
1434728_at	Gria3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	-2,52	2,2E-09
1417061_at	Slc40a1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	-2,51	1,7E-09
1417185_at	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	-2,45	3,0E-09
1421679_a_at	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	-2,36	3,7E-08
1422706_at	Pmepa1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	-2,30	3,5E-10
1435337_at	Tshz3	teashirt zinc finger family member 3	-2,23	1,2E-08
1435293_at	Adam22	a disintegrin and metallopeptidase domain 22	-2,20	1,0E-07
1421882_a_at	Elavl2	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)	-2,15	1,7E-09
1448919_at	Cd302	CD302 antigen	-2,07	1,0E-11
1419473_a_at	Cck	cholecystokinin	-2,06	3,4E-06
1448321_at	Smoc1	SPARC related modular calcium binding 1	-2,05	3,2E-09
1454171_x_at	9530053H05Rik	RIKEN cDNA 9530053H05 gene	-1,99	1,4E-10
1422645_at	Hfe	hemochromatosis	-1,98	2,3E-07
1437868_at	Fam46a	family with sequence similarity 46, member A	-1,95	3,6E-09
1440085_at	Eda2r	ectodysplasin A2 isoform receptor	-1,95	7,1E-09
1434993_at	Fam5c	family with sequence similarity 5, member C	-1,93	1,3E-07
1456035_at	Nxf3	nuclear RNA export factor 3	-1,93	7,6E-08
1427445_a_at	Ttn	titin	-1,90	2,0E-06
1432826_a_at	Cd80	CD80 antigen	-1,86	5,9E-08
1422340_a_at	Actg2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	-1,81	2,7E-07
1418400_at	Larp6	La ribonucleoprotein domain family, member 6	-1,81	3,6E-07
1449271_a_at	Hebp2	heme binding protein 2	-1,79	9,8E-07
1433525_at	Ednra	endothelin receptor type A	-1,78	5,4E-09
1424824_at	Slain1	SLAIN motif family, member 1	-1,77	1,1E-06
1422438_at	Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	-1,76	1,8E-10
1416926_at	Trp53inp1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	-1,76	9,8E-10
1440557_at	lpw	imprinted gene in the Prader-Willi syndrome region	-1,74	2,2E-09
1436742_a_at	Accsl	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homolog (Arabidopsis)(non-functional)-like	-1,72	8,1E-07
1448152_at	Igf2	insulin-like growth factor 2	-1,70	6,5E-08
1435582_at	Wdfy4	WD repeat and FYVE domain containing 4	-1,70	1,9E-07
1429597_at	Dppa4	developmental pluripotency associated 4	-1,66	6,5E-08
1450793_at	4930550L24Rik	RIKEN cDNA 4930550L24 gene	-1,65	6,3E-10

Probeset ID	Gensymbol	Genname	beta (521R/521K)	p-Wert
1448254_at	Ptn	pleiotrophin	4,51	6,1E-13
1435888_at	Egfr	epidermal growth factor receptor	3,43	3,8E-11
1428629_at	Zfp518	zinc finger protein 518	3,43	3,5E-10
1438530_at	Tfpi	tissue factor pathway inhibitor	3,41	4,8E-11
1453187_at	Ociad2	OClA domain containing 2	3,02	1,2E-08
1417644_at	Sspn	sarcospan	2,86	1,6E-09
1434510_at	Papss2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	2,69	6,3E-10
1439055_at	Gm15698	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 pseudogene	2,40	1,6E-09
1418704_at	S100a13	S100 calcium binding protein A13	2,26	1,3E-09
1416468_at	Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	1,99	4,0E-07
1434645_at	C530008M17Rik	RIKEN cDNA C530008M17 gene	1,93	2,7E-06
1449396_at	Aoc3	amine oxidase, copper containing 3	1,91	1,8E-06
1439036_a_at	Atp1b1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	1,82	6,2E-12
1439397_at	Fmn1	formin 1	1,80	1,6E-08
1437089_at	Pyroxd2	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2	1,76	5,7E-08
1421217_a_at	Lgals9	lectin, galactose binding, soluble 9	1,74	3,1E-09
1459838_s_at	Btbd11	BTB (POZ) domain containing 11	1,71	1,9E-09
1427202_at	4833442J19Rik	RIKEN cDNA 4833442J19 gene	1,71	3,0E-06
1421153_at	Loxl4	lysyl oxidase-like 4	1,69	1,7E-06
1448557_at	Fam13c	family with sequence similarity 13, member C	1,69	3,7E-08
1419811_at	Adcy9	adenylate cyclase 9	1,67	1,7E-07
1428774_at	Gpc6	glypican 6	1,67	5,3E-07
1425719_a_at	Nmi	N-myc (and STAT) interactor	1,63	3,0E-10
1429348_at	Sema3c	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	1,57	3,9E-09
1436545_at	Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	1,53	3,3E-07
1450429_at	Capn6	calpain 6	1,52	1,4E-08
1457045_at	Galnt13	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13	1,50	8,2E-09
1457102_at	A030001D16Rik	RIKEN cDNA A030001D16 gene	1,50	5,2E-07
1423436_at	Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3	1,49	4,7E-07
1460602_at	Dlc1	deleted in liver cancer 1	1,46	4,7E-08
1433553_at	Garnl3	GTPase activating RANGAP domain-like 3	1,45	1,3E-08
1434581_at	2410066E13Rik	RIKEN cDNA 2410066E13 gene	1,36	2,8E-06
1423732_at	Tram1	translocating chain-associating membrane protein 1	1,36	1,4E-12
1448785_at	Runx1t1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)	1,32	9,9E-07
1453770_at	Cpa4	carboxypeptidase A4	1,32	1,0E-05
1450144_at	Pla2r1	phospholipase A2 receptor 1	1,31	5,6E-08
1415832_at	Agtr2	angiotensin II receptor, type 2	1,30	6,6E-07
1449799_s_at	Pkp2	plakophilin 2	1,30	8,7E-07
1433514_at	Etnk1	ethanolamine kinase 1	1,29	1,8E-09
1435933_at	Scn2a1	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1	1,28	1,3E-06
1433944_at	Hectd2	HECT domain containing 2	1,28	1,9E-07
1449583_at	Pcdhb20	protocadherin beta 20	1,27	3,7E-06
1448830_at	Dusp1	dual specificity phosphatase 1	1,26	4,1E-09
1418979_at	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	1,25	1,3E-07
1443841_x_at	Uap111	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1	1,24	2,8E-06
1434539_at	Lrrn3	leucine rich repeat protein 3, neuronal	1,23	8,0E-07
1417399_at	Gas6	growth arrest specific 6	1,22	1,8E-08
1415806_at	Plat	plasminogen activator, tissue	1,22	2,3E-08
1421425_a_at	Rcan2	regulator of calcineurin 2	1,22	2,7E-07
1417980_a_at	Insig2	insulin induced gene 2	1,22	5,4E-08
1437401_at	Igf1	insulin-like growth factor 1	1,21	3,4E-07
1428896_at	Pdgfrl	platelet-derived growth factor receptor-like	1,21	1,4E-07
1437181_at	Peli2	pellino 2	1,21	2,7E-06
1426155_a_at	Osr2	odd-skipped related 2 (Drosophila)	1,21	1,1E-06
1447854_s_at	Hist2h2be	histone cluster 2, H2be	1,21	9,1E-08

Für alle untersuchten Gene (n=20448) wurde die Abhängigkeit der Genexpression von der EGFR-Variante (521R/521K) unter Zugrundelegung der Zeitpunkte 0 h und 1 h linear modelliert. Der beta-Koeffizient ist ein Maß für die absolute mittlere Änderung einer Genexpression. Der p-Wert ist ein Maß für die Signifikanz des Einflusses der EGFR-Variante (Signifikanz für die Abweichung des beta-Koeffizienten von Null). Gezeigt sind die 55 Gene, die in EGFR 521K-Zellen am stärksten reguliert waren (negativer beta-Koeffizient), und die 55 Gene, die in EGFR 521R-Zellen am stärksten reguliert vorlagen (positiver beta-Koeffizient).

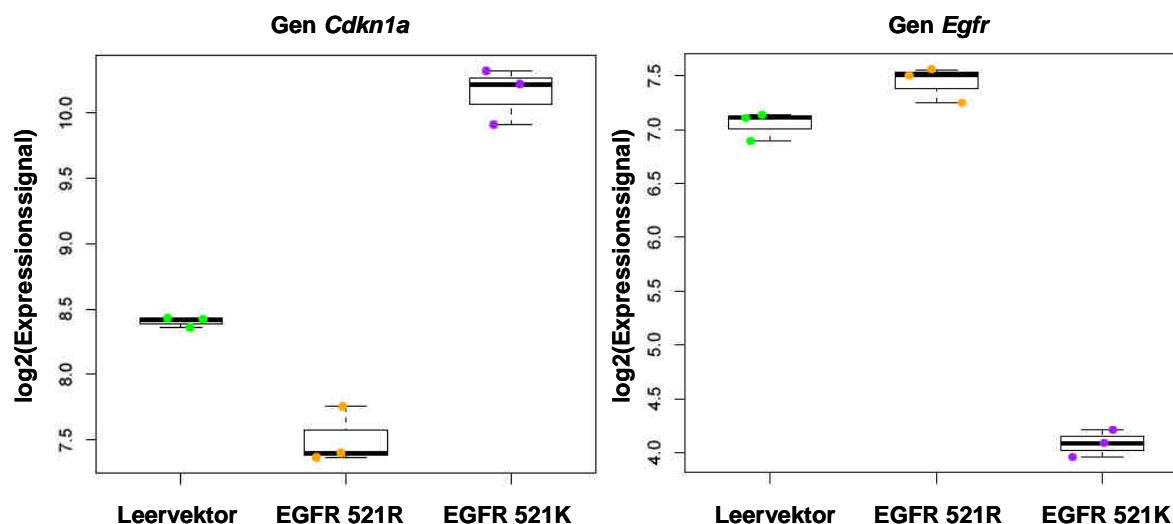


Abb. 4- 10: Box-Whisker-Plots ausgewählter Gene, deren Expression von der Wahl der EGFR-Variante beeinflusst wird.

Die Expression der murinen Gene *Egfr* und *Cdkn1a* in unbehandelten NIH3T3-Zellen (Zeitpunkt 0 h), die EGFR 521K, EGFR 521R oder Leervektor stabil exprimieren, wurde in Box-Whisker-Plots abgebildet. Triplikate sind durch drei gleichfarbige Punkte dargestellt. Abkürzungen: *Cdkn1a*, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*; EGFR, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor.

Neben der Betrachtung einzelner Gene wurde untersucht, ob bestimmte molekulare Prozesse oder Funktionen von den durch die EGFR-Varianten 521R und 521K induzierten Expressionsänderungen betroffen waren.

Um dieses unvoreingenommen zu untersuchen, wurden die beiden Listen der 217 / 221 (EGFR 521R / EGFR 521K) Gene, die am stärksten hoch- oder runterreguliert waren, mit Hilfe der Gene Ontology (GO) Datenbank untersucht. Die beiden Genlisten wurden mit GO Gensets verglichen, die Gengruppen gemäß dreier Ontologien bilden: (1) biologische Prozesse, (2) zelluläre Komponenten und (3) molekulare Funktionen. Unter den Genen, die in EGFR 521R-Zellen höher exprimiert waren, befanden sich mehr Gene als zufällig erwartet ($p < 0,001$) der biologischen Prozesse „Signaltransduktion“, „Zellmorphogenese“ und „Blutgefäßentwicklung“, der zellulären Komponenten „extrazelluläre Matrix“ und „Basalmembran“ und der molekularen Funktionen „Carbohydratbindung“, „GTPase Regulation“ und „Wachstumsfaktorbindung“. Unter den Genen, die in EGFR 521K-Zellen stärker reguliert wurden, waren die biologischen Prozesse „Zelltod“, „Muskelgewebe-Entwicklung“ und „Zellzyklusarrest“ besonders stark repräsentiert.

Da die GO-Analysen einen Zusammenhang zwischen Genen der Zellzykluskontrolle und der Expression der EGFR-Varianten nahelegten, wurde in einer detaillierteren Analyse ein besonderer Fokus auf die Regulation von zwei Gengruppen gelegt: (1) Gene, die für Zellzyklusregulatoren kodieren, und (2) Gene, deren Transkription nach Wachstumsfaktorgabe besonders früh reguliert wird (die sogenannten *immediate early genes*). Dazu wurden mit

Hilfe der IPA Software und einer Genliste aus Tullai *et al.* (2007) zwei literaturbasierte Netzwerke von Genen aufgestellt. Gene dieser Netzwerke stehen paarweise in funktionalem Zusammenhang zueinander und können entweder den Funktionen „frühe Wachstumsfaktor-Antwort“ oder „Zellzyklusregulation“ zugerechnet werden (Abb. 4- 11 A und B).

Die aufsummierten Expressionsintensitäten für die Gene dieser Netzwerke zeigten, dass die *immediate early genes* bereits nach 1 h hochreguliert und danach wieder abgeschaltet wurden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob EGFR 521K oder EGFR 521R exprimiert wurde (Abb. 4- 11 C). Unterschiede zwischen den EGFR-Varianten konnte man allerdings in den aufsummierten Profilen des regulatorischen Zellzyklusnetzwerks feststellen. Für diese Gengruppe ließ das Expressionsprofil einen klaren Trend zur Hochregulation mit fortschreitender Zeit nach Stimulation erkennen (Maximum bei 24 h für alle Liganden außer TGFA). Die Transkriptionslevel dieser Zellzyklusgene waren bei frühen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 3 h, 6 h) für EGFR 521K-Zellen höher, was auf eine differentielle Expression von regulatorischen Zellzyklusgenen hindeutet (Abb. 4- 11 D).

In Abb. 4- 12 sind Expressionsprofile zweier Gene dargestellt, die exemplarisch für die beschriebenen Effekte sind. *Jun* und *Fos* gehören zur Gruppe der *immediate early genes*, bei denen keine differentielle Expression zwischen den EGFR-Varianten festgestellt werden konnte (Abb. 4- 12 A). Dagegen wurden die Zellzyklus-assoziierten Gene *Ccnd1* (*Cyclin D1*) und *E2f1* stärker in EGFR 521K-Zellen induziert. Diese Genprofile weisen auf eine Besonderheit der Stimulation mit TGFA hin: Während die Expression dieser Gene 24 h nach Stimulation mit EGF, AREG und EREG maximal war, konnte bei Stimulation mit TGFA ein starker Abfall der Genexpression nach 24 h festgestellt werden (Abb. 4- 12 B).

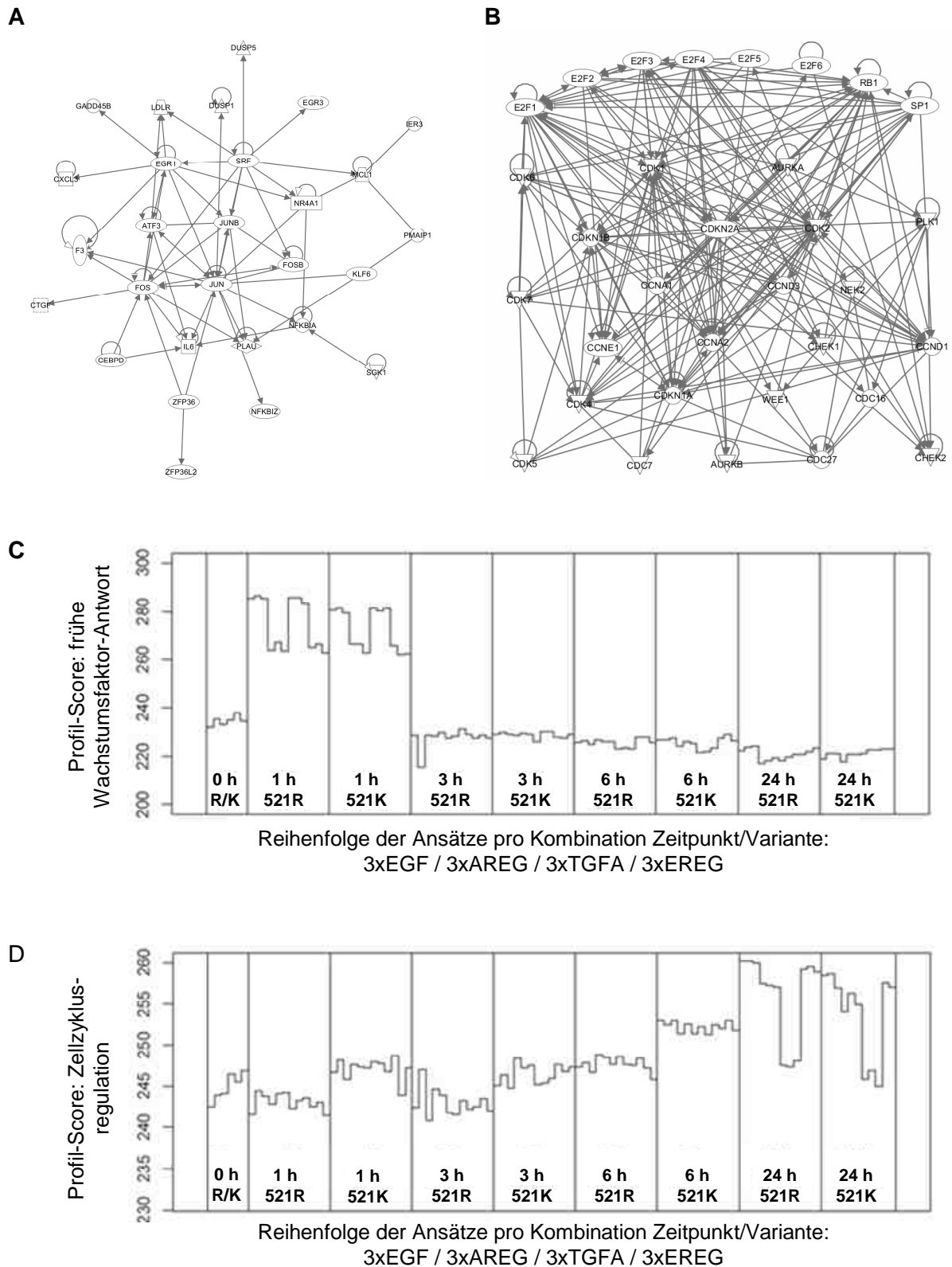


Abb. 4- 11: Profil-Analysen der Gennetzwerke „Frühe Wachstumsfaktor-Antwort“ und „Zellzyklusregulation“.

(A) Ingenuity-basiertes Literaturnetzwerk von Genen aus dem Bereich „frühe Wachstumsfaktor-Antwort“. (B) Ingenuity-basiertes Literaturnetzwerk von Genen aus dem Bereich „Zellzyklusregulation“. (C) Aufsummiertes Expressionsprofil der Gene des Netzwerks „frühe Wachstumsfaktor-Antwort“. (D) Aufsummiertes Expressionsprofil der Gene des Netzwerks „Zellzyklusregulation“. **Abkürzungen:** AREG, Amphiregulin; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EREG, Epiregulin; h, Stunde(n); TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

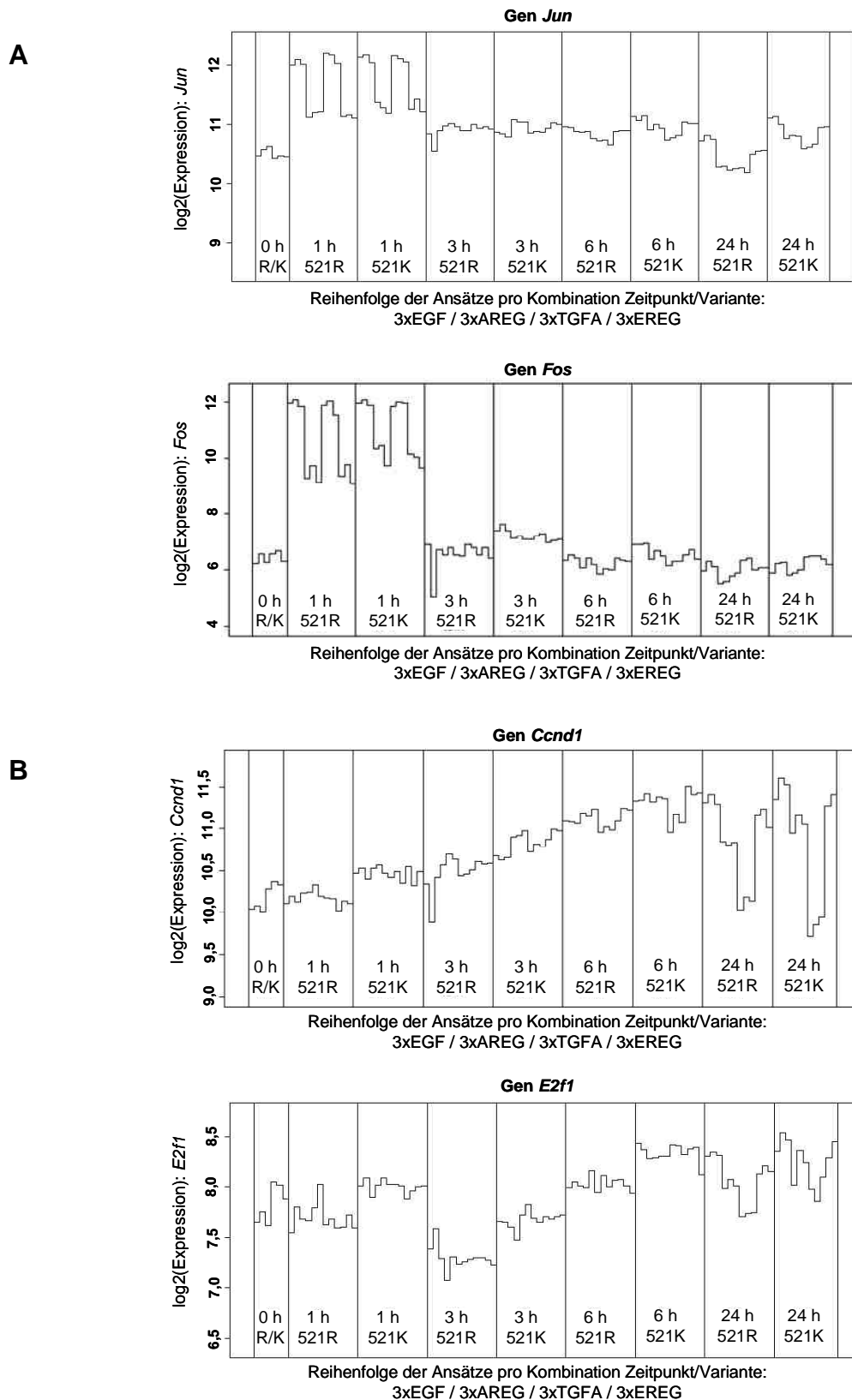


Abb. 4- 12: Expressionsprofile beispielhafter Gene aus den Bereichen „frühe Wachstumsfaktor-Antwort“ und „Zellzykluskontrolle“.

(A) *Jun* und *Fos* sind Gene der „frühen Wachstumsfaktor-Antwort“. (B) *Ccnd1* und *E2f1* sind Gene, die zentrale Funktionen in der Kontrolle des Zellzyklus haben. Abkürzungen: AREG, Amphiregulin; *Ccnd1*, *Cyclin D1*; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; *E2f1*, *E2f Transkriptionsfaktor 1*; EREG, Epiregulin; *Fos*, *v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*; h, Stunde(n); *Jun*, *v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog*; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

von dem transfizierten Vektor ab. In zwei separaten hierarchischen Clusteranalysen wurde der Einfluss der Liganden-Stimulierung und des Zeitpunktes auf die globalen Expressionsprofile untersucht. Den zweitgrößten Einfluss auf die Genexpression stellte der Zeitpunkt nach Stimulierung dar. Dabei bildeten die Proben, die 1 h, 3 h und 6 h nach Stimulation aufbereitet wurden, jeweils einen Cluster (Abb. 4- 13).

Den schwächsten Einflussfaktor für die globale Genexpression stellte der EGFR-Ligand dar, mit dem die Zellen stimuliert wurden. Die Hauptcluster ließen sich erneut einteilen und zwar in die Gruppen AREG/EREG, EGF/TGFA und unbehandelte Proben. Diese Einteilung war für die Proben, die 1 h, 3 h und 6 h nach Stimulierung genommen wurden, möglich. Dagegen konnten 24 h nach Stimulierung Unterschiede zwischen den Effekten der Liganden auf die Genexpression erkannt werden: während AREG/EREG und EGF jeweils einen Cluster bildeten, konnte eine Übereinstimmung zwischen den TGFA-stimulierten Proben und den unstimulierten Kontrollen gesehen werden, was dafür spricht, dass sich die durch TGFA-induzierten Expressionsänderungen nach 24 h wieder aufheben, es also eventuell eine negative Feedback-Kontrolle für TGFA-EGFR Induktion gibt (Abb. 4- 13).

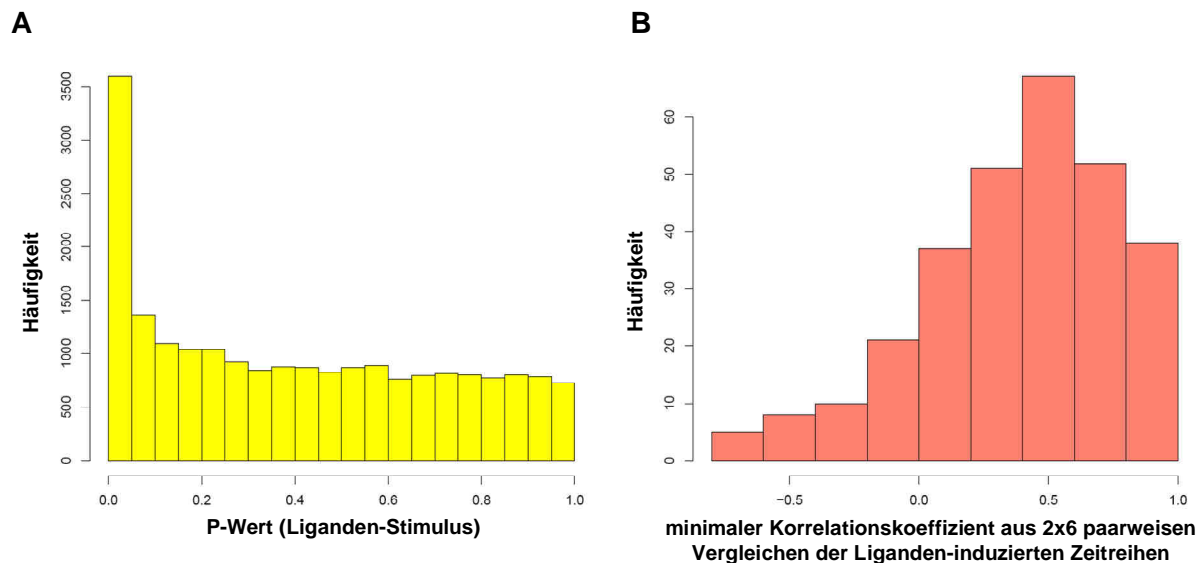


Abb. 4- 14: Globale oder „Genom“-weite Betrachtung der Liganden-induzierten Unterschiede in der Genexpression.

(A) Das Histogramm der p-Werte für die Signifikanz des Faktors Liganden-Stimulus in der multivariaten Analyse. (B) Verteilung der minimalen Korrelationskoeffizienten aus paarweisen Vergleichen der Liganden-spezifischen Zeitreihen.

Um Gene zu finden, die spezifisch von einzelnen Liganden reguliert werden, wurde die Expression jedes einzelnen Gens in einem linearen Modell untersucht. Die Expressionshöhe eines Gens wird in Abhängigkeit der Faktoren Liganden-Stimulus, Zeitpunkt nach Behandlung und EGFR-Variante modelliert. Gene, für die in der multivariaten Analyse der Faktor

Liganden-Stimulus gemäß ANOVA (*analysis of variance*) einen niedrigen p-Wert besitzen, können als Liganden-spezifisch regulierte Gene angesehen werden. Betrachtet man die Verteilung der p-Werte aller Gene, so ist eine starke Anreicherung von p-Werten nahe Null zu beobachten, ein Zeichen dafür, dass viele Gene von den Liganden differentiell reguliert werden (Abb. 4- 14 A). Bei einem Schwellenwert für den p-Wert von <0.0001 für den Faktor Liganden-Stimulus sind 289 Gene differentiell reguliert. Signifikante Testresultate können ihren Ursprung in einer unterschiedlichen Richtung der Expressionsänderungen haben, oder aber nur in einer unterschiedlich starken Deregulation bei gleichem Trend bedingt sein. Daher wurden für jedes der 289 Gene die vier Zeitreihen-Profile für die vier Liganden paarweise miteinander verglichen (2x6 Vergleiche für die EGFR-Varianten 521R und 521K). In der Verteilung der minimalen Korrelationskoeffizienten aus diesen 12 Vergleichen erkennt man ein deutliches Verteilungsmaximum bei einem minimalen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,5$ (Abb. 4- 14 B). Dies ist ein deutliches Zeichen dafür, dass die 289 Gene mehrheitlich deutlich positiv korrelierte Expressionsprofile über die Zeit hinweg für die vier Liganden aufweisen, es aber in der Stärke der Regulation durch die Liganden Unterschiede gibt.

Nach Identifikation der 289 Liganden-spezifisch differentiell exprimierten Gene wurden Tukey-Tests zur näheren Charakterisierung der Ursache der differentiellen Expression durchgeführt. Dabei wurde für jedes Liganden-Paar ermittelt, ob differentielle Regulation vorliegt. Es sind nur solche Gene dargestellt, die für mindestens zwei Liganden-Paare signifikante p-Werte besitzen ($p < 0.001$; 67 Gene). Mittels hierarchischem Clustering wurden die Gene auf Basis der negativen logarithmierten p-Werte aus den Tukey-Tests gruppiert. Die Gene lassen sich in drei Cluster einteilen. Das obere Cluster besteht aus 36 Genen, die zwischen EREG, AREG und EGF nicht differentiell reguliert sind, für die aber TGFA anscheinend differentiell exprimierte Profile im Vergleich mit den anderen drei Liganden aufweist. Dies weist auf eine Besonderheit der Regulation durch TGFA hin (Abb. 4- 15), die beispielsweise bei dem Zellzyklus-assoziierten Gen *Ccnd1* beobachtet werden konnte. Alle Liganden induzierten einen stufenweisen Anstieg der *Ccnd1*-Expression, die 6 h nach Stimulierung mit TGFA, AREG und EREG ihren höchsten Punkt erreicht hatte. Danach fiel das mRNA-Signal nur bei TGFA sehr stark ab. Dagegen zeigte sich bei AREG und EREG nur ein leichter Abfall und bei EGF fand 24 h nach Stimulierung ein leichter Anstieg des mRNA-Signals statt (Abb. 4- 16 A).

Das mittlere Cluster beinhaltet vier Gene, die nur für Vergleiche von EGF mit anderen Liganden signifikante Resultate haben. Diese Gene weisen anscheinend eine EGF-spezifische Antwort auf (Abb. 4- 15). Das untere Cluster (27 Gene) weist nur für die Vergleiche AREG/EREG und TGFA/EGF keine signifikanten Unterschiede auf, was auf eine Ähnlichkeit der Expressionsantworten nach Stimulation mit AREG/EREG sowie EGF/TGFA hindeutet.

Bei der Regulierung des Gens *Dusp1* (*Dual-specificity phosphatase 1*) wird dies deutlich: *Dusp1* erfährt 1 h nach Stimulation der Zellen mit EGF oder TGFA eine starke Induktion, während das Gen nach Stimulation mit AREG oder EREG nur gering induziert wird (Abb. 4-16 B). Da das Genprodukt von *Dusp1* zu einer Klasse von Proteinen gehört, die ERK, p38 MAPK und JNK dephosphorylieren [Bermudez *et al.*, 2010], könnten die Ergebnisse darauf hinweisen, dass der EGF- oder TGFA-induzierte MAPK-Signalweg vergleichsweise schnell deaktiviert wird, während der Signalweg länger aktiviert bleibt, wenn er durch AREG oder EREG aktiviert wurde.

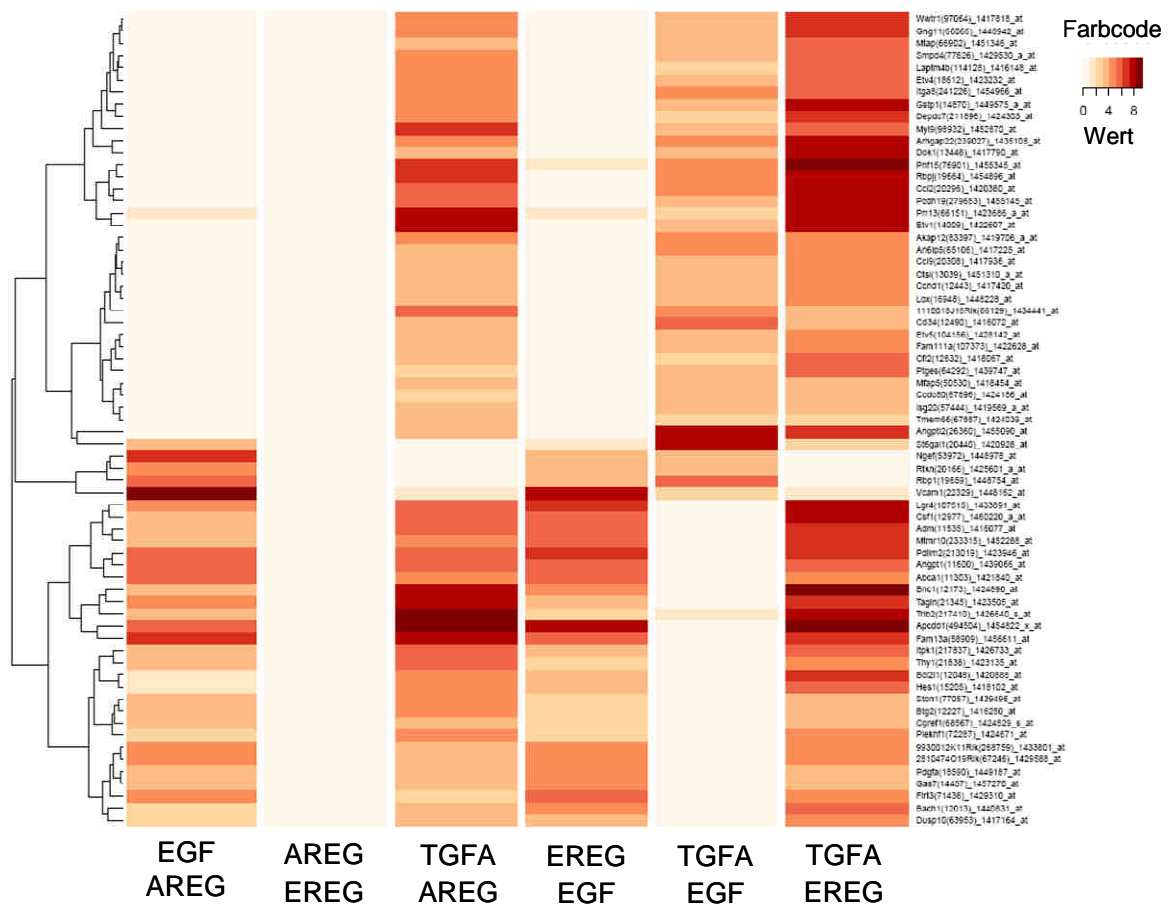
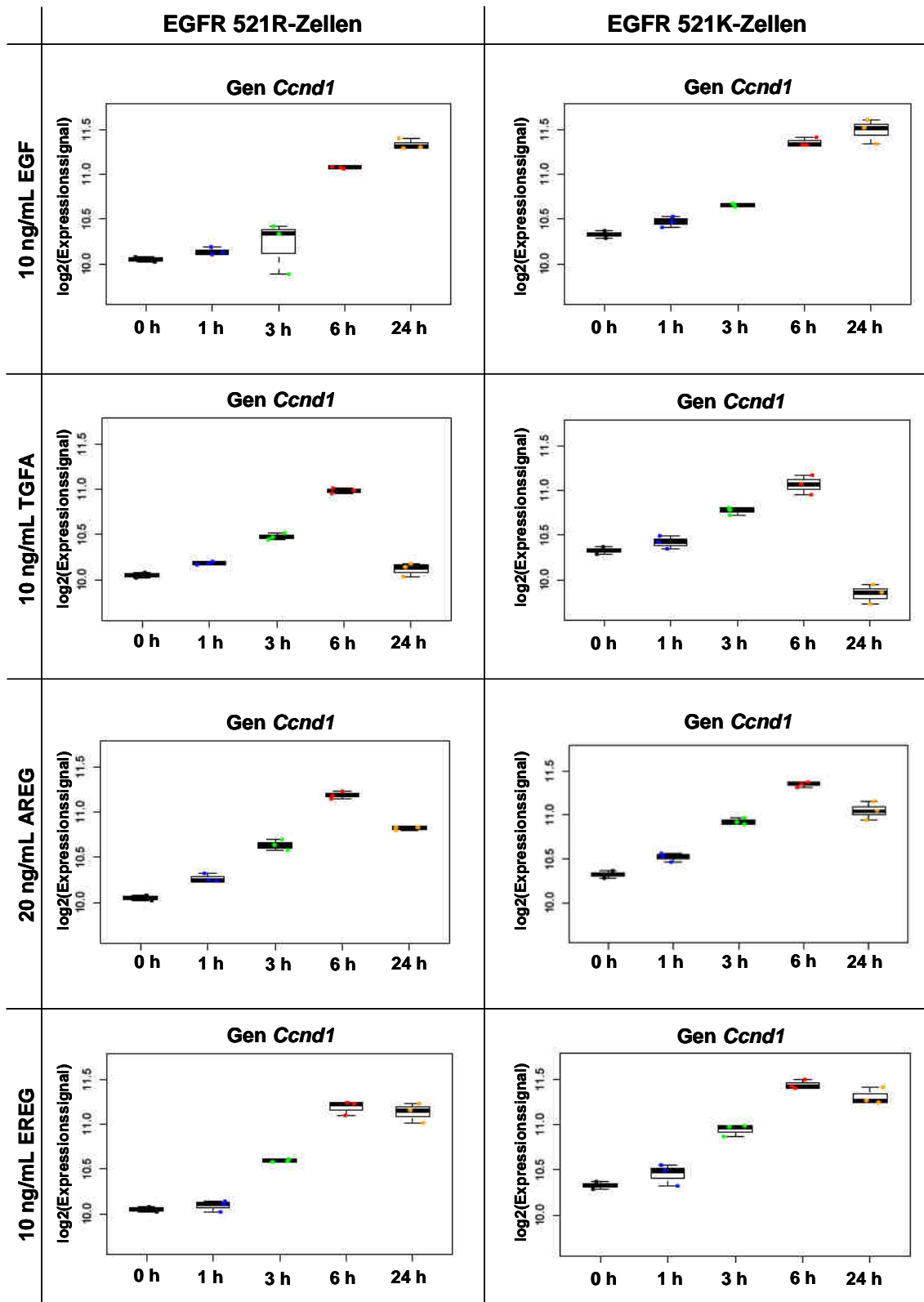


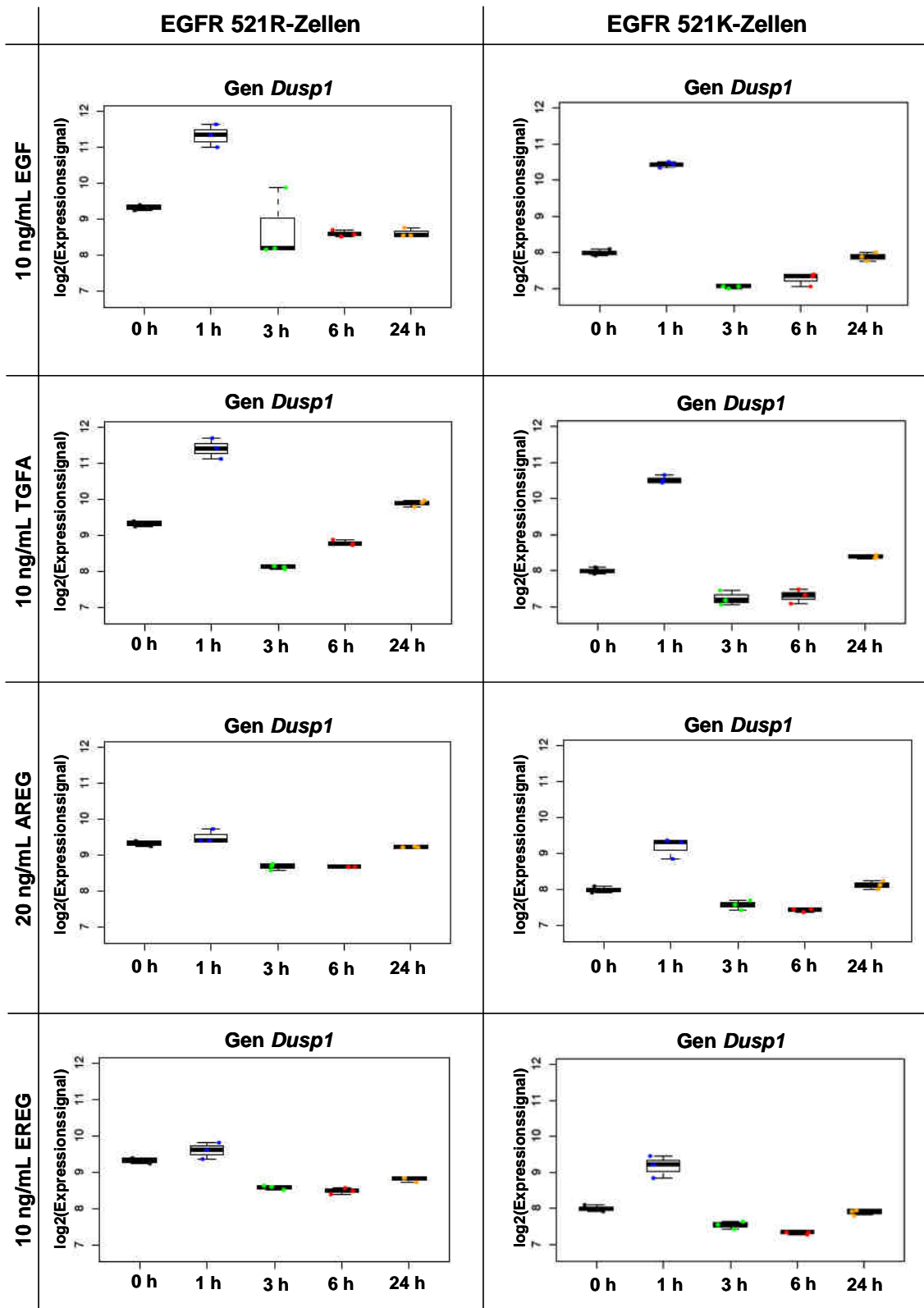
Abb. 4- 15: Liganden-spezifische Genexpression: hierarchisches Clustering der negativen log-transformierten p-Werte aus Tukey-Tests.

Die negativen Logarithmen der p-Werte aus den Tukey-Tests sind farbcodiert und geclustert dargestellt (rot entspricht hoher Signifikanz). Jede Reihe repräsentiert ein Gen und jede Spalte repräsentiert ein Ligandenpaar. **Abkürzungen:** AREG, Amphiregulin; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EREG, Epregulin; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

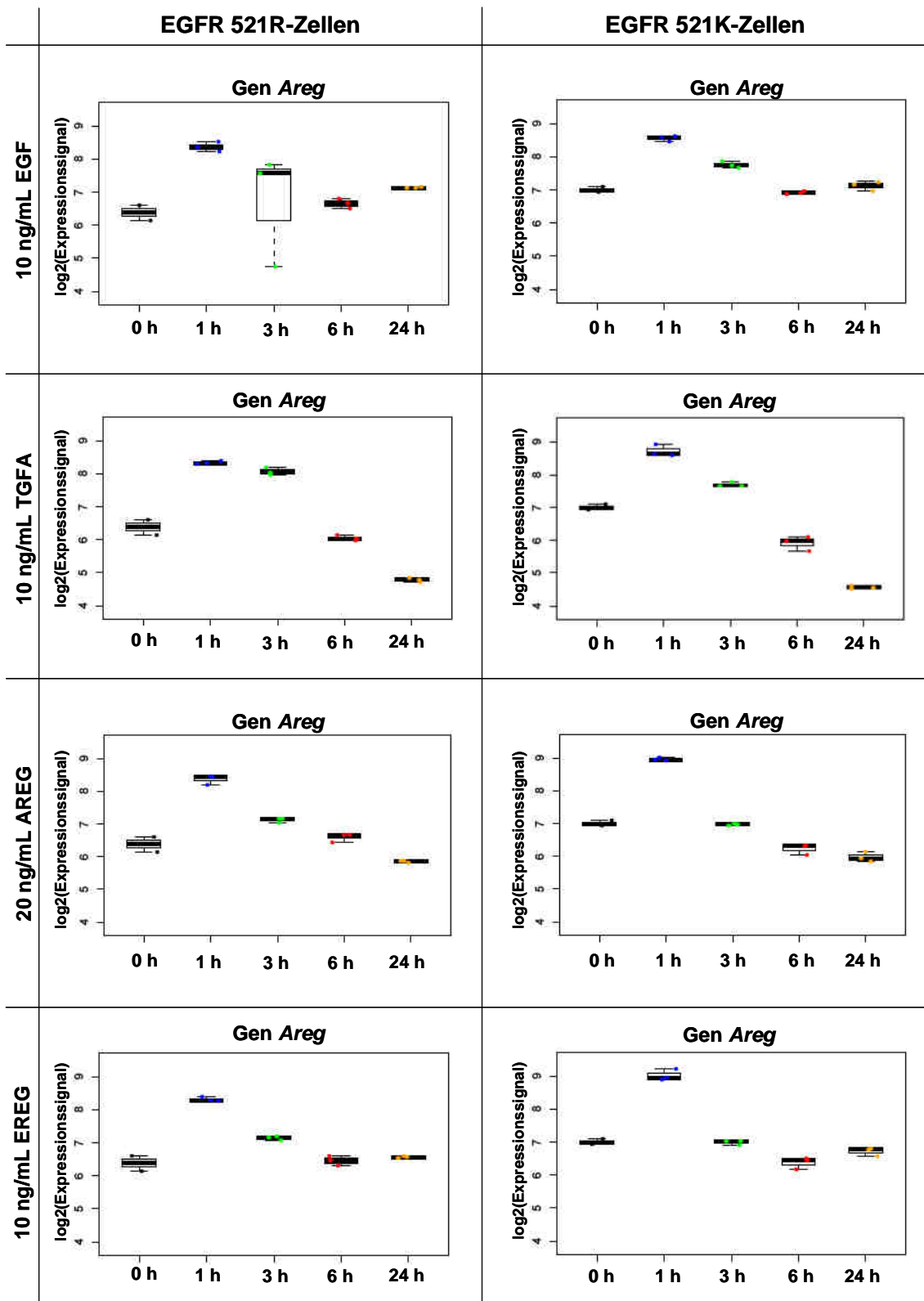
A



B



C



D

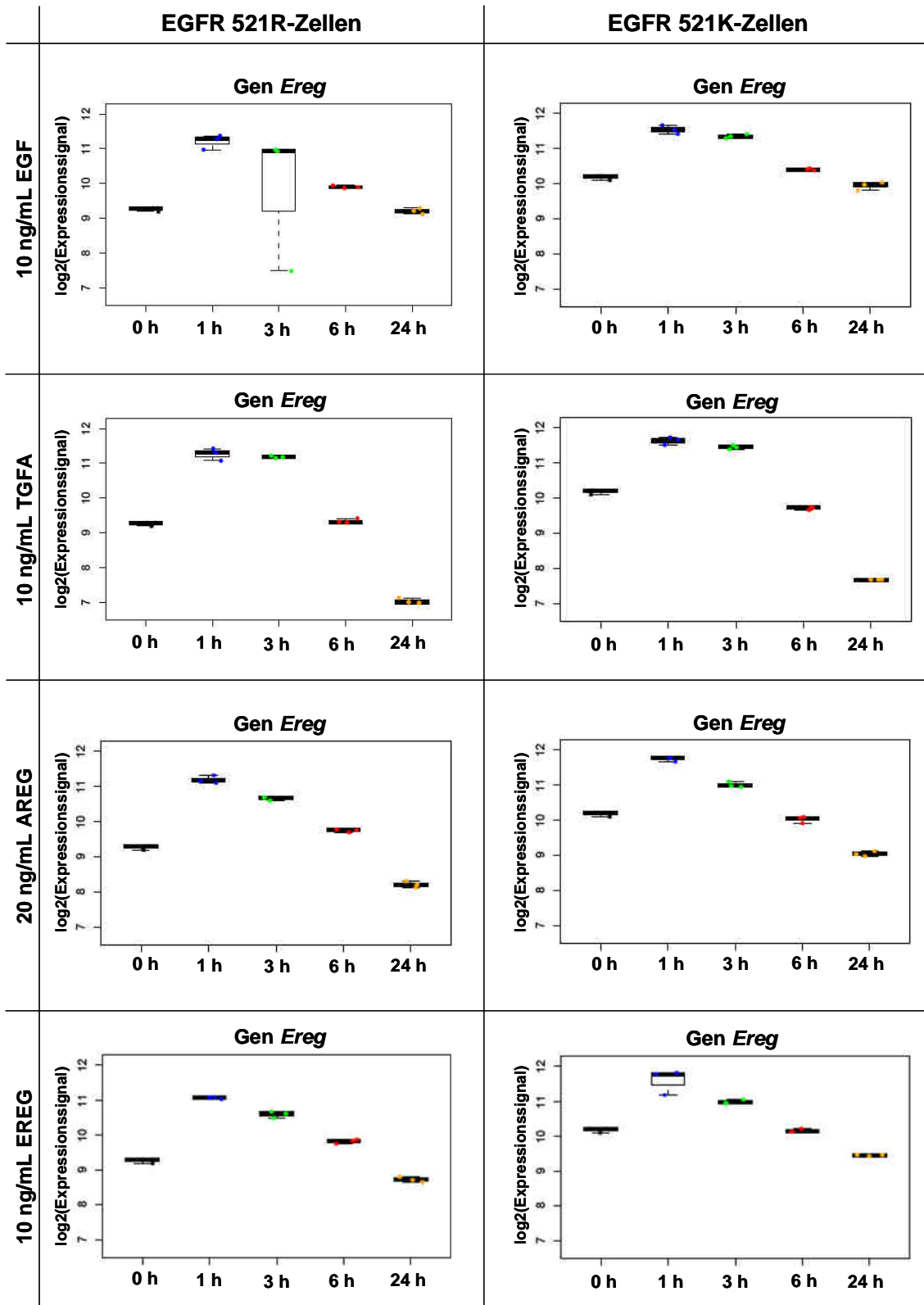


Abb. 4- 16: Exemplarische Darstellung Liganden-spezifischer Genregulation.

NIH3T3-Zellen, die EGFR 521K und EGFR 521R stabil exprimieren, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation mit EGFR-Liganden lysiert. Die Expression ausgewählter Gene wurde in Box-Whisker-Plots dargestellt. Triplikate sind durch drei gleichfarbige Punkte dargestellt. (A) *Ccnd1*; (B) *Dusp1*; (C) *Areg*; (D) *Ereg*. Abkürzungen: AREG, Amphiregulin; *Ccnd1*, Cyclin D1; *Dusp1*, *Dual-Specificity Phosphatase 1*; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EREG, Epiregulin; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Zusätzlich wurde die Genexpression der ErbB-Rezeptoren und -Liganden untersucht. So riefen alle Liganden eine starke Expression der Gene *Areg* und *Ereg* 1 h nach Stimulierung hervor; die nachfolgenden Zeitpunkte wurde eine Abnahme der mRNA-Menge beobachtet, die teilweise unter das Niveau der Kontrolle fiel (Abb. 4- 16 C und D). Diese negative Feedback-Kontrolle konnte auch für weitere Gene, unabhängig vom stimulierenden Liganden, beobachtet werden. *Egf* und *Tgfa* wurden durch keinen Liganden in ihrer Expression beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Während *ErbB3* und *ErbB4* von Ligandenstimulation relativ unbeeinflusst blieben, konnte eine leichte Zunahme der *ErbB2*-Expression 3 h nach Stimulierung mit Liganden gesehen werden. Die Transkription des murinen *Egfr* nahm in EGFR 521R-Zellen ab 3 h nach Ligandenstimulation leicht ab, bei EGFR 521K-Zellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.4.3 Zusammenfassung des Kapitels 4.1.4

Es wurden Genexpressionsanalysen unstimulierter und Liganden-stimulierter NIH3T3-Zellen, die EGFR 521K, EGFR 521R und Leervektor exprimierten, durchgeführt, um Auswirkungen der EGFR-Liganden sowie der Expression der EGFR-Varianten 521R und 521K auf die Transkription von Genen zu untersuchen.

Die Analysen zeigten, dass die Expression der EGFR-Varianten die Gentranskription maßgeblich beeinflusste. Dabei waren vor allem regulatorische Zellzyklusgene bei EGFR 521K-Zellen stärker exprimiert.

Die vier EGFR-Liganden regulierten zum Großteil dieselben Gene. Meistens induzierten die Liganden Gene in ähnlicher Weise, worauf deren Expression im Zeitverlauf wieder abnahm. Hinsichtlich der Stärke der Regulation bildeten die Liganden EGF/TGFA und AREG/EREG für einige Gene funktionell gleichwertige Ligandenpaare. In anderen Genen induzierte nur TGFA ein besonderes Expressionsprofil, da nur TGFA-Stimulation nach 24 h bei diesen Genen eine besonders starke TGFA-exklusive negative Feedback-Hemmung hervorrief.

4.1.5 Einfluss des EGFR-Polymorphismus und der EGFR-Liganden auf die Wirkung der therapeutischen Antikörper

Nachdem die Effekte des EGFR-Polymorphismus R521K und der verschiedenen Liganden auf Zellwachstum, EGFR-Signaltransduktion und Genexpression betrachtet worden waren, wurde der Einfluss der EGFR-Liganden und des EGFR-Polymorphismus auf die Wirkung von therapeutischen anti-EGFR Antikörpern untersucht.

Zur Untersuchung der Proliferation wurden die Zellen sowohl im Monolayer-Assay als auch im Softagar-Assay mit humanen EGFR-Liganden und therapeutischen mAb behandelt. Des Weiteren wurden die Zellen im Monolayer-Assay mit humanen EGFR-Liganden transient transfiziert und mit therapeutischen mAb inkubiert. Zusätzlich wurden Effekte auf Signaltransduktion nach Inkubation der Zellen mit mAb und Liganden untersucht.

4.1.5.1 Wachstum im Monolayer unter exogenem Ligandeneinfluss

Die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und am nächsten Tag mit unterschiedlichen Kombinationen aus EGFR-Liganden und therapeutischen mAb (100 µg/mL) für 72 h behandelt. Es wurden zwei Konzentrationen an EGFR-Liganden ausgetestet: 10 bzw. 100 ng/mL für EGF, TGFA und EREG und 20 bzw. 200 ng/mL für AREG. Dabei sollten die Effekte der EGFR-Liganden und mAb auf das Wachstum der NIH3T3-Zellen und somit auch Unterschiede im EGFR-Polymorphismus untersucht werden.

Entsprechend den Ergebnissen aus den Dosis-Wirkungsuntersuchungen lösten nur EGF, TGFA und EREG (10 ng/mL) vergleichbares Wachstum aus (Abb. 4- 17) und erst die Erhöhung der Ligandenkonzentration um das Zehnfache (100 ng/mL bei EGF, TGFA und EREG; 200 ng/mL bei AREG) bewirkte, dass auch AREG ähnlich starke Proliferation induzierte wie die anderen Liganden (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte bestätigt werden, dass EGFR 521K-Zellen von der Inkubation mit Liganden stärker profitierten als EGFR 521R-Zellen (siehe 4.1.2.1).

Prinzipiell konnte eine ähnliche Wirkung von EGF/TGFA und von AREG/EREG in Bezug auf das Ansprechen der Zellen auf mAb gezeigt werden. Unter dem Einfluss von hohen AREG- und EREG-Konzentrationen zeigten die therapeutischen mAb eine bessere Wirksamkeit als unter dem Einfluss von hohen EGF- und TGFA-Konzentrationen. Ebenso konnte bei der geringen EREG-Konzentration eine effektivere Inhibition des Zellwachstums durch die mAb beobachtet werden als bei geringen EGF- und TGFA-Konzentrationen. Da bei geringer AREG-Konzentration kaum Wachstum stimuliert wurde, konnte hier der stärkere inhibitorische Effekt der mAb nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 4- 17; Daten für hohe Ligandenkonzentration nicht gezeigt).

Das Ansprechen auf die mAb war abhängig von der exprimierten EGFR-Variante: die therapeutischen mAb inhibierten bei gleichzeitiger Anwesenheit der untersuchten EGFR-Liganden das Wachstum von EGFR 521K-Zellen effektiver als das von EGFR 521R-Zellen (Abb. 4- 17).

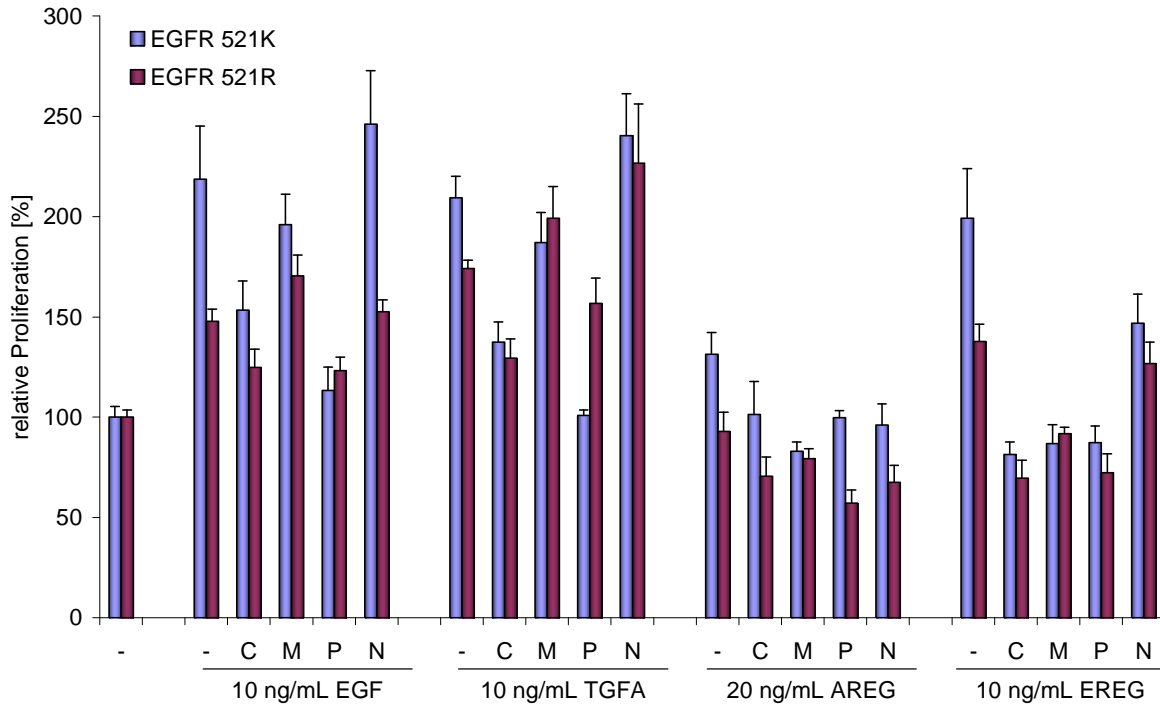


Abb. 4- 17: Liganden-vermitteltes Ansprechen der NIH3T3-Zellen auf therapeutische Antikörper im Monolayer-Assay.

Die in serumfreiem Medium inkubierten NIH3T3-Zellen wurden mit therapeutischen mAb (100 µg/mL) und den EGFR-Liganden behandelt und für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Absorption gemessen, nachdem die Zellen 2 h mit dem WST-1 Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: -, unbehandelt; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; M, Matuzumab; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Bei Anwesenheit von EGF oder TGFA konnten nur Cetuximab und Panitumumab einen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum auslösen. In EGFR 521K-Zellen zeigte Panitumumab für diese Liganden eine stärkere Inhibition des Zellwachstums als Cetuximab. Matuzumab bewirkte nur bei Anwesenheit von AREG oder EREG Inhibition des Zellwachstums; dabei wirkte Matuzumab ähnlich effektiv wie Cetuximab und Panitumumab. Nimotuzumab zeigte ebenso wie Matuzumab bei gleichzeitiger Inkubation mit EGF oder TGFA keinen Effekt auf das Zellwachstum. In Kombination mit AREG oder EREG hatte Nimotuzumab nur bei EGFR 521K-Zellen eine bessere Wirksamkeit; bei EGFR 521R-Zellen hemmte Nimotuzumab das Wachstum wenig oder gar nicht (Abb. 4- 17).

Die eben beschriebenen Ergebnisse lassen erneut die Einteilung der Liganden in die Gruppen EGF/TGFA und AREG/EREG zu, die auch schon bei Untersuchung der Liganden-vermittelten EGFR-Phosphorylierung (Abb. 4- 7) und Dosis-Wirkungskurven im Softagar-Assay (Abb. 4- 5) gemacht werden konnte. Dabei bedingten die Liganden EGF/TGFA eine

starke EGFR-Phosphorylierung und starkes Wachstum, während die Liganden AREG/EREG Proliferation und EGFR-Aktivierung eher gering stimulierten. Obwohl die Untersuchungen bezüglich des Liganden-abhängigen Ansprechens auf therapeutische mAb im Monolayer durchgeführt wurden, konnten die Ergebnisse eher mit den Dosis-Wirkungsuntersuchungen im Softagar-Assay als mit den Dosis-Wirkungsuntersuchungen im Monolayer-Assay assoziiert werden.

4.1.5.2 Dreidimensionales Wachstum unter exogenem Ligandeneinfluss

Unterschiede zwischen den Effekten der EGFR-Liganden, der therapeutischen mAb und der EGFR-Varianten 521K und 521R wurden auch bezüglich des dreidimensionalen Wachstums von NIH3T3-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen in Softagar ausgesät und mit unterschiedlichen Kombinationen aus EGFR-Liganden und therapeutischen anti-EGFR Antikörpern (100 µg/mL) für 7 Tage behandelt. Wie zuvor im Monolayer-Assay wurden auch hier zwei Ligandenkonzentrationen ausgetestet (10 bzw. 100 ng/mL für EGF, TGFA und EREG und 20 bzw. 200 ng/mL für AREG).

Die hier beobachteten Effekte der Liganden auf das Zellwachstum bestätigten die zuvor erzielten Ergebnisse aus dem konzentrationsabhängigen Wachstum der Zellen: Die Liganden EGF und TGFA lösten schon bei geringer Konzentration (10 ng/mL) maximales Wachstum aus, während AREG und EREG (20 bzw. 10 ng/mL) das Wachstum der Zellen in nur sehr geringem Maße stimulierten (Abb. 4- 18) und erst die Erhöhung der AREG- und EREG-Konzentration um das Zehnfache (200 bzw. 100 ng/mL) zu einem starken Zuwachs führte (Abb. 4- 19). Außerdem konnte man erkennen, dass EGFR 521R-Zellen stärker von der Stimulation mit AREG (20 ng/mL) und EREG (10 ng/mL) profitierten als Zellen, die EGFR 521K exprimierten (Abb. 4- 18). Bei Inkubation der Zellen mit EGF oder TGFA (10 und 100 ng/mL) bzw. mit EREG oder AREG (100 bzw. 200 ng/mL) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Polymorphismen (Abb. 4- 19).

Ebenso wie im Monolayer-Assay konnte auch im Softagar-Assay ein Liganden-abhängiges Ansprechen auf die therapeutischen mAb beobachtet werden. Im Softagar-Assay hielten die Antikörper Cetuximab und Panitumumab das Wachstum von EGF- und TGFA-stimulierten Zellen auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollzellen. Matuzumab bewirkte eine ähnlich starke Inhibition wie Cetuximab und Panitumumab. Dagegen zeigte Nimotuzumab keine inhibierende Wirkung (Abb. 4- 18). Die Erhöhung der EGF- und TGFA-Konzentration um das Zehnfache wirkte sich auf den inhibitorischen Effekt von Matuzumab aus: Während Cetuximab und Panitumumab im Fall von EGF und TGFA immer noch stark inhibierend auf

das Wachstum wirken konnten, verminderte Matuzumab ebenso wie Nimotuzumab das Wachstum der Zellen wenig oder gar nicht (Abb. 4- 19).

Unter dem Einfluss von AREG oder EREG (20 bzw. 10 ng/mL) ließ sich das Wachstum der Zellen durch alle therapeutischen Antikörper auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle inhibieren (Abb. 4- 18). Die Konzentrationserhöhung von AREG und EREG beeinflusste die Wirkung der therapeutischen Antikörper Cetuximab, Matuzumab oder Panitumumab nicht; auch hier entsprach das Zellwachstum dem der unbehandelten Kontrollzellen. Auch Nimotuzumab war in der Lage, das durch die hohen AREG- und EREG-Konzentrationen stimulierte Zellwachstum zu inhibieren, allerdings deutlich schwächer als die drei anderen Antikörper (Abb. 4- 19).

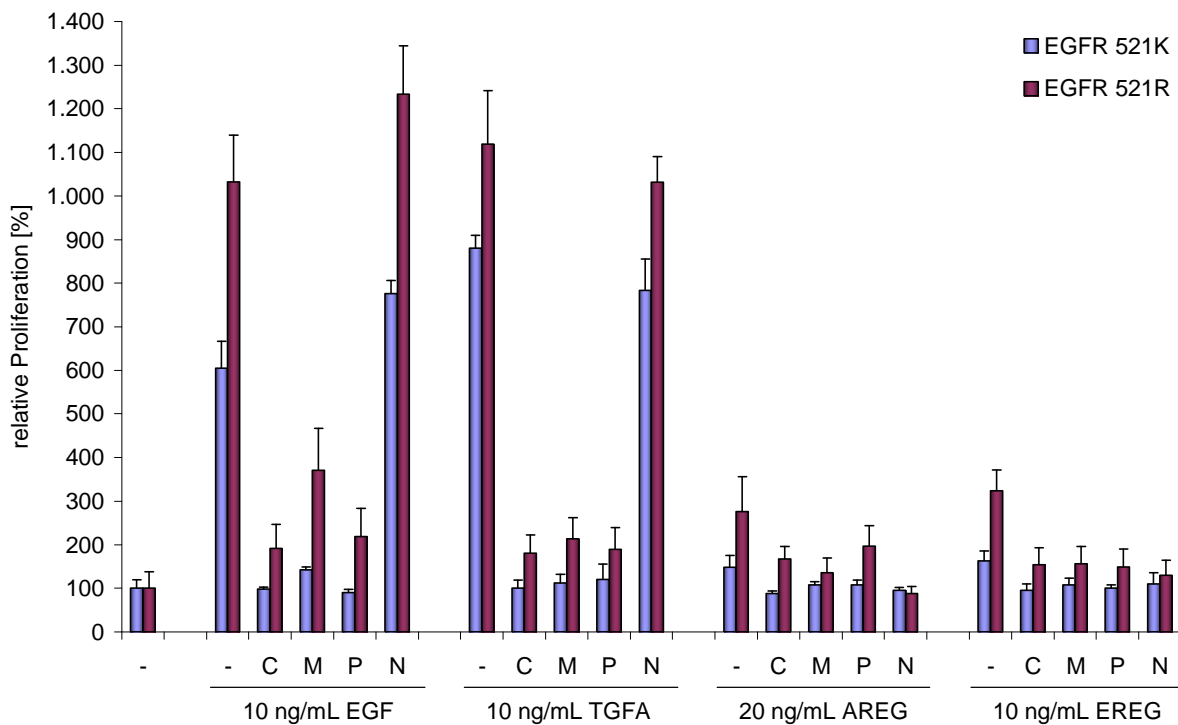


Abb. 4- 18: Liganden-vermitteltes Ansprechen der NIH3T3-Zellen auf therapeutische Antikörper im Softagar-Assay bei geringer Ligandenkonzentration.

NIH3T3-Zellen wurden in Softagar ausgesät, mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern (100 µg/mL) behandelt und für 7 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Fluoreszenz gemessen, nachdem die Zellen 6 h mit dem *Cell Titer Blue* Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: –, unbehandelt; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; M, Matuzumab; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Es zeigte sich also, dass EGF und TGFA das Wachstum der untersuchten Zellen schon bei geringen Konzentrationen (10 ng/mL) induzierten und die Wirkung von Nimotuzumab

beeinträchtigten (Abb. 4- 18). Die inhibierende Wirkung von Matuzumab wurde erst bei hohen EGF- und TGFA-Konzentrationen (100 ng/mL) beeinflusst. Dagegen fand starkes Zellwachstum bei AREG und EREG erst unter hohen Konzentrationen (200 ng/mL bzw. 100 ng/mL) statt, welche die Wirkung von Cetuximab, Matuzumab und Panitumumab nicht beeinflussten. Die Nimotuzumab-vermittelte Inhibition fiel deutlich schwächer aus als die der anderen mAb (Abb. 4- 19).

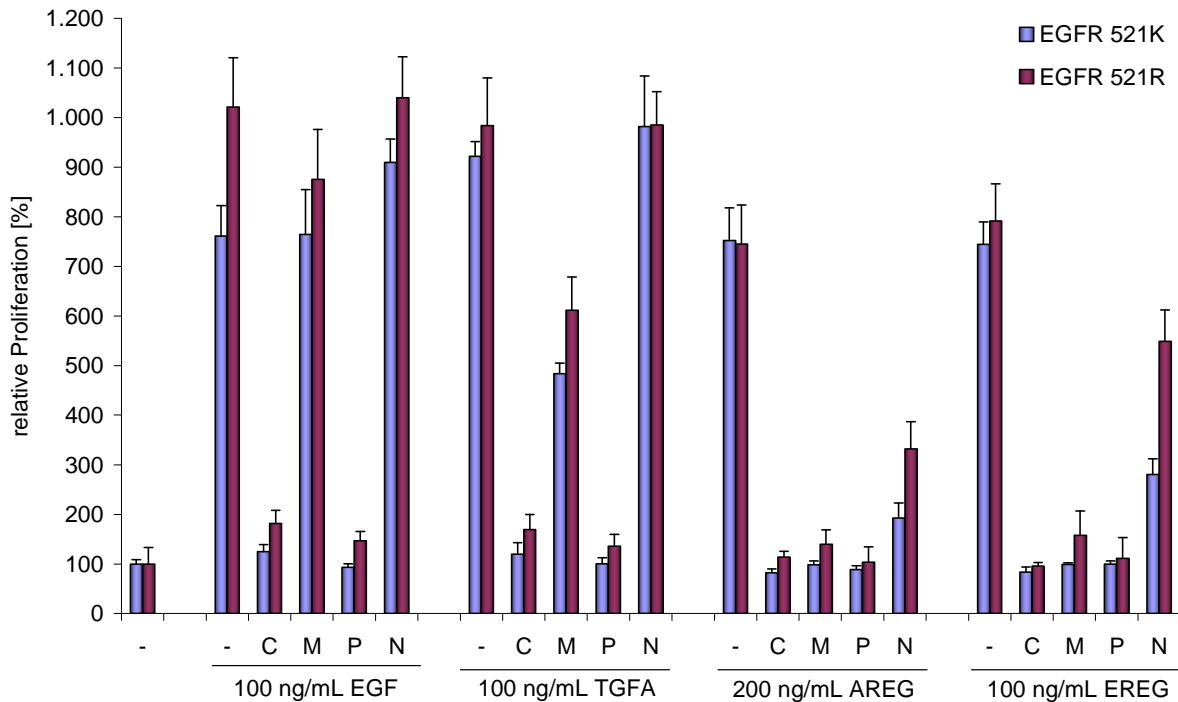


Abb. 4- 19: Liganden-vermitteltes Ansprechen auf therapeutische Antikörper im Softagar-Assay bei hoher Ligandenkonzentration.

NIH3T3-Zellen wurden in Softagar ausgesät, mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern (100 µg/mL) behandelt und für 7 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Fluoreszenz gemessen, nachdem die Zellen 6 h mit dem *Cell Titer Blue* Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: -, unbehandelt; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; M, Matuzumab; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

4.1.5.3 Wachstum im Monolayer unter endogenem Ligandeneinfluss

Zusätzlich zu den Effekten exogener Liganden wurde untersucht, inwiefern sich die endogene Ligandenexpression auf das Wachstum der Zellen und deren Ansprechen auf therapeutische mAb auswirkt. Dazu wurden die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen mit humanen EGFR-Liganden transient transfiziert, in serumfreiem Medium inkubiert und mit therapeutischen mAb für 72 h behandelt. Danach wurde der Überstand abgenommen und die

Expression der transfizierten EGFR-Liganden mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) überprüft. Da für humanes EREG kein ELISA verfügbar war, konnten nur die Konzentrationen der EGFR-Liganden EGF, TGFA und AREG bestimmt werden.

In den Leervektor-Zellen konnten sehr starke Unterschiede in den Konzentrationen, in denen die humanen EGFR-Liganden im Überstand vorlagen, festgestellt werden: So betrug in den unbehandelten Leervektor-Zellen die Konzentration von EGF 43 pg/mL, die von TGFA 1511 pg/mL und die von AREG 3231 pg/mL. Diese Ligandenkonzentrationen blieben von der Behandlung mit therapeutischen mAb in den Leervektor-Zellen unbeeinflusst (Abb. 4- 20).

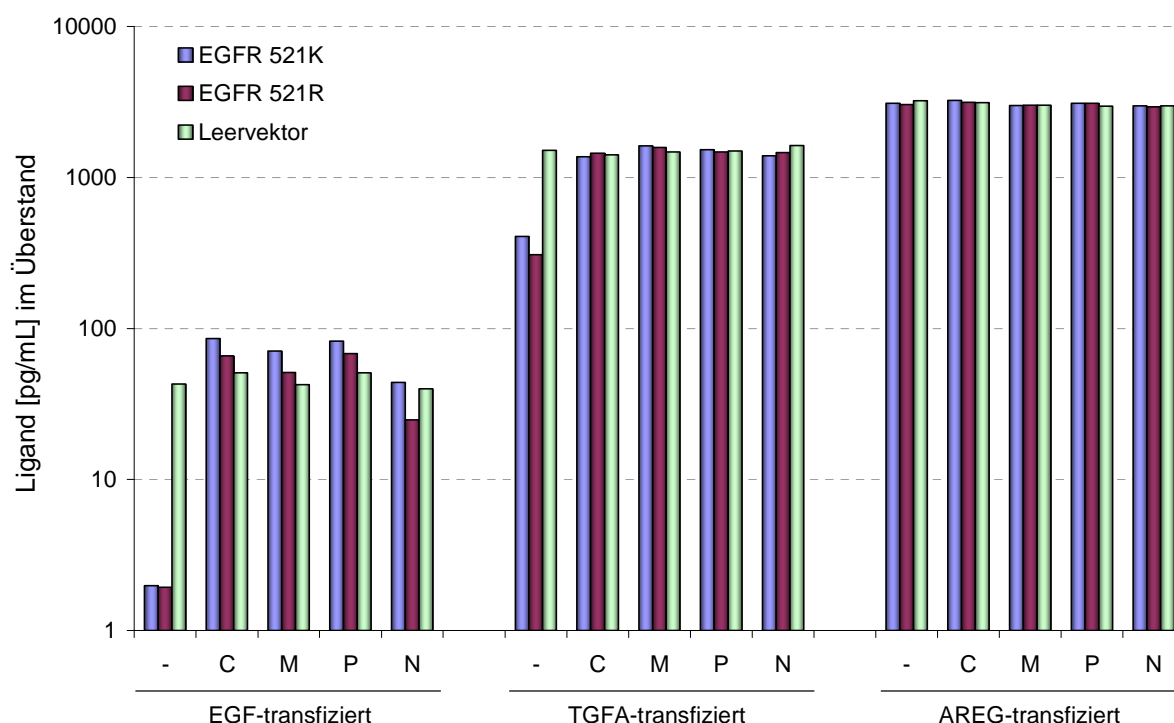


Abb. 4- 20: Anreicherung von humanen EGFR-Liganden im Überstand von EGFR-exprimierenden NIH3T3-Zellen nach Behandlung mit therapeutischen Antikörpern.

Die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen wurden transient mit humanen EGFR-Liganden transfiziert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und mit therapeutischen Antikörpern (100 µg/mL) behandelt. Nach 72 h Inkubation unter Standardbedingungen wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration der Liganden im ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung. Abkürzungen: –, unbehandelt; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; M, Matuzumab; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Die gemessenen Konzentrationen von EGF und TGFA im Überstand der Leervektor-Zellen konnten auch in den Überständen der mit mAb behandelten EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen bestätigt werden. Dagegen wurden große Unterschiede in den EGF- und TGFA-Kon-

zentrationen zwischen unbehandelten und mit mAb behandelten Zellen festgestellt, (Abb. 4-20), was durch verminderte Rezeptor-Ligand-Internalisierung in den behandelten Zellen bedingt sein kann (siehe 5.1.2). So lag EGF nur mit 2 pg/mL in den Überständen der unbehandelten EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen vor; in den Überständen der mit mAb behandelten Zellen bewegten sich die EGF-Konzentrationen zwischen 25 und 86 pg/mL. TGFA wurde im Überstand von unbehandelten EGFR 521K- bzw. EGFR 521R-Zellen mit einer Konzentration von 407 pg/mL bzw. 308 pg/mL gemessen. In den Überständen der mit mAb behandelten Zellen konnten Werte zwischen 1371 pg/mL und 1620 pg/mL gemessen werden. Dagegen konnten sowohl in den unbehandelten als auch in den mit mAb behandelten EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen, die mit AREG transfiziert worden waren, AREG-Konzentrationen (2938 pg/mL – 3239 pg/mL) detektiert werden, die sich von denen der Leervektor-Zellen kaum unterschieden.

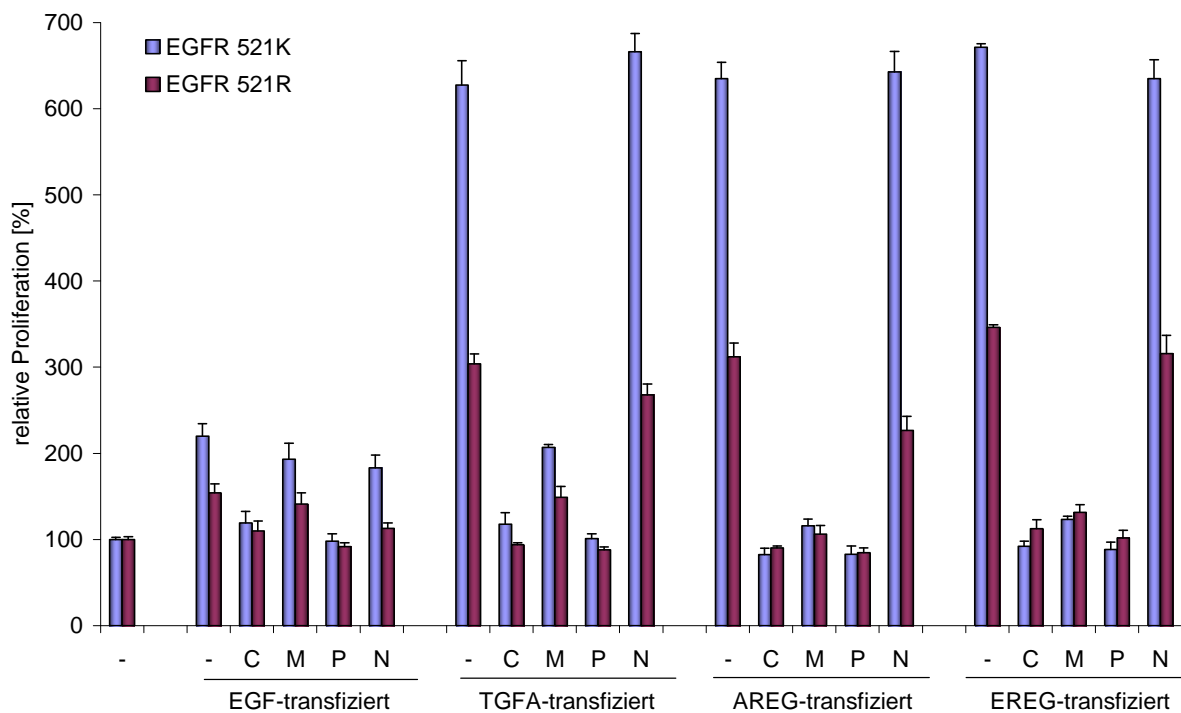


Abb. 4- 21: Liganden-abhängiges Ansprechen der NIH3T3-Zellen auf therapeutische Antikörper.

Die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen wurden transient mit humanen EGFR-Liganden transfiziert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und mit therapeutischen Antikörpern (100 µg/mL) behandelt. Die Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Absorption gemessen, nachdem die Zellen 2 h mit dem WST-1 Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. **Abkürzungen:** –, unbehandelt; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epregulin; M, Matuzumab; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Die Expression der Liganden TGFA, AREG und EREG hatte ein starkes Wachstum der unbehandelten EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen zur Folge. Einzig die Expression von EGF bewirkte ein vergleichsweise schwaches Wachstum (Abb. 4- 21), was durch die geringe Konzentration, in der der Ligand vorlag, begründet werden kann. Leervektor-Zellen, die ebenfalls mit humanen EGFR-Liganden transient transfiziert worden waren, zeigten im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen kein verändertes Wachstum (Daten nicht gezeigt).

Cetuximab und Panitumumab inhibierten das Liganden-induzierte Wachstum effektiv, so dass die Zellen ein Wachstum ähnlich dem der unbehandelten Kontrolle zeigten. Durch Nimotuzumab konnte die Proliferation nicht oder nur wenig inhibiert werden. Matuzumab wirkte in AREG- und EREG-exprimierenden Zellen ähnlich effektiv wie Cetuximab und Panitumumab; in den TGFA-exprimierenden Zellen fiel der inhibierende Effekt von Matuzumab geringer aus. Auch bei EGF-exprimierenden Zellen wirkten Cetuximab und Panitumumab effektiver als Matuzumab und Nimotuzumab, die keine oder nur eine leichte Hemmung des Zellwachstums hervorriefen (Abb. 4- 21). In dem gezeigten Versuch wird zwar der Eindruck vermittelt, dass EGFR 521K-Zellen ähnlich wie bei exogener Ligandengabe sensitiver auf die EGFR-Liganden und mAb reagierten. Dies konnte jedoch in anderen Transfektionsexperimenten nicht bestätigt werden. Zwischen den EGFR-Varianten konnten somit keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Ansprechens auf endogene EGFR-Liganden gesehen werden.

4.1.5.4 Effekt der anti-EGFR Antikörper auf die EGFR-Signaltransduktion

Sowohl in den zwei- als auch in den dreidimensionalen Proliferationsassays, in denen die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen mit humanen EGFR-Liganden und therapeutischen mAb behandelt worden waren, konnte ein Liganden-abhängiges Ansprechen der Zellen auf die mAb gesehen werden (siehe 4.1.5.1 und 4.1.5.2).

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob dieses Liganden-abhängige Ansprechen auch in der Signaltransduktion von NIH3T3-Zellen detektiert werden kann, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen mAb behandelt worden waren. Außerdem sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Signaltransduktion der beiden EGFR-Varianten auszumachen sind. Dazu wurden die zuvor in serumfreiem Medium inkubierten Zellen mit therapeutischen mAb (100 µg/mL) behandelt und dann mit den EGFR-Liganden stimuliert. Die Lysate wurden mit Hilfe eines Luminex-Assays hinsichtlich der Phosphorylierung der Tyrosinreste Y1173, Y1068 und Y845 in der EGFR-Sequenz untersucht. Die Phosphorylierung der im EGFR-Signalweg wichtigen Signalproteine ERK, p38 MAPK, SAPK/JNK, AKT, p85S6K, S6RP und c-Jun wurde im Western Blot untersucht.

Tab. 4- 5: Relative EGFR-Phosphorylierung [%] von NIH3T3-Zellen nach Behandlung mit EGFR-Liganden und therapeutischen anti-EGFR Antikörpern.

Be- handlung	EGFR 521K-Zellen					EGFR 521R-Zellen					EGFR- Tyrosin- rest
	-	C	M	P	N	-	C	M	P	N	
EGF 10 ng/mL	4457	/	132	/	1354	3765	/	221	/	1317	Y1173
	1498	/	200	18	759	1057	69	265	5	582	Y1068
	414	/	158	/	266	337	/	144	/	223	Y845
TGFA 10 ng/mL	2359	/	22	/	535	2077	/	8	/	354	Y1173
	1163	103	46	26	466	829	9	17	/	264	Y1068
	389	/	51	/	185	307	/	40	/	125	Y845
AREG 20 ng/mL	43	19	22	/	8	75	/	/	/	/	Y1173
	99	119	46	33	16	95	46	3	7	/	Y1068
	70	/	38	/	6	88	/	9	/	/	Y845
EREG 10 ng/mL	24	14	14	/	/	25	/	29	/	4	Y1173
	50	117	37	4	/	35	72	32	23	/	Y1068
	37	/	58	/	/	37	/	35	/	/	Y845

In serumfreiem Medium inkubierte Zellen wurden mit therapeutischen anti-EGFR Antikörpern (100 µg/mL) für 1 h inkubiert und danach 10 min mit EGFR-Liganden in den gezeigten Konzentrationen stimuliert. Danach wurden Zelllysate hergestellt und die EGFR-Phosphorylierung der Tyrosinreste Y1173, Y1068 und Y845 in der EGFR-Sequenz im Luminex-Assay analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung. Die EGFR-Phosphorylierung in unbehandelten Kontrollzellen entspricht 0%; die EGFR-Phosphorylierung der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: -, unbehandelt; /, Abnahme oder keine Änderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epregulin; M, Matuzumab; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha; Y, Tyrosin.

Wie zuvor in den Proliferationsassays ein Liganden-vermitteltes Ansprechen auf therapeutische mAb gesehen werden konnte, wurde auch die EGFR-Phosphorylierung durch therapeutische mAb Liganden-spezifisch gehemmt. Die durch EGF und TGFA ausgelöste starke EGFR-Phosphorylierung der drei untersuchten Tyrosinreste konnte fast vollständig durch Cetuximab und Panitumumab inhibiert werden. Eine Inhibition der Phosphorylierung konnte auch durch Matuzumab und durch Nimotuzumab gemessen werden, dabei wurde bei Behandlung mit Nimotuzumab eine geringere Abnahme der Phosphorylierung beobachtet als bei Behandlung mit Matuzumab. Die AREG- und EREG-induzierte Phosphorylierung wurde durch die Antikörper in den meisten Fällen inhibiert. Dabei fiel auf, dass gerade auch Nimotuzumab die Phosphorylierung effektiv inhibierte (Tab. 4- 5). Der vergleichsweise starke inhibitorische Effekt, den Matuzumab und Nimotuzumab unter dem Einfluss von EGF und TGFA auf die EGFR-Phosphorylierung ausübten, steht im starken Gegensatz zu den Effekten dieser mAb im Proliferationsassay, in dem kein Ansprechen der Zellen auf die mAb

beobachtet werden konnte. Des Weiteren konnte das sensitivere Verhalten der EGFR 521K-Zellen auf die therapeutischen mAb nicht bestätigt werden; bei diesen Zellen fand keine stärkere Inhibition der EGFR-Phosphorylierung statt als bei EGFR 521R-Zellen.

Dagegen konnten in den Ergebnissen der EGFR-Signaltransduktion Parallelen zu den Proliferationsassays gesehen werden. Die Phosphorylierung der ausgesuchten Signalproteine wurde in Zellen, die mit EGF oder TGFA behandelt worden waren, durch Cetuximab und Panitumumab inhibiert, dagegen nicht oder aber nur gering durch Matuzumab oder Nimotuzumab. Bei Zellen, die mit AREG und EREG stimuliert worden waren, inhibierten Cetuximab, Matuzumab und Panitumumab die Phosphorylierung ähnlich effektiv. Dagegen wirkte Nimotuzumab nur in manchen Fällen inhibierend (Abb. 4- 22 und Abb. 4- 23).

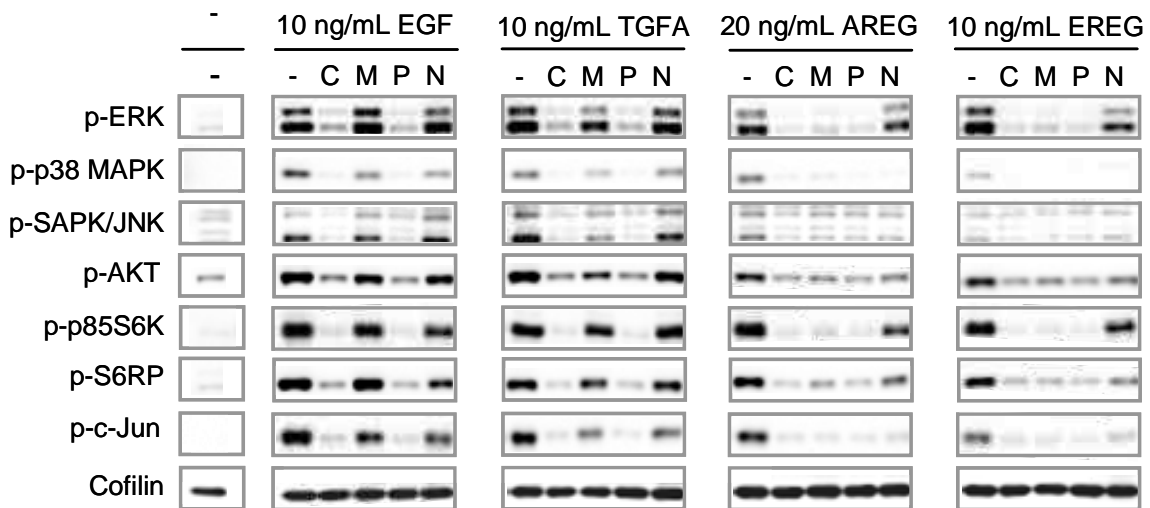


Abb. 4- 22: Vergleich von Signalproteinen in EGFR 521K-Zellen, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt wurden.

EGFR 521K-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden dann mit therapeutischen anti-EGFR Antikörpern (100 µg/mL) für 1 h inkubiert und danach 10 min mit EGFR-Liganden stimuliert. Danach wurden Zelllysate hergestellt, und folgende Proteine wurden im Western Blot analysiert: p-ERK [T202/Y204], p-p38 MAPK [T180/Y182], p-SAPK/JNK [T183/Y185], p-AKT [S473], p-p85S6K [T389], p-S6RP [S235/236], p-c-Jun [T93]. Abkürzungen: –, unbehandelt; AKT, Proteinkinase B; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EREG, Epiregulin; ERK, *Extracellular-signal regulated kinase*; M, Matuzumab; MAPK, *Mitogen-activated protein kinase*; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; p, phospho; S6K, S6 Kinase; S6RP, S6 ribosomales Protein; SAPK/JNK, *Stress-activated protein kinase / c-jun N-terminal kinase*; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Bei EGFR 521K-Zellen konnte die EGF- oder TGFA-induzierte Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sehr stark (ERK, S6RP und c-Jun) oder komplett (p38 MAPK, SAPK/JNK, p85S6K und AKT) durch Cetuximab und Panitumumab inhibiert werden. Durch Matuzumab und Nimotuzumab wurde die EGF- und TGFA-induzierte Akti-

vierung der Signalproteine nur bei manchen Proteinen (beispielsweise p38 MAPK und c-Jun) leicht inhibiert (Abb. 4- 22).

In AREG- oder EREG-stimulierten Zellen inhibierten Cetuximab, Matuzumab und Panitumumab die Phosphorylierung der Signalproteine sehr effektiv. Nimotuzumab wirkte nur bei manchen Proteinen inhibierend. So konnte die Aktivierung der Proteine p38MAPK, SAPK/JNK, AKT und c-Jun durch Nimotuzumab verhindert werden (Abb. 4- 22).

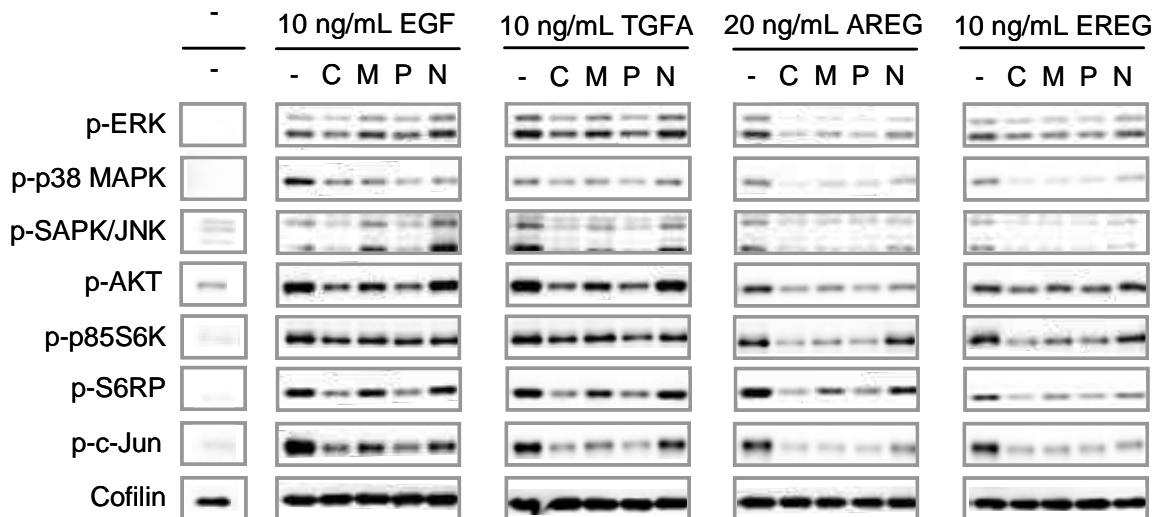


Abb. 4- 23: Vergleich von Signalproteinen in EGFR 521R-Zellen, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt wurden.

EGFR 521R-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden dann mit therapeutischen anti-EGFR Antikörpern (100 µg/mL) für 1 h inkubiert und danach 10 min mit EGFR-Liganden stimuliert. Danach wurden Zellysate hergestellt, und folgende Proteine wurden im Western Blot analysiert: p-ERK [T202/Y204], p-p38 MAPK [T180/Y182], p-SAPK/JNK [T183/Y185], p-AKT [S473], p-p85S6K [T389], p-S6RP [S235/236], p-c-Jun [T93]. *Abkürzungen:* -, unbehandelt; AKT, Proteinkinase B; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EREG, Epiregulin; ERK, *Extracellular-signal regulated kinase*; M, Matuzumab; MAPK, *Mitogen-activated protein kinase*; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; p, phospho; S6K, S6 Kinase; S6RP, S6 ribosomales Protein; SAPK/JNK, *Stress-activated protein kinase / c-jun N-terminal kinase*; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Die Inhibition der Phosphorylierung der untersuchten Proteine durch Cetuximab und Panitumumab fiel bei EGFR 521R-Zellen schwächer aus als bei EGFR 521K-Zellen. Die EGF- und TGFA-induzierte Aktivierung der Signalproteine wurde durch Cetuximab und Panitumumab partiell inhibiert, während für Matuzumab und Nimotuzumab keine nennenswerte Inhibition beobachtet wurde (Abb. 4- 23).

In mit AREG- oder EREG-behandelten EGFR 521R-Zellen konnte die Phosphorylierung der Signalproteine durch Cetuximab, Matuzumab und Panitumumab effektiver inhibiert werden als in EGF- oder TGFA-behandelten Zellen. Dabei wirkte Matuzumab bei den meisten Signalproteinen ähnlich effektiv wie Cetuximab und Panitumumab. Die AREG- und EREG-bedingte Phosphorylierung der Proteine konnte durch Nimotuzumab zum Teil stärker

inhibiert werden, als dies unter dem Einfluss von EGF und TGFA der Fall war. Nichtsdestotrotz übte Nimotuzumab von allen untersuchten Antikörpern den geringsten Effekt auf die Phosphorylierung der Signalproteine aus (Abb. 4- 23).

Es konnte in der Signaltransduktion der EGFR 521K- und der EGFR 521R-Zellen ein Liganden-abhängiges Ansprechen auf die therapeutischen Antikörper gesehen werden, bei dem die Liganden EGF und TGFA einerseits und AREG und EREG andererseits ähnliche Effekte auslösten. Dabei wurde die Phosphorylierung der untersuchten Proteine durch Cetuximab und Panitumumab in EGFR 521R-Zellen weniger inhibiert als in EGFR 521K-Zellen (Abb. 4- 22 und Abb. 4- 23).

4.1.5.5 Zusammenfassung des Kapitels 4.1.5

In diesem Kapitel wurde der Einfluss des EGFR-Polymorphismus und der EGFR-Liganden auf die Effektivität von therapeutischen anti-EGFR mAb beschrieben.

Unterschiede zwischen den EGFR-Varianten konnten im Ansprechen auf therapeutische mAb unter Ligandeneinfluss erkannt werden. Im Monolayer-Assay wurde gesehen, dass das Wachstum von EGFR 521K-Zellen stärker inhibiert wurde als das von EGFR 521R-Zellen. Dies wurde auch in der Signaltransduktion deutlich, da die Aktivierung der Signalproteine von EGFR 521K-Zellen stärker durch mAb inhibiert werden konnte, als es bei EGFR 521R-Zellen der Fall war. Dagegen konnte in der Inhibition der EGFR-Phosphorylierung kein Unterschied zwischen den EGFR-Varianten gesehen werden.

Das Ansprechen der Zellen auf die therapeutischen mAb wurde durch die EGFR-Liganden unterschiedlich beeinflusst: Proliferation und EGFR-Signaltransduktion wurden unter dem Einfluss von AREG und EREG durch die mAb stärker gehemmt als unter dem Einfluss von EGF und TGFA. Dabei waren die Effekte von Matuzumab unter dem Einfluss von EGF und TGFA deutlich schwächer als die von Cetuximab und Panitumumab. Bei Anwesenheit von AREG oder EREG wirkte Matuzumab ähnlich effektiv wie Cetuximab und Panitumumab. Nimotuzumab hatte die schwächste inhibitorische Wirkung auf Proliferation und Signaltransduktion. Nur bei AREG und EREG konnte durch diesen mAb eine teilweise Blockade der Liganden-induzierten Proliferation und Signaltransduktion erzielt werden.

Zellen, die transient mit EGFR-Liganden transfiziert worden waren, zeigten ein verändertes Ansprechen auf EGFR-Liganden und therapeutische mAb. Die Effekte von Matuzumab, Cetuximab und Panitumumab waren vergleichbar, während Nimotuzumab keine Wirkung zeigte. Die Zellen wuchsen unter dem Einfluss von TGFA, AREG und EREG ähnlich stark; EGF hatte bedingt durch die geringe Konzentration, in der der Ligand vorlag, nur geringe Effekte auf das Wachstum.

4.2 Untersuchung von ErbB3

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde ein Zusammenhang zwischen Expression und Aktivierung von ErbB3 und der Tumorantwort auf anti-EGFR Therapeutika *in vitro* beschrieben. Dabei existieren jedoch gegensätzliche Daten bezüglich der Frage, inwiefern sich die Expression von ErbB3 auf das Ansprechen von Zellen auf anti-EGFR Therapeutika auswirkt [Buck *et al.*, 2006; Engelman *et al.*, 2005; Erjala *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2008]. In diesem Teil der Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die gleichzeitige Expression von EGFR und ErbB3 im Vergleich zur Expression von EGFR die Sensitivität der Zellen gegen EGFR-Liganden und therapeutische mAb beeinflusst.

Dazu wurden ErbB3-vermittelte Effekte in Hamsterzellen (Flp-In™ CHO) untersucht. Diese Zellen wurden von dem Labor Dr. Burger (Abteilung NCE Tech/LD-Da der Firma Merck) stabil mit humanem EGFR oder humanem EGFR und humanem ErbB3 transfiziert. Bei dem humanen EGFR handelte es sich um die EGFR 521R-Variante.

4.2.1 Validierung des zellulären Systems

Die Expression der humanen Proteine wurde mit Hilfe eines Luminex-Assays bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die nur mit humanem EGFR transfiziert worden waren, diesen stärker exprimierten, während Zellen, die mit humanem EGFR und humanem ErbB3 transfiziert worden waren, weniger EGFR exprimierten (Abb. 4- 24).

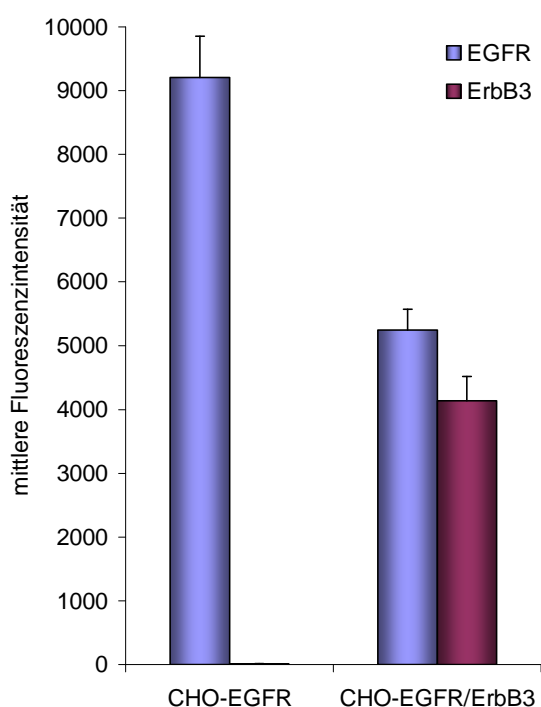


Abb. 4- 24: Expression von humanem EGFR und humanem ErbB3 in stabil transfizierten CHO-Zellen.

CHO-Zellen, die mit humanem EGFR oder mit humanem EGFR und humanem ErbB3 stabil transfiziert worden waren, wurden lysiert und die Lysate mit Hilfe eines Luminex-Assays auf Expression von EGFR und ErbB3 untersucht.

Abkürzungen: EGFR, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor.

4.2.2 Effekte der EGFR-Liganden und der therapeutischen Antikörper

4.2.2.1 Effekt der anti-EGFR Antikörper auf die EGFR- und ErbB3-Aktivierung

CHO-Zellen, die EGFR oder EGFR/ErbB3 exprimierten, wurden unter serumfreien Bedingungen inkubiert, mit therapeutischen mAb behandelt und mit den EGFR-Liganden stimuliert. Die EGFR- und ErbB3-Phosphorylierung wurde in einem Luminex-Assay bestimmt (Tab. 4- 6), um zu untersuchen, welchen Einfluss die ErbB3-Expression auf die EGFR-Phosphorylierung unter Behandlung mit verschiedenen EGFR-Liganden und mAb ausübt.

Tab. 4- 6: Relative EGFR- und ErbB3-Phosphorylierung [%] von CHO-Zellen nach Behandlung mit EGFR-Liganden und therapeutischen anti-EGFR Antikörpern.

Be- handlung	CHO-EGFR					CHO-EGFR/ErbB3					
	-	C	M	P	N	-	C	M	P	N	
EGF 10 ng/mL	7446	/	52	/	327	7833	/	/	/	258	EGFR- Phosphorylierung [%]
TGFA 10 ng/mL	4744	/	/	/	35	3117	/	217	/	50	
AREG 20 ng/mL	42	/	656	/	/	33	/	217	/	/	
EREG 10 ng/mL	60	/	4	/	/	17	/	/	/	/	
EGF 10 ng/mL						713	25	38	25	/	ErbB3- Phosphorylierung [%]
TGFA 10 ng/mL						300	75	25	/	25	
AREG 20 ng/mL						/	38	/	/	/	
EREG 10 ng/mL						125	/	/	13	/	

In serumfreiem Medium inkubierte CHO-Zellen wurden mit therapeutischen anti-EGFR Antikörpern (100 µg/mL) für 1 h inkubiert und danach 10 min mit EGFR-Liganden in den gezeigten Konzentrationen stimuliert. Danach wurden Zelllysate hergestellt und die Gesamtphosphorylierung des EGFR und von ErbB3 in einem Luminex-Assay analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung. Die EGFR- und ErbB3-Phosphorylierung in unbehandelten Kontrollzellen entspricht 0%; die EGFR- und ErbB3-Phosphorylierung der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: -, unbehandelt; /, Abnahme oder keine Änderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; M, Matuzumab; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Stimulation der EGFR-exprimierenden CHO-Zellen sowohl durch EGF als auch durch TGFA resultierte in einer sehr starken EGFR-Phosphorylierung. Dabei war die Phosphorylierung, die durch EGF ausgelöst wurde, stärker als die, die nach Stimulation mit TGFA gemessen werden konnte. Im Gegensatz zu EGF und TGFA bewirkten AREG und EREG eine sehr geringe EGFR-Phosphorylierung (Tab. 4- 6). Diese Beobachtungen wurden auch in CHO-EGFR/ErbB3 Zellen gemacht und zeigen, dass die Liganden-induzierte Phosphorylierung des EGFR durch Anwesenheit von ErbB3 nicht beeinflusst wird.

Die Ergebnisse zeigen Parallelen zu den Beobachtungen bei den EGFR-exprimierenden NIH3T3-Zellen. Hier hatten Untersuchungen ergeben, dass die EGFR-Y-Reste Y1173, Y1068 und Y845 durch EGF und TGFA stärker phosphoryliert wurden als durch AREG und EREG. Zwar wurden bei CHO-EGFR Zellen keine spezifischen EGFR-Y untersucht, sondern die Gesamtphosphorylierung des EGFR, dennoch konnte auch hier der stärkere stimulierende Effekt von EGF und TGFA im Vergleich zu AREG und EREG festgestellt werden. Ebenso konnten Parallelen bezüglich des inhibierenden Effekts der mAb gesehen werden: In NIH3T3-Zellen inhibierten Cetuximab und Panitumumab die Aktivierung des EGFR am effektivsten, während Matuzumab und Nimotuzumab unter dem Einfluss von EGF und TGFA schwächere Effekte zeigten.

Bei CHO-EGFR Zellen und CHO-EGFR/ErbB3 Zellen konnte die Phosphorylierung des EGFR vollständig durch Cetuximab und Panitumumab inhibiert werden. Außerdem konnte durch Nimotuzumab die EGFR-Phosphorylierung, die durch Stimulierung der Zellen mit AREG oder EREG bedingt war, komplett gehemmt werden. Bei EGF- und TGFA-stimulierten Zellen erfolgte durch Nimotuzumab eine starke Inhibition (>90%) der EGFR-Phosphorylierung (Tab. 4- 6).

Matuzumab bewirkte eine starke Inhibition der EGFR-Phosphorylierung bei Zellen, die mit EGF, TGFA und EREG stimuliert worden waren. Die Kombination Matuzumab/AREG löste eine stärkere EGFR-Phosphorylierung aus als AREG alleine (Tab. 4- 6).

Nach Stimulation mit EGF wurde in den CHO-EGFR/ErbB3 Zellen eine stärkere ErbB3-Phosphorylierung gemessen als nach Stimulation mit TGFA (Tab. 4- 6). Bei Stimulierung der Zellen mit AREG konnte keine ErbB3-Phosphorylierung gemessen werden. Während Cetuximab und Panitumumab die EGFR-Phosphorylierung komplett inhibierten, traf dies nur teilweise für die ErbB3-Phosphorylierung zu. Allerdings wurde die ErbB3-Phosphorylierung von allen mAb reduziert. In CHO-Zellen, die nur humanen ErbB3-Rezeptor exprimierten, konnte durch EGFR-Liganden keine Phosphorylierung von ErbB3 detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass die ErbB3-Phosphorylierung, die in CHO-EGFR/ErbB3 Zellen gesehen wurde, durch die Heterodimerisierung von EGFR und ErbB3 und die Aktivität der EGFR-TK bedingt war.

4.2.2.2 Effekt der anti-EGFR Antikörper auf die EGFR-Signaltransduktion

Neben der EGFR- und ErbB3-Phosphorylierung sollten auch wichtige Proteine der EGFR-Signaltransduktion (ERK, p38 MAPK, SAPK/JNK, AKT, p85S6K, S6RP und c-Jun) hinsichtlich ihrer Aktivierung durch EGFR-Liganden bzw. der Inhibition durch therapeutische mAb untersucht werden. Die stabil transfizierten CHO-Zellen wurden in serumfreiem Medium inkubiert, mit mAb behandelt und schließlich mit Liganden stimuliert. Die Zellysate wurden im Western Blot auf die Phosphorylierung oben genannter Signalproteine untersucht.

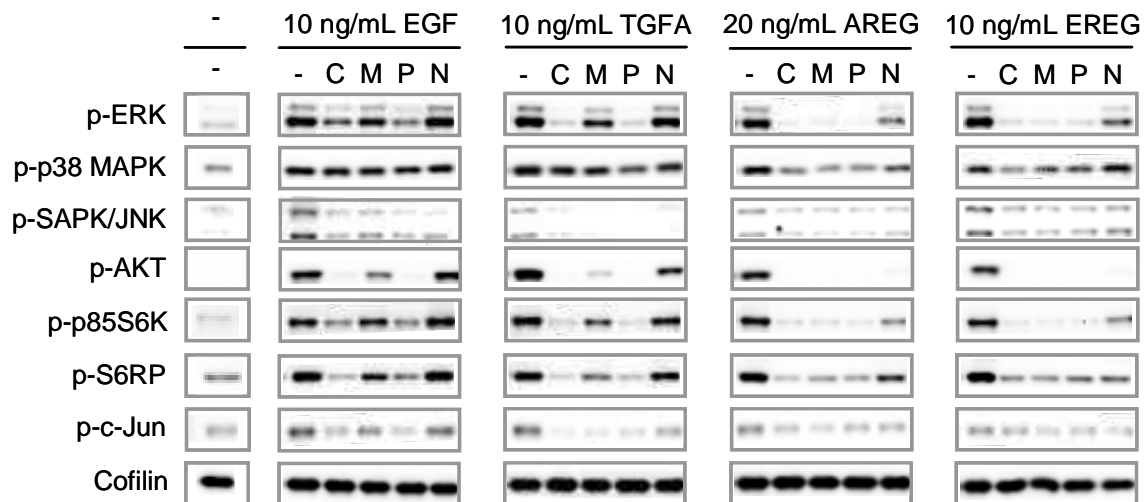


Abb. 4- 25: Vergleich von Signalproteinen in CHO-EGFR Zellen, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt wurden.

CHO-EGFR Zellen, die über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert worden waren, wurden mit therapeutischen anti-EGFR Antikörpern (100 µg/mL) für 1 h inkubiert und danach 10 min mit EGFR-Liganden stimuliert. Danach wurden Zellysate hergestellt, und folgende Proteine wurden im Western Blot analysiert: p-ERK [T202/pY204], p-p38 MAPK [T180/Y182], p-SAPK/JNK [T183/Y185], p-AKT [S473], p-p85S6K [T389], p-S6RP [S235/236], p-c-Jun [T93]. Abkürzungen: -, unbehandelt; AKT, Proteinkinase B; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EREG, Epiregulin; ERK, *Extracellular-signal regulated kinase*; M, Matuzumab; MAPK, *Mitogen-activated protein kinase*; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; p, phospho; S6K, S6 Kinase; S6RP, S6 ribosomales Protein; SAPK/JNK, *Stress-activated protein kinase / c-jun N-terminal kinase*; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

In CHO-EGFR Zellen wurde die EGF- und TGFA-induzierte Aktivierung der untersuchten Proteine durch Cetuximab und Panitumumab inhibiert. Dabei wurde die Phosphorylierung stark gehemmt oder bis auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle gesenkt (AKT, c-Jun ERK, p85S6K und S6RP). Matuzumab und Nimotuzumab vermochten die EGF- und TGFA-induzierte Aktivierung der meisten Proteine nicht oder nur schwach zu inhibieren. In den meisten Fällen wirkten die Antikörper bei Stimulierung der Zellen mit TGFA effektiver als bei Stimulierung mit EGF (Abb. 4- 25).

Unter dem Einfluss von AREG und EREG konnte durch Cetuximab, Matuzumab und Panitumumab eine stärkere Inhibition der Aktivierung von EGFR-Signalproteinen erreicht werden als unter dem Einfluss von EGF und TGFA. Nimotuzumab inhibierte die AREG- und EREG-induzierte Phosphorylierung partiell (Abb. 4- 25).

Die Phosphorylierung von SAPK/JNK und p38 MAPK ließ sich keinem Inhibitionsmuster zuordnen. Während die sehr schwache Phosphorylierung von SAPK/JNK durch alle therapeutischen Antikörper reduziert wurde, konnte eine Beeinflussung der p38 MAPK-Phosphorylierung durch die Antikörper kaum beobachtet werden. Die Antikörper hemmten unter dem Einfluss von EGF oder TGFA die p38 MAPK-Aktivierung nicht; unter dem Einfluss von AREG oder EREG konnte eine leichte Abnahme der Phosphorylierung der p38 MAPK gesehen werden. Nimotuzumab verringerte die AREG- und EREG-bedingte Phosphorylierung nicht (Abb. 4- 25).

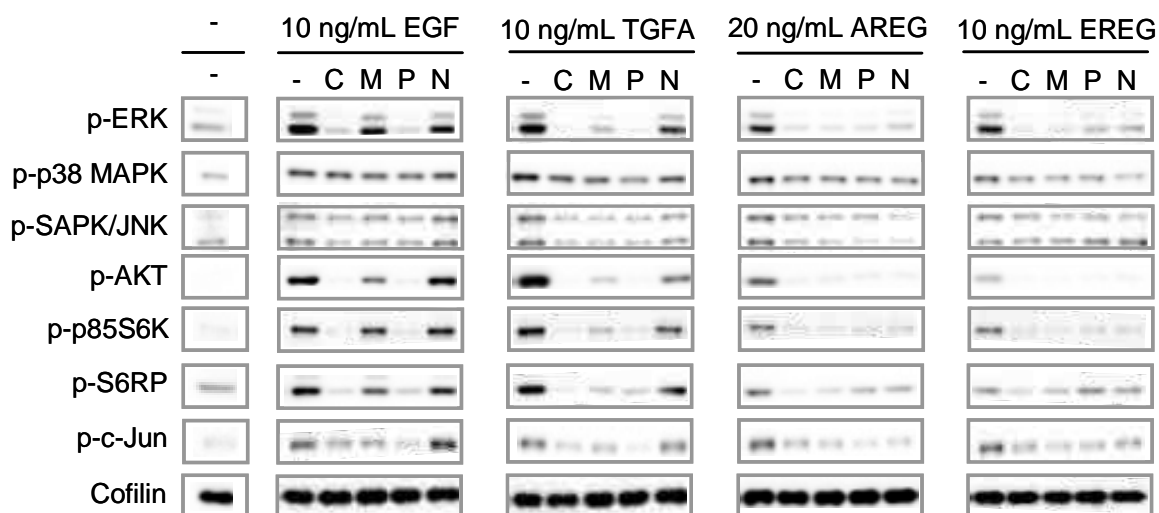


Abb. 4- 26: Vergleich von Signalproteinen in CHO-EGFR/ErbB3 Zellen, die mit EGFR-Liganden und therapeutischen Antikörpern behandelt wurden.

CHO-EGFR/ErbB3 Zellen, die über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert worden waren, wurden mit therapeutischen anti-EGFR Antikörpern (100 µg/mL) für 1 h inkubiert und danach 10 min mit EGFR-Liganden stimuliert. Danach wurden Zelllysate hergestellt, und folgende Proteine wurden im Western Blot analysiert: p-ERK [T202/pY204], p-p38 MAPK [T180/Y182], p-SAPK/JNK [T183/Y185], p-AKT [S473], p-p85S6K [T389], p-S6RP [S235/236], p-c-Jun [T93]. Abkürzungen: -, unbehandelt; AKT, Proteinkinase B; AREG, Amphiregulin; C, Cetuximab; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EREG, Epiregulin; ERK, *Extracellular-signal regulated kinase*; M, Matuzumab; MAPK, *Mitogen-activated protein kinase*; N, Nimotuzumab; P, Panitumumab; p, phospho; S6K, S6 Kinase; S6RP, S6 ribosomales Protein; SAPK/JNK, *Stress-activated protein kinase / c-jun N-terminal kinase*; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Die Ergebnisse reflektieren zum Großteil die Beobachtungen, die schon bezüglich der Wirksamkeit der mAb bei den stabil transfizierten NIH3T3-Zellen gemacht wurden und bei denen Cetuximab und Panitumumab die effektivsten Antikörper darstellten. Unter dem Einfluss von

AREG und EREG war der inhibitorische Effekt von Matuzumab vergleichbar mit Cetuximab und Panitumumab, während Nimotuzumab nur partiell Effekte zeigte.

In CHO-EGFR/ErbB3 Zellen wurde im Vergleich zu CHO-EGFR Zellen eine schwächere Phosphorylierung der Signalproteine festgestellt (Abb. 4- 26). Während die Stimulation der CHO-EGFR Zellen mit den Liganden eine ähnliche Phosphorylierungsintensität eines Signalproteins hervorrief, fiel die Phosphorylierung von AKT, p85S6K und S6RP bei Stimulation der CHO-EGFR/ErbB3 Zellen mit AREG und EREG schwächer aus als bei Stimulation mit EGF und TGFA (Abb. 4- 25 und Abb. 4- 26). Die inhibitorischen Effekte der therapeutischen mAb waren in CHO-EGFR und CHO-EGFR/ErbB3 Zellen vergleichbar.

4.2.2.3 Zusammenfassung des Kapitels 4.2.2

CHO-Zellen, die stabil EGFR oder EGFR und ErbB3 exprimierten, wurden mit verschiedenen Kombinationen aus EGFR-Liganden und therapeutischen anti-EGFR mAb behandelt, um zu untersuchen, ob und inwiefern sich die Expression von ErbB3 auf die Responsivität gegenüber anti-EGFR mAb auswirkt.

Nach Stimulation mit EGFR-Liganden wurde ErbB3 in Zellen, die ErbB3 und EGFR exprimierten, phosphoryliert, nicht aber in Zellen, die nur ErbB3 exprimierten. Die EGFR- und ErbB3-Phosphorylierung konnte durch anti-EGFR mAb gehemmt werden. Es konnte - wie auch schon für die EGFR-exprimierenden NIH3T3-Zellen - gezeigt werden, dass die mAb unter dem Einfluss von AREG und EREG die Signaltransduktion effektiver inhibierten als unter dem Einfluss von EGF und TGFA. Dabei inhibierten Cetuximab und Panitumumab die Signaltransduktion von allen Liganden effektiv, während Matuzumab nur bei AREG und EREG eine starke Inhibition hervorrief. Nimotuzumab inhibierte unter dem Einfluss von AREG und EREG die Phosphorylierung der Signalproteine nur partiell. Unterschiede im Ansprechen auf anti-EGFR mAb in Zellen, die EGFR oder EGFR und ErbB3 exprimierten, konnten nicht festgestellt werden.

4.3 Untersuchung verschiedener KRAS-Mutationen

Der KRAS-Mutationsstatus stellt derzeit den einzigen molekularen Biomarker dar, der bei der Prädiktion des Ansprechens von mCRC-Tumoren auf anti-EGFR mAb Anwendung findet. Es sind verschiedene KRAS-Mutationen bekannt, die unterschiedlichen Einfluss auf Tumorcharakteristika und Krankheitsverlauf ausüben [Andreyev *et al.*, 1998; Winder *et al.*, 2009]. Bezüglich des Ansprechens auf Cetuximab *in vitro* wurde beschrieben, dass Zellen, die

KRAS (G13D) exprimieren, sensitiver reagierten als Zellen mit anderen KRAS-Mutationen [De Roock *et al.*, 2010]. Inwiefern sich unterschiedliche Mutationen auf Stimulierbarkeit mit EGFR-Liganden und Ansprechen auf anti-tumorale Therapeutika auswirken, soll in diesem Teil der Arbeit untersucht werden. Dies wurde in isogenen SW48-Zellen untersucht. SW48 ist eine CRC-Zelllinie, die KRAS Wildtyp exprimiert. Die isogenen SW48-Zellen, die in den Versuchen zum Einsatz kamen, exprimierten KRAS Wildtyp oder die in CRC gängigen KRAS-Mutationen KRAS (G13D), KRAS (G12D), KRAS (G12V), KRAS (G12A) und KRAS (G12C).

4.3.1 Charakterisierung des Zellsystems

4.3.1.1 Expression der humanen EGFR-Liganden

Zur Charakterisierung der KRAS-Zellen wurde die Expression der EGFR-Liganden in diesen Zellen auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR (siehe 3.1.10) untersucht.

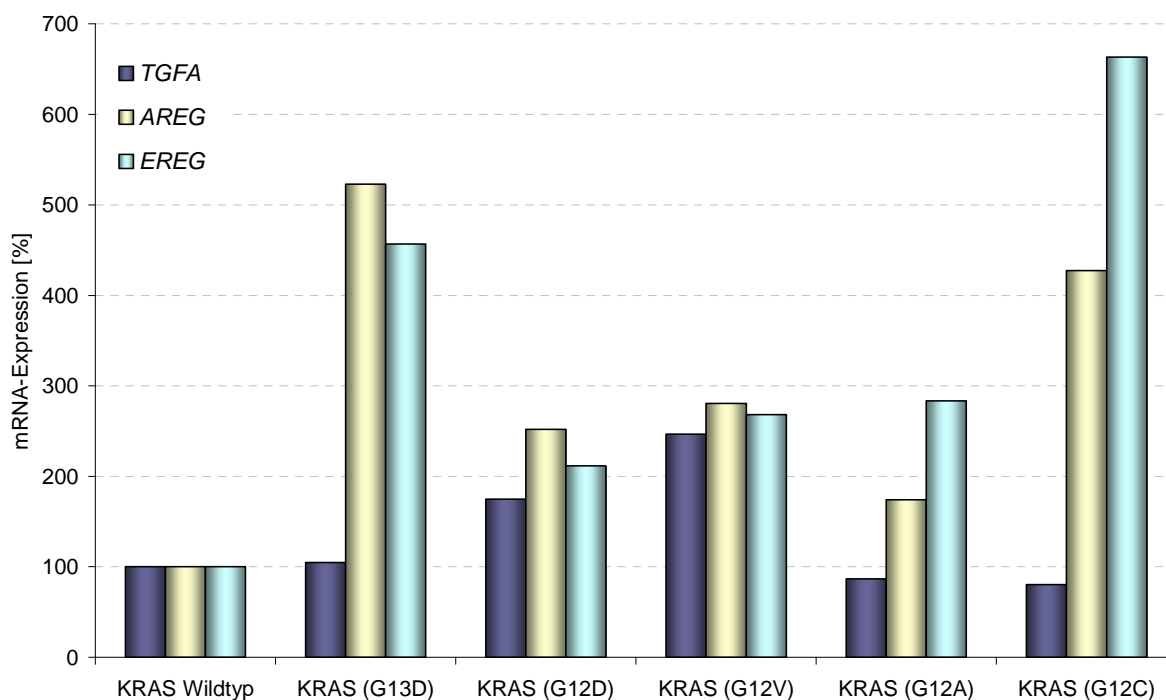


Abb. 4- 27: Expression von TGFA, AREG und EREG in isogenen SW48-Zellen.

Die Expression der EGFR-Liganden TGFA, AREG und EREG in isogenen SW48-Zellen wurde mittels Real-Time PCR nachgewiesen. Die Kopienzahl der Liganden pro 25 ng RNA wurde bestimmt. Die Ligandenexpression von KRAS (G13D)-, KRAS (G12D)-, KRAS (G12V)-, KRAS (G12A)- und KRAS (G12C)-Zellen wurde auf die Expression von KRAS Wildtyp-Zellen normalisiert. **Abkürzungen:** AREG, Amphiregulin; EREG, Epiregulin; KRAS, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; mRNA, *Messenger ribonucleid acid*; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Die *EGF*-Expression war so gering, dass eine Detektion in dem genutzten System nicht möglich war. Im Vergleich zu KRAS Wildtyp-Zellen war die *AREG*- und *EREG*-Expression in den mit KRAS-Mutanten transfizierten Zellen erhöht. Besonders hoch war die *AREG*- und *EREG*-Expression in KRAS (G13D)- und KRAS (G12C)-Zellen, was auf eine stärkere Abhängigkeit vom EGFR-Signaling aber auch auf erhöhte Sensitivität gegen anti-EGFR mAb hinweisen könnte. TGFA wurde im Vergleich zu KRAS Wildtyp-Zellen nur in KRAS (G12D)- und KRAS (G12V)-Zellen stärker exprimiert, in KRAS (G12A)- und KRAS (G12C)-Zellen fiel die TGFA-Expression etwas schwächer aus als in KRAS Wildtyp-Zellen (Abb. 4- 27).

4.3.1.2 Expressionsprofil und Aktivierungsstatus von Signalproteinen

Um den Einfluss von unterschiedlichen KRAS-Mutationen auf Expression oder Aktivierung bestimmter Signalmoleküle zu untersuchen, wurden die isogenen Zellen über Nacht in serumfreiem Medium oder in Vollmedium inkubiert, am nächsten Tag lysiert und Aktivierung und Expression von ausgewählten Proteinen des EGFR-Signalweges im Western Blot bestimmt.

KRAS Wildtyp-, KRAS (G12D)-, KRAS (G12V)- und KRAS (G12C)-Zellen, die mit Serum inkubiert worden waren, hatten eine stärkere EGFR-Phosphorylierung als KRAS (G13D)- und KRAS (G12A)-Zellen. Wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen inkubiert, konnte nur in KRAS (G12C)-Zellen eine stärkere Phosphorylierung des EGFR detektiert werden. Die Expression des EGFR war in KRAS (G12A)- und KRAS (G13D)-Zellen geringer als in den anderen Zellen.

Während in KRAS (G12V)-Zellen eine vergleichsweise geringe ERK-Phosphorylierung festgestellt wurde, konnte in KRAS (G12D)-, KRAS (G12A)- und KRAS (G12C)-Zellen eine stärkere Aktivierung dieses Proteins gesehen werden. Bei KRAS Wildtyp- und KRAS (G13D)-Zellen wurden unterschiedliche ERK-Phosphorylierungslevel ausgemacht, je nachdem, ob die Zellen mit oder ohne Serum inkubiert worden waren.

Phosphoryliertes AKT war nur in Zellen zu dektektieren, die in serumhaltigem Medium inkubiert worden waren. Dabei hatten KRAS (G12D)- und KRAS (G12V)-Zellen die stärkste AKT-Phosphorylierung (Abb. 4- 28).

Das Protein p27 Kip wurde sehr stark in KRAS (G12D)-Zellen exprimiert; in den anderen Zellen war die p27 Kip-Expression schwächer. In KRAS Wildtyp- und KRAS (G13D)-Zellen wurden etwas stärkere p27-Level gesehen als in den restlichen Zellen. KRAS (G12C)-Zellen, die in serumfreiem Medium inkubiert worden waren, hatten eine geringere Cyclin D1 Expression als die anderen Zellen (Abb. 4- 28).

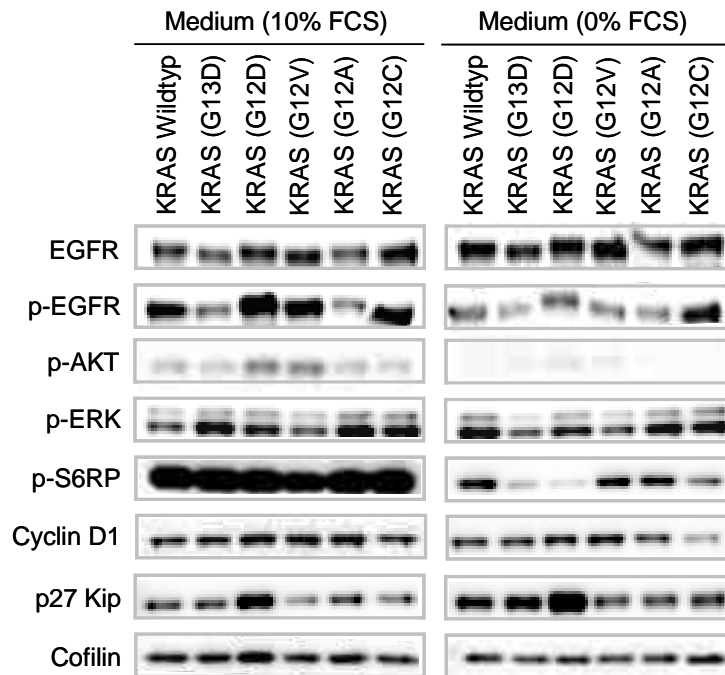


Abb. 4- 28: Untersuchung ausgewählter Signalproteine von isogenen SW48-Zellen.

Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium oder in Vollmedium kultiviert und lysiert. Folgende Proteine wurden im Western Blot analysiert: EGFR, p-EGFR [Y1068], p-AKT [S473], p-ERK [T202/pY204], p-S6RP [S235/236], p-c-Jun [T93], Cyclin D1, p27 Kip. Abkürzungen: AKT, Proteinkinase B; EGFR, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; ERK, *Extracellular-signal regulated kinase*; FCS, *Fetal calf serum*; KRAS, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; p, phospho; S6RP, S6 ribosomales Protein; Y, Tyrosin.

Die stärksten Unterschiede zwischen in Vollmedium und in serumfreiem Medium inkubierten Zellen konnten bei der Phosphorylierung von S6RP festgestellt werden: Während S6RP in Zellen, die in Vollmedium kultiviert worden waren, stark phosphoryliert vorlag, konnten in Zellen, die in serumfreiem Medium inkubiert worden waren, unterschiedliche Aktivitätslevel festgestellt werden: in KRAS Wildtyp-, KRAS (G12V)- und KRAS (G12A)-Zellen lag S6RP stark phosphoryliert vor, in KRAS (G12C)-Zellen wurde S6RP schwächer phosphoryliert. S6RP war in KRAS (G13D)- und KRAS (G12D)-Zellen kaum phosphoryliert (Abb. 4- 28).

In KRAS (G13D)- und KRAS (G12C)-Zellen wurden sehr hohe Expressionslevel an *AREG* und *EREG*-mRNA gefunden (siehe 4.3.1.1), was sich in einem verstärkten EGFR-Signaling auswirken könnte. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen der Ligandenexpression und der Signaltransduktion erkannt werden.

4.3.2 Effekte der EGFR-Liganden auf die EGFR-Signaltransduktion

Um zu untersuchen, inwiefern Zellen mit KRAS-Mutationen auf EGFR-Liganden ansprechen, wurden die isogenen SW48-Zellen über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und am nächsten Tag mit den EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG stimuliert. Die Phosphorylierung des EGFR wurde ebenso wie die der Signalproteine ERK, AKT und S6RP im Western Blot untersucht.

Bei allen Zellen kam es zu einer durch EGF- und TGFA-induzierten Phosphorylierung des EGFR, die zur Aktivierung der untersuchten Signalproteine führte. Dabei konnten keine

starken Abweichungen in der Phosphorylierungsintensität der Signalproteine festgestellt werden (Abb. 4- 29).

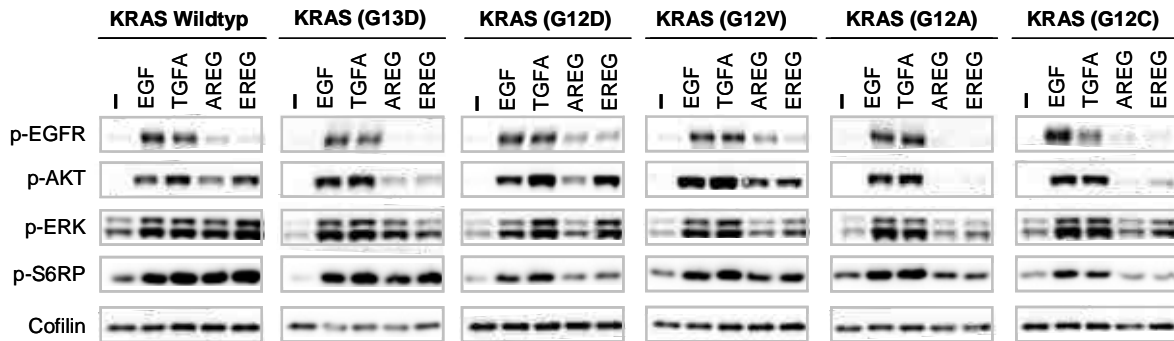


Abb. 4- 29: Vergleich der Signaltransduktion in isogenen SW48-Zellen nach Stimulierung mit EGFR-Liganden.

SW48-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und am nächsten Tag für 10 min mit EGF, TGFA, EREG (10 ng/mL) oder AREG (20 ng/mL) stimuliert. Danach wurden Zelllysate hergestellt, und folgende Proteine wurden im Western Blot analysiert: p-EGFR [Y1068], p-AKT [S473], p-ERK [T202/pY204], p-S6RP [S235/236]. **Abkürzungen:** –, unbehandelt; AKT, Proteinkinase B; AREG, Amphiregulin; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; EGFR, EGF Rezeptor; EREG, Epiregulin; ERK, *Extracellular-signal regulated kinase*; KRAS, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; p, phospho; S6RP, S6 ribosomales Protein; TGFA, transformierender Wachstumsfaktor alpha.

Unterschiede zeigten sich erst beim Vergleich der AREG- und EREG-induzierten Phosphorylierung: In KRAS (G12A)-Zellen, in denen keine EGFR-Phosphorylierung durch AREG/EREG detektiert werden konnte, wurde auch keine AREG/EREG-induzierte Aktivierung der untersuchten Signalproteine gesehen. Dagegen konnte in KRAS (G13D)-Zellen eine Phosphorylierung von ERK und S6RP gesehen werden, die in der Intensität der EGF/TGFA-induzierten Phosphorylierung entsprach. Dadurch zeigten Zellen mit dieser KRAS-Mutation Ähnlichkeit zu den parentalen Zellen, da die Phosphorylierung von S6 und ERK durch alle Liganden ähnlich stark induziert wurde. Dagegen wurde AKT bei KRAS (G13D)-Zellen durch AREG/EREG geringer phosphoryliert als es bei KRAS Wildtyp-Zellen der Fall war (Abb. 4- 29).

In KRAS (G12C)-Zellen, die nach AREG/EREG-Stimulierung eine sehr schwache EGFR-Phosphorylierung zeigten, induzierte AREG keine Phosphorylierung von AKT oder ERK. Durch EREG kam es zu einer schwachen Phosphorylierung von AKT und ERK (Abb. 4- 29).

In KRAS (G12D)- und KRAS (G12V)-Zellen konnte die stärkste AREG/EREG-induzierte EGFR-Phosphorylierung detektiert werden. In diesen Zellen kam es zu einer vergleichsweise schwachen Phosphorylierung der S6RP. Bei KRAS (G12D)-Zellen induzierte EREG eine starke Phosphorylierung von AKT und ERK. Die Phosphorylierung durch AREG fiel dagegen schwächer aus. In KRAS (G12V)-Zellen konnte eine relativ starke AKT-Phosphorylierung

durch AREG und EREG gesehen werden, während die ERK-Phosphorylierung eher schwach ausfiel (Abb. 4- 29).

Es konnte also beobachtet werden, dass Zellen, die verschiedene KRAS-Mutationen exprimierten, sowohl eine unterschiedliche Basalaktivierung von Proteinen hatten (siehe 4.3.1.2) als auch Unterschiede in der EGFR-vermittelten Signaltransduktion zeigten.

4.3.3 Einfluss von anti-tumoralen Therapeutika auf die Proliferation

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche Mutationen im *KRAS*-Gen das Ansprechen der Zellen auf anti-tumorale Therapeutika beeinflussen, wurden die isogenen SW48-Zellen mit dem therapeutischen mAb Cetuximab oder dem Chemotherapeutikum Oxaliplatin, die beide zur Therapie von CRC zugelassen sind, behandelt. Die Zellen wurden dazu in serumhaltigem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab oder Oxaliplatin inkubiert.

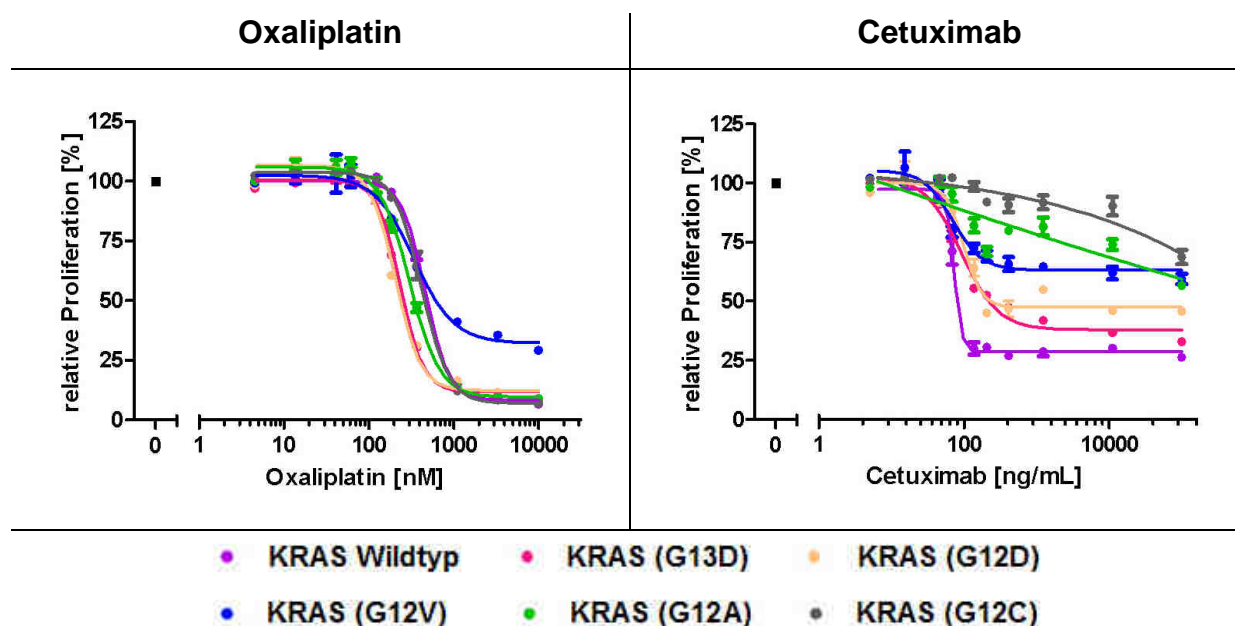


Abb. 4- 30: Konzentrations-Wirkungskurven von Oxaliplatin und Cetuximab.

Isogene SW48-Zellen wurden in serumhaltigem Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Oxaliplatin (zwischen 10 000 nM und 4,6 nM) oder Cetuximab (100 000 ng/mL und 5 ng/mL) behandelt und für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Absorption gemessen, nachdem die Zellen 2 h mit dem WST-1 Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: KRAS, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*.

Die Wachstumskurven der mit Oxaliplatin behandelten Zellen zeigten ähnliche Verläufe: Konzentrationen von Oxaliplatin bis 100 nM wurden von den Zellen toleriert, Konzentrationen über 100 nM führten zu einem Abfall des Zellwachstums und ab 1000 nM wurde das geringste Wachstum gemessen. Bei den höchsten Konzentrationen von Oxaliplatin wurde das Wachstum der Zellen mit Ausnahme von SW48 (G12V)-Zellen um etwa 90% reduziert. Das Wachstum von SW48 (G12V)-Zellen wurde deutlich weniger reduziert (Abb. 4- 30 und Tab. 4- 7).

Abgesehen von KRAS (G12V) führte die Expression von aktivierenden KRAS-Mutationen zu keiner Beeinflussung des Ansprechens von Zellen auf Oxaliplatin-Behandlung.

Tab. 4- 7: Relatives Wachstum der SW48-Zellen 72 h nach Behandlung mit Oxaliplatin (10 µM) oder Cetuximab (100 µg/mL) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

	KRAS Wildtyp	KRAS (G13D)	KRAS (G12D)	KRAS (G12V)	KRAS (G12A)	KRAS (G12C)
Oxaliplatin (10 µM)						
Experiment 1	5,3%	6,6%	9,2%	26,5%	10,3%	6,8%
Experiment 2	6,7%	8,7%	7,5%	29,1%	9,0%	7,0%
Experiment 3	3,1%	6,1%	5,5%	20,4%	5,6%	5,0%
Cetuximab (100 µg/mL)						
Experiment 1	25,4%	39,9%	43,6%	58,9%	63,4%	52,9%
Experiment 2	18,4%	32,9%	45,8%	59,4%	56,6%	68,7%
Experiment 3	25,6%	54,5%	36,3%	88,1%	59,9%	34,2%

Isogene SW48-Zellen wurden in serumhaltigem Medium mit Oxaliplatin (10 µM) oder Cetuximab (100 µg/mL) behandelt und für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Absorption gemessen, nachdem die Zellen 2 h mit dem WST-1 Reagenz inkubiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung. Die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen entspricht 100%; die Proliferation der behandelten Zellen wurde mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Abkürzungen: KRAS, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*.

Dagegen kam es bei Inkubation der Zellen mit Cetuximab zu sehr unterschiedlicher Wachstumsinhibition. KRAS Wildtyp-Zellen stellten die Cetuximab-sensitivsten Zellen dar, da sie schon bei vergleichsweise geringen Cetuximab-Konzentrationen (ca. 100 ng/mL) ansprachen. Alle anderen Zellen sprachen erst bei Konzentrationen an, die über 100 ng/mL lagen (Abb. 4- 30). Dabei konnte ein Rückgang des Zellwachstums zwischen 11,9% und 67,1% gesehen werden (Tab. 4- 7). Beim Vergleich von drei unabhängigen Experimenten konnte bestätigt werden, dass KRAS Wildtyp-Zellen bei der höchsten Cetuximab-Konzentration

(100 µg/mL) die geringste Proliferation hatten. Das Ansprechen der anderen Zellen variierte je nach Experiment, es konnte jedoch der Trend beobachtet werden, dass KRAS (G13D)- und KRAS (G12D)-Zellen sensitiver auf Cetuximab reagierten als KRAS (G12A)- und KRAS (G12V)-Zellen (Tab. 4- 7).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich aktivierende KRAS-Mutationen kaum auf das Ansprechen von Zellen auf Oxaliplatin auswirken, während die Cetuximab-vermittelte Inhibition des Zellwachstums je nachdem, welche KRAS-Mutation vorliegt, unterschiedlich ausfällt.

4.3.4 Zusammenfassung des Kapitels 4.3

In diesem Teil sollte untersucht werden, ob sich verschiedene KRAS-Mutationen unterschiedlich auf die Signaltransduktion von Zellen und deren Responsivität gegenüber anti-tumoraler Therapie auswirken.

Die untersuchten KRAS-Mutationen führten zu Unterschieden in der Signaltransduktion der Zellen. Zum einen konnte eine unterschiedlich starke Basalaktivierung bestimmter Signalproteine erkannt werden, und zum anderen wurden Unterschiede in der Signaltransduktion nach Ligandenstimulation detektiert. Zellen, die verschiedene KRAS-Mutationen trugen, zeigten ein unterschiedliches Ansprechen auf die EGFR-Liganden, vor allem auf die Liganden AREG und EREG.

Es zeigte sich, dass Zellen, die KRAS (G13D), KRAS (G12D), KRAS (G12A) oder KRAS (G12C) exprimierten, ähnlich sensitiv auf Oxaliplatin-Behandlung reagierten wie Zellen, die KRAS Wildtyp exprimierten. Dagegen hatte Oxaliplatin einen geringeren inhibierenden Effekt auf die Proliferation von KRAS (G12V)-Zellen. Die Behandlung der Zellen mit Cetuximab zeigte, dass Zellen, die KRAS-Mutationen trugen, resistenter gegen Cetuximab waren als KRAS Wildtyp-Zellen. Unterschiede ließen sich auch zwischen den KRAS-Mutationen erkennen: KRAS (G13D)- und KRAS (G12D)-Zellen reagierten tendentiell sensitiver als KRAS (G12A)- und KRAS (G12V)-Zellen auf Cetuximab.

5. Diskussion

Gerichtete Tumorthérapien fokussieren sich auf die *Targetierung* von Proteinen, deren Funktion den Tumorzellen einen Wachstums- oder Überlebensvorteil verschafft. Ein prominentes *Target* von gerichteten Therapien ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), dessen Expression in vielen Tumoren mit aggressivem Krankheitsverlauf, schlechter Prognose und vermindertem Überleben der Patienten assoziiert wurde [Baselga, 2002]. Monoklonale Antikörper (mAb), die die extrazelluläre Domäne des EGFR binden, können das Tumorwachstum inhibieren und sich positiv auf das Überleben von Tumorpatienten auswirken [Gröner *et al.*, 2004; Hynes und Lane, 2005; Mendelsohn und Baselga, 2006]. Dennoch profitieren nicht alle Patienten von der Behandlung mit mAb. Für einen Behandlungserfolg ist demnach die Identifizierung von Patienten, die Nutzen aus der Behandlung ziehen, ein wichtiges Ziel.

In dieser Arbeit wurden Proteine aus dem EGFR-Signalnetzwerk untersucht, für die bereits Hinweise existierten, Einfluss auf das Ansprechen von Tumorzellen auf therapeutische anti-EGFR mAb zu nehmen.

5.1 Einfluss der EGFR-Liganden auf Wachstum, Signaltransduktion und Sensitivität von Zellen gegen anti-EGFR Antikörper

5.1.1 Effekte der EGFR-Liganden auf Proliferation, Genexpression und Signaltransduktion

Zu den Liganden, die den EGFR binden und aktivieren können, gehören EGF, TGFA, AREG und EREG. Sie unterscheiden sich durch gewebespezifische Expression, unterschiedliche Rezeptoraffinität und -spezifität. Während AREG und EREG zu der Gruppe der Liganden mit geringer Rezeptorbindungsaffinität gehören, weisen sich EGF und TGFA durch eine hohe Affinität zum EGFR aus [Jones *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2009].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Liganden, die den EGFR hochaffin binden, eine stärkere EGFR-Phosphorylierung und ein stärkeres adhäsionsunabhängiges Wachstum hervorrufen als geringaffine Liganden (Abb. 4- 5 und Abb. 4- 7). Diese Beobachtungen könnten eine Abhängigkeit des Zellwachstums von der Intensität der EGFR-Phosphorylierung aufzeigen. Allerdings konnte bei AREG- und EREG-Konzentrationen, die vergleichbares Wachstum auslösten wie EGF und TGFA, eine EGFR-Phosphory-

lierung gesehen werden, die schwächer ausfiel als die von EGF und TGFA (Daten nicht gezeigt).

Es existiert eine Reihe von Veröffentlichungen, die sich mit den durch die unterschiedliche Affinität bedingten Effekten der EGFR-Liganden beschäftigen:

Die Bindung eines Liganden an den EGFR führt zu charakteristischen kurvenförmigen (*concave-up*) Scatchard Plots, deren molekulare Ursachen kontrovers diskutiert werden. Diese Bindungscharakteristika wurden meistens mit der Existenz von zwei EGFR-Populationen auf der Zelloberfläche interpretiert, wobei ~10% des Gesamt-EGFR die hochaffine Rezeptorklasse ($K_D = 300$ pM) und die restlichen ~90% geringaffine Rezeptoren ($K_D = 2$ nM) ausmachen würden. Modelle, in denen Dimere die hochaffinen Bindestellen und Monomere die geringaffinen Bindestellen repräsentieren, können die Bindungskurven nicht erklären, da sie zu positiver Kooperativität führen würden, was nicht in Übereinstimmung mit den Bindungsdaten zu bringen ist [Lemmon, 2009].

Inzwischen gibt es Hinweise (durch die Untersuchung des EGFR von *Drosophila melanogaster*), dass sich die hoch- und geringaffine Bindung von Liganden mit dem Modell der negativen Kooperativität schlüssiger erklären lässt als mit der Existenz unterschiedlicher EGFR-Klassen. Dabei repräsentieren die hoch- und geringaffinen EGF-Bindestellen keine unterschiedlichen EGFR-Populationen, sondern Bindestellen innerhalb eines EGFR-Dimers. Die Bindung des ersten Liganden an den Rezeptor, die zur Bildung eines einfach besetzten Dimers führt, geschieht hochaffin und resultiert in einem asymmetrischen Dimer, dessen Affinität, einen zweiten Liganden zu binden, reduziert ist [Alvarado *et al.*, 2010]. Bei geringen Ligandenkonzentrationen käme es hauptsächlich zu einfach besetzten Dimeren, bei hohen Konzentrationen zu zweifach besetzten Dimeren [Krall *et al.*, 2011]. Zwar wurden diese Beobachtungen noch nicht für den humanen EGFR bestätigt, es ist aber möglich, dass ein gleicher Regulierungsmechanismus besteht. Dieser würde sich auch auf die Bindung von Liganden auswirken: Liganden mit geringer Bindungsaffinität würden die Bildung von einfach besetzten Dimeren induzieren, während die hochaffinen Liganden beide Bindestellen besetzen könnten [Alvarado *et al.*, 2010].

Unter Berücksichtigung des eben beschriebenen Modells sollte die Interaktion zwischen dem EGFR und den hochaffinen Liganden EGF und TGFA bei ausreichender Ligandenkonzentration zu zweifach besetzten Dimeren führen. Dagegen würden die geringaffinen Liganden AREG und EREG nur einfach besetzte Dimere bilden. Diese könnten sich von zweifach besetzten Dimeren in der Stabilität oder der Signaltransduktion aufgrund unterschiedlicher Konformation der intrazellulären EGFR-Domänen unterscheiden. Dementsprechend müssten Liganden, die sich in der Affinität unterscheiden, qualitativ unterschiedliche Antworten in der Zelle auslösen. Unterschiedliche Effekte der Ligandengruppen

EGF/TGFA und AREG/EREG konnten sowohl im dreidimensionalen Wachstum als auch in der EGFR-Phosphorylierung gesehen werden. Außerdem zeigten sich in der mRNA-Induktion auch Unterschiede, die die Einteilung der Liganden in EGF/TGFA und AREG/EREG unterstützten. Zwar konnten in der zeitabhängigen Phosphorylierung von Signalproteinen nur bei AKT Unterschiede detektiert werden, die sich durch Stimulation der Zellen mit den verschiedenen Liganden ergaben; diese deuten allerdings auch auf ähnliche Effekte der Liganden EGF/TGFA zum einen und AREG/EREG zum anderen hin.

Krall *et al.* haben beobachtet, dass hoch- und geringaffine EGFR-Liganden-Interaktionen unterschiedliche Signalwege aktivieren. Derselbe Ligand kann durch unterschiedliche Konzentrationen qualitativ unterschiedliche Antworten induzieren. So stimulieren geringe Konzentrationen an EGF oder TGFA den RAS-MAPK- und PI3K-AKT-Signalweg, während STAT-Signalwege erst bei höheren Konzentrationen induziert werden [Krall *et al.*, 2011]. Allerdings sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Ligandenkonzentrationen um ein Vielfaches höher als die Konzentrationen, die für geringaffine und hochaffine Rezeptor-Ligand-Interaktionen beobachtet wurden (3 nM für geringaffin, 0,3 nM für hochaffin). Es wäre möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationen keine Unterscheidung zwischen hoch- und geringaffinen Effekten zulassen. Daher wäre es denkbar, dass geringere Ligandenkonzentrationen in stärkeren Effekten der Liganden auf die Signaltransduktion resultieren könnten.

5.1.2 Untersuchung der endogenen Ligandenexpression

Bei Bestimmung der EGF- und TGFA-Konzentration im Überstand der transfizierten EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen wurden bei unbehandelten Zellen geringere Mengen an Ligand als in mit mAb behandelten Zellen festgestellt. Dagegen hatte die Behandlung der Leervektor-Zellen mit mAb weder Auswirkung auf deren Proliferation (Daten nicht gezeigt) noch auf die Ligandenkonzentration im Überstand. Die Ligandenkonzentrationen in den Überständen von Leervektor-Zellen und von den mit mAb behandelten EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen waren vergleichbar (Abb. 4- 20).

Sowohl Leervektor-Zellen als auch EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen sezernierten Liganden in den Überstand. Da Leervektor-Zellen keinen geeigneten Rezeptor besitzen, an den die humanen Liganden binden könnten, und bei mit mAb behandelten EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen der Rezeptor blockiert vorlag, kam es zu einer Anreicherung der humanen Liganden im Überstand. Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen von Mutsaers *et al.* bestätigt, die eine Anreicherung der TGFA-Konzentration im Überstand von

Zelllinien, die mit Cetuximab behandelt worden waren, detektieren konnten. Auch im Serum von Mäusen, die mit anti-Maus EGFR-mAb behandelt wurden, konnten erhöhte Werte an TGFA, AREG und EREG detektiert werden. Die erhöhte Ligandenkonzentration im Überstand der behandelten Zellen war Folge der andauernden Ligandenproduktion und nicht von transkriptioneller Hochregulierung des TGFA-Gens [Mutsaers *et al.*, 2009].

Unbehandelte EGFR 521K- und EGFR 521R-Zellen zeigten geringere Konzentrationen an EGF und TGFA im Überstand als Zellen, die mit mAb behandelt worden waren. Da in den unbehandelten Zellen der EGFR nicht blockiert vorlag, konnte hier Ligandenbindung und nachfolgende Rezeptorinternalisierung stattfinden, was zu einem Verbrauch der Liganden führte.

Zwar lösen EGF, TGFA, AREG und EREG die Internalisierung des EGFR aus, sie wirken sich jedoch unterschiedlich auf das *Sorting* aus. Der EGFR gelangt nach Aktivierung durch TGFA, AREG oder EREG wieder an die Zelloberfläche (*Recycling*) und kann reaktiviert werden. Dagegen wird der EGFR nach Stimulation mit EGF degradiert, was zur Beendigung der Aktivierung des EGFR führt [Roepstorff *et al.*, 2009]. Neben der geringen EGF-Konzentration im Überstand könnte die Degradierung des Rezeptors erklären, weshalb EGF-exprimierende Zellen eine geringere Proliferation hatten als Zellen, welche TGFA, AREG und EREG exprimierten.

Es konnte keine Anreicherung von AREG im Überstand nach Behandlung der Zellen mit mAb gesehen werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die vorliegende AREG-Konzentration so hoch war, dass Internalisierung und Abbau nicht ins Gewicht fielen. Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass die Anreicherung des Liganden TGFA, der in geringerer Konzentration als AREG aber in höherer Konzentration als EGF vorlag, geringer war als die Anreicherung von EGF.

Interessanterweise wirkte sich Ligandenexpression und exogene Ligandengabe unterschiedlich auf das Wachstum der Zellen aus. So hatten TGFA, AREG und EREG ähnlich starke mitogene Effekte, während das Wachstum der Zellen unter EGF sehr gering ausfiel. Wahrscheinlich war die EGF-Konzentration, die im Überstand der EGF-transfizierten Zellen detektiert werden konnte, zu gering, um hinreichend Proliferation auszulösen. Zwar lagen die Liganden TGFA und AREG in höheren Konzentrationen vor als EGF, trotzdem waren diese Konzentrationen um ein Vielfaches geringer als bei exogener Ligandengabe, die zu wesentlich geringeren proliferativen Effekten führte. Die geringe Konzentration an TGFA könnte erklären, weshalb die inhibitorischen Effekte der mAb unter TGFA-Expression stärker waren (Abb. 4- 21), als es bei exogener Ligandengabe beobachtet werden konnte: Die geringe Menge an TGFA genügte nicht, um erfolgreich mit den mAb um die Bindung an den EGFR zu konkurrieren.

Die starke Proliferation der Zellen unter endogener Expression von TGFA, AREG und EREG könnte mit Mechanismen der EGFR-Aktivierung zu tun haben, die nur bei endogener Ligandenexpression auftreten. Zum einen wurde beschrieben, dass membranständige Liganden Rezeptoren benachbarter Zellen stimulieren können. Bisher wurde dieser juxtakrine Mechanismus für HB-EGF, BTC, TGFA und AREG beschrieben. Dabei könnte es zu unterschiedlichen biologischen Antworten kommen, da beispielsweise bidirektionales *Signaling* oder verminderte Rezeptorendozytose durch die Bildung von membranständigen EGFR-Liganden-Komplexen möglich wären [Anklesaria *et al.*, 1990; Higashiyama *et al.*, 1995; Inui *et al.*, 1997; Singh und Harris, 2005]. Für EGF konnte kein juxtakriner Mechanismus nachgewiesen werden [Willmarth und Ethier, 2006]. Dies könnte die geringe Proliferation der EGF-transfizierten Zellen im Vergleich zu der starken Proliferation der AREG-, EREG- oder TGFA-transfizierten Zellen erklären.

Bei der Abspaltung der Liganden von der Membran kommt es neben der Bildung des löslichen Liganden, der die Aktivierung von Rezeptoren auslösen kann, auch zur Bildung des intrazellulären C-terminalen Fragments (CTF). Im Fall von HB-EGF transloziert es in den Zellkern und kann dort durch Inhibition von Transkriptionsrepressoren die S-Phase induzieren [Higashiyama *et al.*, 2008; Kataoka, 2009]. Zwar gibt es noch keine entsprechenden Daten zu anderen EGFR-Liganden, es wäre aber durchaus möglich, dass die stärkere Proliferation der Zellen durch *Signaling* des CTF ausgelöst werden könnte.

Kürzlich wurde ein neuer Mechanismus der EGFR-Aktivierung durch Liganden beschrieben, bei dem Liganden als extrazelluläre Vesikel, den Exosomen, aus Zellen entlassen werden und auf andere Zellen wirken können. Für AREG-Exosomen wurde gezeigt, dass sie die Invasivität der Empfängerzellen stärker induzierten als vergleichbare Mengen an rekombinantem AREG [Higginbotham *et al.*, 2011].

Die endogene Ligandenexpression scheint also zu vielfältigeren Signalmechanismen zu führen als die exogene Gabe von Liganden. Daher könnten die beobachteten Unterschiede bei der Proliferation mit den unterschiedlichen Mechanismen erklärt werden.

5.1.3 Ansprechen von Tumorzellen auf therapeutische anti-EGFR Antikörper unter dem Einfluss verschiedener EGFR-Liganden

Aus klinischen Studien gibt es Hinweise, dass das Vorhandensein bestimmter EGFR-Liganden das Ansprechen von Tumoren auf therapeutische anti-EGFR mAb beeinflussen kann. In mehreren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass hohe mRNA-Expression der EGFR-Liganden *AREG* und *EREG* mit erhöhter Sensitivität gegen Cetuximab-basierte Therapien korreliert [Baker *et al.*, 2011; Khambata Ford *et al.*, 2007].

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Anwesenheit von AREG oder EREG zu erhöhter Sensitivität gegenüber Cetuximab-Behandlung führt. In den gezeigten *in vitro* Versuchen konnte unter dem Einfluss von AREG oder EREG eine effektivere Hemmung des Zellwachstums und der Phosphorylierung von EGFR-Signalproteinen durch therapeutische mAb gesehen werden als unter dem Einfluss von EGF oder TGFA (siehe 4.1.5.1, 4.1.5.2 und 4.1.5.4). Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellen exogen mit EGFR-Liganden behandelt; in den klinischen Studien konnte jedoch nur eine Korrelation zwischen den *AREG*- und *EREG*-mRNA-Leveln und dem Ansprechen auf Cetuximab-basierte Therapien gefunden werden, nicht aber zwischen Ansprechen und *AREG*- oder *EREG*-Konzentration im Serum. Es wurde diskutiert, dass post-transkriptionale Prozessierung der Gene *AREG* und *EREG* zu autokrinem, onkogenem EGFR-Signaling führen könnte [Khambata-Ford *et al.*, 2007]. In den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Resultaten wurde deutlich, dass sich Stimulation der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen mit den EGFR-Liganden stark auf deren *Areg*- und *Ereg*-Genexpression auswirkte, aber kaum auf die Expression der Gene *Egf* und *Tgfa*. Eine erhöhte *AREG*- und *EREG*-Expression auf mRNA-Ebene könnte auf autokrine oder parakrine Ligandenloops und starkes EGFR-*Signaling* hinweisen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb *AREG* und *EREG*, nicht jedoch *EGF* und *TGFA*, den Tumor eher in eine dauerhafte EGFR-Abhängigkeit treiben und damit letztlich prädiktive Marker darstellen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten stimmen mit *in vitro* Modellen überein, in denen gezeigt werden konnte, dass die Expression der EGFR-Liganden die Sensitivität einiger Zelllinien gegen anti-EGFR Therapien modulieren kann. So wurde beobachtet, dass Zelllinien mit hohem *AREG*-Expressionsniveau besser auf die anti-EGFR Therapeutika Gefitinib und Cetuximab ansprechen als Zellen mit geringer *AREG*-Expression [Yonesaka *et al.*, 2008]. Außerdem wurde gezeigt, dass EGF und TGFA die inhibierende Wirkung von Cetuximab negativ beeinflussen können [Karnes *et al.*, 1992].

Die Unterschiede, die die EGFR-Liganden auf Zellwachstum, Genexpression und Signaltransduktion ausübten, ließen eine Einteilung der Liganden in die Gruppen *AREG/EREG* und *EGF/TGFA* zu, welche mit den unterschiedlichen Affinitäten der Liganden übereinstimmt. Daher ist anzunehmen, dass das unterschiedliche Ansprechen der Zellen auf mAb unter dem Einfluss der EGFR-Liganden hauptsächlich durch die unterschiedlichen Affinitäten und Wirkmechanismen der therapeutischen anti-EGFR mAb und die unterschiedlichen Affinitäten der Liganden zustande kommt.

Cetuximab und Panitumumab binden mit hoher Affinität ähnliche Epitope in Domäne III der autoinhibierten Konformation des EGFR, die wichtig für die Ligandenbindung sind. Beide

mAb konkurrieren mit den Liganden um die Bindestelle am EGFR [Li *et al.*, 2005; Schmitz und Ferguson, 2009]. Unter dem Einfluss von EGF und TGFA wurde ein geringeres Ansprechen der Zellen auf Cetuximab und Panitumumab gesehen, was darauf hinweisen kann, dass diese mAb die EGF- und TGFA-vermittelte Dimerisierung von EGFR-Molekülen nicht vollständig verhindern können. Da AREG und EREG den EGFR mit geringerer Affinität binden als EGF und TGFA [Shoyab *et al.*, 1989; Toyoda *et al.*, 1995], könnten die mAb erfolgreicher mit AREG und EREG um die Bindungsstelle am EGFR kompetitieren und somit eine effektivere Antwort auslösen.

Das Zellwachstum wurde prinzipiell durch Cetuximab und Panitumumab effektiver gehemmt als durch Matuzumab und Nimotuzumab. Nimotuzumab und Matuzumab unterscheiden sich von Cetuximab und Panitumumab in einer geringeren Affinität, den EGFR zu binden [Alvarenga, 2010]. Dadurch könnte es im Fall von EGF und TGFA zu einer geringeren Wirkung von Matuzumab und Nimotuzumab kommen, da diese Liganden den EGFR hochaffin binden und eine stärkere Dimerisierung auslösen als AREG oder EREG.

Die stärkere Inhibition des Wachstums und der Phosphorylierung unter dem Einfluss von AREG oder EREG machte sich vor allem in der Effektivität von Matuzumab bemerkbar.

Matuzumab blockiert nicht direkt die Ligandenbindung wohl aber die Konformationsänderung des EGFR, die zur Dimerisierung notwendig ist [Schmiedel *et al.*, 2008]. Der Komplex, den Matuzumab mit dem EGFR bildet, ist im Vergleich zu den Komplexen, die die anderen mAb mit dem EGFR ausbilden, schwach [Alvarenga, 2010]. Daher könnte es bei den hochaffinen Liganden zur Ausbildung von stabilen EGFR-Dimeren kommen, auch wenn Matuzumab anwesend ist. Dagegen würden die geringaffinen Liganden die Stabilität des EGFR-Matuzumab-Komplexes nicht beeinflussen. Diese Hypothese wird durch die Daten unterstrichen, die sich bei der Erhöhung der Ligandenkonzentration um das Zehnfache ergaben: Die Erhöhung der EGF- oder TGFA-Konzentration beeinträchtigte die Wirkung von Matuzumab, während die Erhöhung der AREG- oder EREG-Konzentration keine Auswirkung auf die Effektivität von Matuzumab hatte (siehe 4.1.5.1 und 4.1.5.2), die ähnlich stark war wie die von Cetuximab oder Panitumumab.

Nimotuzumab hatte von allen getesteten Antikörpern die schwächste Aktivität. Nimotuzumab interferiert ebenso wie Cetuximab und Panitumumab mit der Ligandenbindung [Talavera *et al.*, 2009]. Im Gegensatz zu Cetuximab und Panitumumab kommt es bei Nimotuzumab nur zu einer stabilen Anheftung an die Zelloberfläche, wenn der mAb bivalent binden kann. Nimotuzumab bindet also nur Zellen, die mittlere bis hohe EGFR-Expressionslevel haben [Ramakrishnan *et al.*, 2009]. Es bestünde die Möglichkeit, dass das genutzte Zellsystem zu

wenig humanen EGFR exprimiert, als dass Nimotuzumab stabil binden und somit die Signaltransduktion verhindern könnte. Dagegen spricht, dass Nimotuzumab in Anwesenheit von AREG oder EREG wachstumsinhibierend wirkte (Abb. 4- 18, Abb. 4- 19) und somit auch den EGFR effektiv binden sollte.

Da die Affinität von Nimotuzumab, den EGFR zu binden, geringer ist als bei den anderen mAb [Alvarenga, 2010], könnten die hochaffinen Liganden EGF oder TGFA mit Nimotuzumab um die EGFR-Bindung kompetitieren und dessen Bindung verhindern. Dagegen würde die Bindung von Nimotuzumab an den EGFR unter Einfluss der geringaffinen Liganden zustande kommen.

Eine andere Erklärung bietet das Modell von Talavera *et al.*, in welchem Nimotuzumab zwar die Bindung von EGF inhibiert, nicht aber die aktive Konformation des Rezeptors, da Nimotuzumab nicht mit dem basalen Niveau an Liganden-unabhängiger EGFR-Aktivierung zu interferieren scheint [Talavera *et al.*, 2009].

Die Anreicherung der endogenen Liganden EGF und TGFA im Überstand der NIH3T3-Zellen nach Behandlung mit mAb (siehe 4.1.5.3) könnte dieses Model bestätigen: Die Proliferation der Nimotuzumab-behandelten Zellen, die EGF oder TGFA exprimierten, wurde nicht oder kaum inhibiert und war ähnlich stark wie die der unbehandelten, EGF- oder TGFA-exprimierenden Zellen. Dagegen wurde die Proliferation der Zellen, die mit den anderen mAb behandelt wurden, stark inhibiert. Bei allen mit mAb behandelten Zellen stimmte die Anreicherung der Liganden in etwa überein (Abb. 4- 20 und Abb. 4- 21). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass Nimotuzumab die Ligandenbindung an den EGFR ebenso effektiv blockiert wie Cetuximab und Panitumumab, andererseits aber Wachstumssignale zulässt. Das Wachstum der Zellen kann jedoch nicht von liganden-unabhängiger EGFR-Aktivierung herühren, da es sonst nur so stark sein müsste wie das der Zellen, die kein TGFA exprimieren. Es bestünde die Möglichkeit, dass Nimotuzumab selbst die aktive Konformation des Rezeptors stabilisiert und die Bildung einfach besetzter Dimere zulässt. Dies könnte zu der Signaltransduktion und Proliferation führen, die unter Nimotuzumab-Einfluss beobachtet werden konnte (siehe 4.1.5).

5.2 Einfluss des EGFR-Polymorphismus R521K auf Proliferation, Genexpression und Ansprechen von Zellen auf anti-EGFR Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften der EGFR-Varianten 521K und 521R und deren Rolle als potentieller Biomarker für anti-EGFR mAb untersucht.

Ein Unterschied zwischen den EGFR-Varianten konnte in der Wachstumsgeschwindigkeit bei Inkubation in serumfreiem Medium gesehen werden. Während EGFR 521R-Zellen ähnlich stark wie Leervektor-Zellen wuchsen, konnte für EGFR 521K-Zellen ein schwächeres Wachstum festgestellt werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die EGFR 521K-Variante entweder inhibierend auf die Proliferation von Zellen wirkt oder von Faktoren, die die Proliferation beeinflussen, abhängiger ist als die EGFR 521R-Variante.

Die hier vorliegenden mRNA-Daten zeigen, dass sich die Expression der EGFR-Varianten unterschiedlich auf die Induktion bestimmter Gene auswirkt. Unter den Genen, die in der EGFR 521R-Variante höher exprimiert sind, befinden sich Gene, die mit den Prozessen Signaltransduktion, Zellmorphogenese und Wachstumsfaktorbindung assoziiert werden. In der EGFR 521K-Variante waren Gene, die Zelltod und Zellzyklusarrest (z.B. *Cdkn1a*) vermitteln, stark vertreten. Dies könnte auf eine stärkere Regulierung der EGFR 521K-Variante bzw. auf einen stimulierenden Effekt der EGFR 521R-Variante hinweisen.

Die stärkere Abhängigkeit von stimulierenden Faktoren bei EGFR 521K-Zellen zeigte sich dadurch, dass EGFR 521K-Zellen im Monolayer-Assay stärker von Liganden profitierten als EGFR 521R-Zellen (4.1.2.1). Die schneller wachsenden EGFR 521R-Zellen sprachen weniger auf Liganden an, da sie von sich aus schon stärker proliferierten. Zwar reagierten EGFR 521R-Zellen im Gegensatz zu EGFR 521K-Zellen im dreidimensionalen Wachstum schon auf geringe AREG- und EREG-Konzentrationen, dies unterstreicht jedoch nur das aggressivere Potential dieser Zellen, die unter schwierigeren Wachstumsbedingungen einfacher proliferierten als EGFR 521K-Zellen. Des Weiteren konnte bei EGFR 521R-Zellen eine reduzierte Abhängigkeit vom EGFR-*Signaling* erkannt werden: Obwohl Cetuximab und Panitumumab die EGF- oder TGFA-vermittelte Phosphorylierung des EGFR 521R vollständig inhibierten, kam es bei EGFR 521R-Zellen im Vergleich zu EGFR 521K-Zellen zu einer geringeren Inhibition der Phosphorylierung von EGFR-*downstream* Signalproteinen.

Das langsamere Wachstum der EGFR 521K-Zellen könnte auch im Zusammenhang mit klinischen Daten stehen, durch die eine Rolle der EGFR 521K-Variante als prognostischer Marker gezeigt werden konnte. In mCRC-Patienten konnte die Expression dieser EGFR-Variante mit reduzierter Tumordinvasion, geringerer Metastasierung und längerem krankheitsfreiem und Gesamtüberleben der Patienten assoziiert werden [Wang *et al.*, 2007].

Prinzipiell konnte in der vorliegende Arbeit für EGFR 521K-Zellen ein besseres Ansprechen auf Behandlung mit mAb gezeigt werden. Dies war sowohl in der Inhibition der Proliferation als auch in der Inhibition der EGFR-Signaltransduktion ersichtlich und könnte durch eine verringerte Affinität der Liganden gegen die EGFR 521K-Variante bedingt sein. Dabei könnten Cetuximab und Panitumumab im Fall von EGFR 521K mit den Liganden erfolgreicher um die EGFR-Bindestelle kompetitieren und somit eine effektivere Inhibition aus-

lösen. Dafür würde sprechen, dass in CHO-Zellen gezeigt werden konnte, dass TGFA mit einer geringeren Affinität den EGFR 521K bindet als den EGFR 521R [Moriai *et al.*, 1994]. Ebenso könnten Matuzumab und Nimotuzumab von der verringerten Affinität der Liganden profitieren und zu einer verstärkten Inhibition der EGFR-vermittelten Prozesse führen.

Tatsächlich existieren klinische Daten, in denen gezeigt wurde, dass sich die Expression der EGFR-Varianten unterschiedlich auf den Behandlungserfolg auswirkte. So profitierten mCRC-Patienten von der Therapie mit Cetuximab plus Irinotecan stärker, wenn die Patienten die EGFR-Variante 521K exprimierten [Goncalves *et al.*, 2008]. Die Effektivität von Panitumumab wurde für die EGFR 521K-Variante noch nicht untersucht. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten und der ähnlichen EGFR-Bindestellen von Cetuximab und Panitumumab ist aber anzunehmen, dass diese mAb ähnliche Effekte auslösen.

Allerdings konnte ein erhöhtes progressionsfreies Überleben signifikant mit der Expression des EGFR 521R in Patienten assoziiert werden, die refraktär für Chemotherapie waren und mit Cetuximab-Monotherapie behandelt wurden [Lurje *et al.*, 2008]. Hier wird deutlich, dass es noch andere Faktoren geben muss, die die klinische Antwort beeinflussen.

In einer der ersten Veröffentlichungen, die sich mit dem EGFR-Polymorphismus R521K beschäftigten, wurde beschrieben, dass EGFR 521K-Zellen eine geringere mitogene Aktivität aufweisen als EGFR 521R-Zellen. Bei EGFR 521K-Zellen führte Ligandenstimulation im Vergleich zu EGFR 521R-Zellen zu einer verringerten Aktivierung des EGFR und zu verminderter Proliferation. Des Weiteren wurden die Proto-Onkogene *Myc*, *Fos* und *Jun* in geringerem Maße in EGFR 521K-Zellen induziert, als es bei EGFR 521R-Zellen der Fall war [Moriai *et al.*, 1994].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass EGFR 521K-Zellen unter serumfreien Bedingungen langsamer wuchsen als EGFR 521R-Zellen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Moriai *et al.* wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass EGFR 521K-Zellen von Stimulierung mit EGFR-Liganden stärker profitieren. Sowohl die Aktivierung des EGFR als auch die Expression der *immediate early genes* (zu denen auch die Proto-Onkogene *Myc*, *Fos* und *Jun* gehören) waren in der vorliegenden Arbeit zwischen den Polymorphismen vergleichbar. Es wurden Ligandenkonzentrationen eingesetzt, die um ein Vielfaches höher waren als in der Arbeit von Moriai *et al.* (1994). Des Weiteren verwendete die Gruppe um Moriai ein anderes Zellmodell (CHO); in der vorliegenden Arbeit wurden NIH3T3-Zellen verwendet. Die verschiedenen Versuchsbedingungen könnten eine Erklärung für die unterschiedlichen Beobachtungen sein.

Prinzipiell können Unterschiede der EGFR-Varianten auf Genexpression und Proliferation durch eine Modulierung von Ligandenbindung und Signaltransduktion erklärt werden. Der Aminosäure-Austausch in der extrazellulären Domäne des EGFR führt dazu, dass die

EGFR 521K-Variante EGFR-Liganden mit geringerer Affinität bindet. Die durch den Aminosäure-Austausch bedingte Konformationsänderung des EGFR könnte sich auf die cytoplasmatische Domäne und somit auf die EGFR-Signaltransduktion auswirken [Moriai *et al.*, 1994].

Um abschließend zu klären, ob der EGFR-Polymorphismus R521K als Biomarker das Ansprechen auf mAb vorhersagen kann, müssten weitere Versuche in verschiedenen Tumorzellen durchgeführt und Beobachtungen aus der Behandlung von Patienten mit Cetuximab oder Panitumumab berücksichtigt werden.

5.3 Einfluss der Coexpression von EGFR und ErbB3 auf die Sensitivität von Tumorzellen gegen therapeutische anti-EGFR Antikörper

Es gibt viele Hinweise, die die Relevanz von ErbB3 im Tumorgeschehen verdeutlichen: Die Überexpression von ErbB3 führte in Mäusen zu Entwicklung von Lungenadenokarzinomen. In NSCLC-Patienten wurde die ErbB3-Expression mit schlechter Prognose assoziiert [Yi *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2002].

Unterschiede in der Signaltransduktion von CHO-EGFR und CHO-EGFR/ErbB3 Zellen nach deren Stimulierung mit den EGFR-Liganden konnten in der Phosphorylierungsintensität der untersuchten Signalproteine gesehen werden. Bei Doppeltransfektanten fiel die Phosphorylierung prinzipiell schwächer aus. Dies kann mit der geringeren EGFR-Expression bei CHO-EGFR/ErbB3 Zellen erklärt werden (Abb. 4- 24). Dass die Anwesenheit von ErbB3 inhibierend auf die Signaltransduktion wirkte, ist nicht wahrscheinlich, da durch EGFR/ErbB3- oder ErbB2/ErbB3-Heterodimere Signalwege aktiviert werden können [Ono und Kuwano, 2006].

Nach Behandlung von CHO-EGFR und CHO-EGFR/ErbB3 Zellen mit den Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG konnte sowohl EGFR- als auch ErbB3-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Da die eingesetzten Liganden den EGFR, nicht aber ErbB3 binden und aktivieren, ist es wahrscheinlich, dass die ErbB3-Phosphorylierung durch Heterodimerisierung von EGFR und ErbB3 und konsequente Transphosphorylierung ausgelöst wurde. Bestätigt wird dies dadurch, dass die ErbB3-Phosphorylierung durch anti-EGFR mAb inhibiert werden konnte. Die mAb binden spezifisch den EGFR und unterbinden dadurch dessen Auto- und Transphosphorylierung, welche zur Aktivierung von ErbB3 notwendig ist. Eine erstaunliche Beobachtung war, dass es unter Anwesenheit von Ligand und Matuzumab zu einer stärkeren EGFR-Phosphorylierung kam als unter der Anwesenheit von Ligand

alleine. Diese Beobachtung könnte durch die Lyse der Zellen bedingt sein. Unter bestimmten Lysebedingungen wird die Dimerisierung von ErbB-Rezeptoren nicht verhindert, und es könnte so zu einer Phosphorylierung kommen. Um das abschließend zu klären, müssten weitere Experimente unter verschiedenen Lysebedingungen durchgeführt werden.

Carrasco-Garcia *et al.* zeigten, dass EGFR-TKI, nicht aber Cetuximab die ErbB3-Phosphorylierung in Gliomzelllinien verhinderten [Carrasco-Garcia *et al.*, 2011]. Ebenso inhibierte Gefitinib die Phosphorylierung von ErbB3 in NSCLC-Zelllinien, während Cetuximab keinen Effekt zeigte [Yonesaka *et al.*, 2008]. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Cetuximab, Panitumumab und partiell auch Matuzumab und Nimotuzumab in der Lage waren, die Signaltransduktion von EGFR/ErbB3-Dimeren effektiv zu inhibieren.

Die unterschiedlichen Beobachtungen könnten in den Versuchsbedingungen zu finden sein: Während die in dieser Arbeit gezeigten Versuche in serumfreiem Medium durchgeführt wurden, arbeiteten die Gruppen von Carrasco-Garcia und Yonesaka in serumhaltigem Medium, in dem auch ErbB3-Liganden vorhanden sein könnten. Es wurde lange angenommen, dass die intrazelluläre TK-Domäne von ErbB3 inaktiv ist, allerdings konnten Shi *et al.* zeigen, dass die TK-Domäne von ErbB3 zur Autophosphorylierung fähig ist, wenn auch 1000x schwächer als die EGFR-Kinase [Shi *et al.*, 2010]. Die in dem serumhaltigen Medium vorhandenen ErbB3-Liganden könnten ErbB3 unabhängig vom EGFR aktivieren. Carrasco-Garcia *et al.* diskutierten, dass EGFR-TKI neben dem EGFR auch andere ErbB-Rezeptoren wie ErbB3 inhibieren und somit im Gegensatz zu dem mAb Cetuximab, der spezifisch den EGFR bindet, die ErbB3-Phosphorylierung verhindern könnten [Carrasco-Garcia *et al.*, 2011]. Dementsprechend würde in der vorliegenden Arbeit die EGFR- und somit auch die ErbB3-Phosphorylierung durch Cetuximab inhibiert werden, da die ErbB3-Phosphorylierung nicht durch ErbB3-Liganden, sondern durch die TK-Aktivität des EGFR induziert wurde. Weitere Untersuchungen zur Klärung, ob ErbB3 Einfluss auf das Ansprechen von Zellen auf therapeutische anti-EGFR mAb ausübt, sollten daher bei gleichzeitiger Anwesenheit von ErbB3-spezifischen Liganden durchgeführt werden.

Der Einfluss von ErbB3 auf das Ansprechen auf anti-EGFR Therapeutika wurde bisher hauptsächlich bei EGFR-TKI beschrieben. In NSCLC-Zellen führte erhöhte ErbB3-Expression zu Sensitivität gegen Gefitinib [Engelman *et al.*, 2005]. Ebenso konnte für Pankreas- und CRC-Zelllinien, die ErbB3 und EGFR coexprimierten und in denen AKT phosphoryliert vorlag, gezeigt werden, dass sie auf Erlotinib sensitiv reagierten. In EGFR/ErbB3-Heterodimeren wird ErbB3 durch EGFR transaktiviert und dadurch die Aktivierung von AKT induziert [Buck *et al.*, 2006]. Dagegen wurde in SCCHN-Zelllinien gezeigt, dass Gefitinib-Resistenz mit phospho-ErbB2 und erhöhter ErbB3-Expression korrelierte. Das

Ansprechen auf Cetuximab korrelierte jedoch nicht mit phospho-ErbB2 oder ErbB3-Expression [Erjala *et al.*, 2006]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass das Ansprechen von Zellen auf anti-EGFR mAb von ErbB3 nicht beeinflusst wird und dass anti-EGFR mAb die EGFR/ErbB3-Signaltransduktion inhibieren können.

Allerdings gibt es Hinweise, dass ErbB3 in Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt: Zellen, die durch Langzeitbehandlung mit Cetuximab Resistenz gegen diesen mAb entwickelt hatten, wiesen eine starke Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie ErbB2 und ErbB3 auf [Wheeler *et al.*, 2008]. Untersuchungen von Fujimoto *et al.* in NSCLC-Zellen zeigten, dass Tumorzellen, in denen Abhängigkeit vom EGFR-Signalweg besteht, den EGFR konstitutiv durch die Überexpression von anderen ErbB-Rezeptoren und deren Liganden aktivieren [Fujimoto *et al.*, 2005]. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass ErbB3 das Ansprechen von Tumorzellen auf anti-EGFR mAb beeinflussen könnte. Daher bedarf es weiterer Untersuchungen, um zu verstehen, ob und inwiefern sich die Coexpression von EGFR und ErbB3 auf das Ansprechen von Tumorzellen auf anti-EGFR mAb auswirkt.

5.4 Einfluss verschiedener KRAS-Mutationen auf das Ansprechen von Tumorzellen auf EGFR-Liganden und anti-tumorale Therapeutika

Erste retrospektive Studien mit geringen Patientenzahlen zeigten, dass CRC-Patienten mit aktivierenden KRAS-Mutationen nicht von der Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab profitierten. Seither haben sich KRAS-Mutationen, die in 35 - 45% der CRC-Tumore vorhanden sind, als wichtige prädiktive Biomarker bezüglich Resistenz auf Cetuximab oder Panitumumab etabliert [Bardelli und Sienna, 2010].

Die Mehrheit der KRAS-Mutationen kommt in Codon 12 und 13 des Exons 2 vor. 85% der KRAS-Mutationen in CRC erfolgen in diesem Exon, in NSCLC sind es mehr als 97%. Mutationen, die nicht in Exon 2 stattfinden, wurden mit besserer Prognose bei Patienten mit mCRC assoziiert als Mutationen, die in Exon 2 vorkommen [Vakiani und Solit, 2011].

Es existieren nur wenige klinische Studien, in denen die Rolle verschiedener KRAS-Mutationen auf Krankheitsverlauf und Tumorcharakteristika beschrieben wird. In der RASCAL-Studie wurden Daten von CRC-Patienten verschiedener, weltweiter Studien ausgewertet. Alle KRAS-Mutationen in Codon 12 und 13, bei denen ein Austausch von Guanin (G) zu Thymin (T) (resultiert in einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Cystein oder Valin) - nicht aber von G zu Adenin (A) oder Cytosin (C) (resultiert in einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Serin, Aspartat, Arginin oder Alanin) - stattfand, wurden mit einem erhöhten

Risiko an Sterblichkeit oder dem Wiederauftreten des Tumors assoziiert. Dabei korrelierte vor allem das Auftreten von KRAS (G12V) im Vergleich zu KRAS Wildtyp mit erhöhter Sterblichkeit bzw. verringertem Gesamtüberleben [Andreyev *et al.*, 1998; Winder *et al.*, 2009].

In *in vitro* Studien, die Unterschiede zwischen KRAS (G12V) und KRAS (G12D) untersuchten, konnte das aggressivere Potenzial der KRAS (G12V) Mutation bestätigt werden. Rattenfibroblasten, die stabil mit KRAS (G12V), KRAS (G12D) oder KRAS Wildtyp transfiziert worden waren, wurden bezüglich Invasivität, Transformation und VEGF-Produktion untersucht. Während sich die Mutanten in VEGF-Expression und transformierendem Potential nicht unterschieden, zeigten KRAS (G12V)-Zellen eine stärkere Invasion im Matri-gel als KRAS (G12D)-Zellen [Al-Mulla und MacKenzie, 2001]. Die Ergebnisse der vorliegen-den Arbeit bekräftigen, dass die KRAS (G12V)-Mutation besonders aggressiv wirkt: Die Be-handlung der isogenen SW48-Zellen mit Oxaliplatin zeigte einzig bei KRAS (G12V)-Zellen einen geringeren inhibierenden Effekt auf die Proliferation als bei Zellen, die KRAS Wildtyp oder eine der anderen KRAS-Mutationen exprimierten.

Dagegen zeigte die Behandlung der Zellen mit Cetuximab, dass sich verschiedene KRAS-Mutationen auf die Cetuximab-Wirksamkeit unterschiedlich auswirkten. De Roock *et al.* testeten isogene SW48-Zellen, die entweder KRAS Wildtyp, KRAS (G12V) oder KRAS (G13D) exprimierten. Während Zellen, die KRAS (G12V) exprimierten, nicht auf Cetuximab-Behandlung ansprachen, konnte bei KRAS (G13D) mutierten Zellen ebenso wie bei KRAS Wildtyp-Zellen ein Ansprechen auf Cetuximab gesehen werden. Ebenso wurde beobachtet, dass Patienten mit KRAS (G13D) mutierten Tumoren ein längeres progressionsfreies Überleben sowie ein längeres Gesamtüberleben unter Cetuximab-Behandlung hatten als Patienten, deren Tumore andere KRAS-Mutationen trugen [De Roock *et al.*, 2010]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Zellen, die KRAS Wildtyp exprimieren, am sensitivsten auf Behandlung mit Cetuximab reagierten, was mit den klinischen Beobachtungen übereinstimmt. Außerdem ließ sich in der vorliegenden Arbeit der Trend erkennen, dass KRAS (G13D) mutierte Zellen sensitiver auf Cetuximab reagierten als Zellen, die andere KRAS-Mutationen trugen. Dagegen sprachen Zellen, die KRAS (G12V) exprimierten, schlechter auf Cetuximab-Behandlung an (siehe 4.3.3). Das unterschiedliche Verhalten der Zellen, die verschiedene KRAS-Mutationen trugen, könnte Resultat der veränderten Signaltransduktion in diesen Zellen sein (Abb. 4- 28 und Abb. 4- 29). Die unterschiedliche Signaltransduktion könnte mit der durch die Mutation veränderte GTPase-Aktivität in Verbindung stehen. Al-Mulla *et al.* konnten zeigen, dass die GTPase-Aktivität von KRAS (G12V) geringer ist als die von KRAS (G12D) oder KRAS Wildtyp und die Bindung von GTP bei KRAS (G12V) mit geringerer Affinität als bei KRAS (G12D) oder KRAS Wildtyp geschieht. GTP bindet also stärker an KRAS (G12V) und kann dadurch ein stärkeres Signal

generieren [Al-Mulla *et al.*, 1999], was wiederum das aggressivere Potenzial der KRAS (G12V)-Mutation unterstreicht. Da sich die Mutationen unterschiedlich auf die GTPase-Aktivität und Affinität gegenüber GTP auswirken, sollten auch Unterschiede in der Signaltransduktion und folglich auch im Wachstum von Zellen mit unterschiedlichen KRAS-Mutationen gesehen werden (Abb. 4- 28 - Abb. 4- 30). Weshalb sich die Mutationen vor allem auf das Ansprechen auf AREG und EREG auswirken, muss in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sich unterschiedliche KRAS-Mutationen verschieden auf anti-tumorale Therapeutika und die EGFR-Signaltransduktion auswirken, was von verschiedenen klinischen und präklinischen Studien unterstützt wird (siehe oben).

6. Zusammenfassung

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die sowohl in Wachstum und Differenzierung von Zellen als auch in der Tumorprogression eine Rolle spielt [Yarden, 2001]. Derzeit sind sieben EGFR-Liganden bekannt, darunter der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierende Wachstumsfaktor alpha (TGFA), Amphiregulin (AREG) und Epiregulin (EREG), die mit unterschiedlicher Affinität den EGFR binden und aktivieren [Jones *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2009]. Die Ligandenbindung und somit die Aktivierung des EGFR kann durch anti-EGFR monoklonale Antikörper (mAb) blockiert werden. Dabei ist das Ansprechen auf mAb nicht nur von der Expression des EGFR abhängig, sondern auch von Mutations- und Expressionsstatus weiterer Biomarker, die in der EGFR-Signaltransduktion eine Rolle spielen [Sartore-Bianchi *et al.*, 2010; Siena *et al.*, 2009]. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss folgender potentieller Biomarker auf die Sensitivität von Zellen gegen die therapeutischen anti-EGFR mAb Cetuximab, Matuzumab, Panitumumab und Nimotuzumab *in vitro* untersucht: (1) der EGFR-Polymorphismus R521K, (2) die EGFR-Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG, (3) ErbB3 und (4) KRAS.

Zur Untersuchung des EGFR-Polymorphismus R521K wurden stabil transfizierte Modellzelllinien generiert, die entweder humanen EGFR 521K oder humanen EGFR 521R exprimierten. In Proliferationsassays konnte beobachtet werden, dass EGFR 521K-Zellen im Vergleich zu EGFR 521R-Zellen zwar langsamer wuchsen, dafür aber besser auf Ligandenstimulation ansprachen. Gleichzeitig wurde die Proliferation und EGFR-Signaltransduktion der EGFR 521K-Zellen durch therapeutische anti-EGFR mAb effektiver inhibiert. Microarray-Analysen zeigten, dass vor allem regulatorische Zellzyklusgene bei EGFR 521K-Zellen stärker exprimiert wurden.

In den Modellzelllinien (siehe oben) wurde der Effekt der EGFR-Liganden auf Proliferation, Genexpression und EGFR-Signaltransduktion sowie auf die Sensitivität der Zellen gegen die therapeutischen mAb untersucht. Gene, die durch die EGFR-Liganden differentiell reguliert wurden, wiesen tendenziell korrelierte Expressionsprofile auf, es zeigten sich aber Unterschiede in der Stärke der Regulation durch die Liganden. Die hochaffinen Liganden EGF/TGFA einerseits und die geringaffinen Liganden AREG/EREG andererseits hatten ähnliche Effekte auf Proliferation und Signaltransduktion. So vermittelten AREG und EREG geringeres adhäsionsunabhängiges Wachstum und eine geringere EGFR-Phosphorylierung als EGF und TGFA.

Ebenso wurde das Ansprechen der Zellen auf die therapeutischen Antikörper stark von dem Vorhandensein bestimmter Liganden beeinflusst. Unter dem Einfluss von AREG und EREG hemmten die mAb effektiver Proliferation und Signaltransduktion als unter dem Einfluss von

EGF und TGFA. Prinzipiell inhibierten Cetuximab und Panitumumab Proliferation und Signaltransduktion stärker als Matuzumab, und Nimotuzumab hatte den geringsten inhibitorischen Effekt.

Zudem wurde in dieser Arbeit der Einfluss von ErbB3 untersucht, indem Modellzelllinien, die EGFR oder EGFR und ErbB3 exprimierten, mit EGFR-Liganden und anti-EGFR mAb behandelt wurden. Dabei konnten keine Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen EGFR- und EGFR/ErbB3-exprimierenden Zellen festgestellt werden, was darauf hinweist, dass die durch EGFR/ErbB3-Dimere induzierte Signaltransduktion durch anti-EGFR Antikörper inhibiert werden kann.

Schließlich wurde auch der Einfluss verschiedener KRAS-Mutationen auf das Ansprechen von Zellen auf anti-tumorale Therapie sowie EGFR-Liganden untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich Zellen, die verschiedene KRAS-Mutationen trugen, in der Basalaktivierung von Signalproteinen ebenso wie in der Liganden-induzierten EGFR-Signaltransduktion unterschieden. Des Weiteren sprachen Zellen, die verschiedene KRAS-Mutationen exprimierten, unterschiedlich auf Cetuximab an, wobei KRAS Wildtyp-Zellen die Cetuximab-sensitivsten Zellen darstellten. Dagegen beeinflussten die KRAS-Mutationen das Ansprechen der Zellen auf das Chemotherapeutikum Oxaliplatin kaum; mit Ausnahme der KRAS (G12V)-Mutante reagierten alle Zellen ähnlich sensitiv auf Oxaliplatin-Behandlung.

Die hier vorgestellten Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis des komplexen EGFR-Netzwerks bei und bieten außerdem eine interessante Grundlage für weitere Biomarker-Studien.

Literaturverzeichnis

- Al-Mulla F, MacKenzie EM (2001). Differences in *in vitro* invasive capacity induced by differences in Ki-Ras protein mutations. *J Pathol.* 195(5):549-56.
- Al-Mulla F, Milner-White EJ, Going JJ, Birnie GD (1999). Structural differences between valine-12 and aspartate-12 Ras proteins may modify carcinoma aggression. *J Pathol.* 187(4):433-8.
- Alvarado D, Klein DE, Lemmon MA (2010). Structural basis for negative cooperativity in growth factor binding to an EGF receptor. *Cell.* 142(4):568-79.
- Alvarenga ML. (2010). Innovative analytical tools in the biopharmaceutical development. Applying SPR/Biacore, calorimetry and light scattering methods to the study of interactions between anticancer antibodies and the EGFR. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 26(10):1626-34.
- Amann J, Kalyankrishna S, Massion PP, Ohm JE, Girard L, Shigematsu H, Peyton M, Juroske D, Huang Y, Stuart Salmon J, Kim YH, Pollack JR, Yanagisawa K, Gazdar A, Minna JD, Kurie JM, Carbone DP (2005). Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Res.* 65(1):226-35.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA (1998). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 90(9):675-84.
- Anklesaria P, Teixidó J, Laiho M, Pierce JH, Greenberger JS, Massagué J (1990). Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(9):3289-93.
- Arteaga CL (2002). Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol.* 29(5 Suppl 14):3-9.
- Avraham R, Yarden Y (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(2):104-17.
- Axelsen JB, Lotem J, Sachs L, Domany E (2007). Genes overexpressed in different human solid cancers exhibit different tissue-specific expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(32):13122-7.
- Baker JB, Dutta D, Watson D, Maddala T, Munneke BM, Shak S, Rowinsky EK, Xu LA, Harbison CT, Clark EA, Mauro DJ, Khambata-Ford S (2011). Tumour gene expression predicts response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 104(3):488-95.
- Bardelli A, Siena S (2010). Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 28(7):1254-61.

- Baselga J (2002). Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist*. 7 Suppl 4:2-8.
- Baselga J, Swain SM (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*. 9(7):463-75.
- Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A (2007). Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*. 67(6):2643-8.
- Bergmann K (2007). Untersuchung der Immuneffektorfunktionen bei einem antitumoral wirksamen Antikörper gegen EGFR *in vitro* und *in vivo*. Diplomarbeit Oncotest GmbH, Institut für experimentelle Onkologie, Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
- Bier H, Hoffmann T, Haas I, van Lierop A (1998). Anti-(epidermal growth factor) receptor monoclonal antibodies for the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother*. 46(3):167-73.
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P (2009). Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 27(5):663-71.
- Buck E, Eyzaguirre A, Haley JD, Gibson NW, Cagnoni P, Iwata KK (2006). Inactivation of Akt by the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib is mediated by HER-3 in pancreatic and colorectal tumor cell lines and contributes to erlotinib sensitivity. *Mol Cancer Ther*. 5(8):2051-9.
- Burgess AW (2008). EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors* 26(5):263-74.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 12(3):541-52.
- Bermudez O, Pagès G, Gimond C (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*. 299(2):C189-202.
- Capdevila J, Elez E, Macarulla T, Ramos FJ, Ruiz-Echarri M, Tabernero J (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 35(4):354-63.
- Carrasco-García E, Saceda M, Grasso S, Rocamora-Reverte L, Conde M, Gómez-Martínez A, García-Morales P, Ferragut JA, Martínez-Lacaci I (2011). Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res*. 317(10):1476-89.
- Carter P (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 1(2):118-29.
- Chattopadhyay A, Vecchi M, Ji Q, Mernaugh R, Carpenter G (1999). The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem*. 274(37):26091-7.

- Chung KY, Saltz LB (2005). Antibody-based therapies for colorectal cancer. *Oncologist*. 10(9):701-9.
- Ciardello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, De Placido S, Bianco AR, Tortora G (2001). Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*. 7(5):1459-65.
- Citri A, Skaria KB, Yarden Y. (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*. 284(1):54-65.
- Citri A, Yarden Y (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(7):505-16. Review.
- Crombet-Ramos T, Rak J, Pérez R, Vilorio-Petit A (2002). Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: A humanized anti-EGFR antibody. *Int J Cancer*. 101(6):567-75.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 351(4):337-45.
- De Bono JS, Rowinsky EK (2002). Therapeutics targeting signal transduction for patients with colorectal carcinoma. *Br Med Bull*. 64:227-54.
- De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalcborg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S (2010). Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304(16):1812-20.
- Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboué R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T (2007). Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*. 96(8):1166-9.
- Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, Hazan R, Ullrich A, King CR, Schlessinger J, Aaronson SA (1987). Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*. 51(6):1063-70.
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, Chen DJ, Kehlbach R, Rodemann HP (2005a). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280(35):31182-9. Epub 2005 Jul 5.
- Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP (2005b). Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol*. 76(2):157-61.
- Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP (2010). Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function. *Strahlenther Onkol*. 186(1):1-6.
- Engelman JA, Jänne PA, Mermel C, Pearlberg J, Mukohara T, Fleet C, Cichowski K, Johnson BE, Cantley LC (2005). ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(10):3788-93.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 316(5827):1039-43.

Erjala K, Sundvall M, Junttila TT, Zhang N, Savisalo M, Mali P, Kulmala J, Pulkkinen J, Grenman R, Elenius K (2006). Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 12(13):4103-11.

European Medicines Agency (1):

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001016/human_med_000857.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

European Medicines Agency (2):

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000618/human_med_001077.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

European Medicines Agency (3):

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000558/human_med_000769.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

European Medicines Agency (4):

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000741/human_med_001128.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

European Medicines Agency (5):

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/landing/orphan_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d12b&source=homeMedSearch&keyword=nimotuzumab&isNewQuery=true&jsenabled=true

Feng FY, Lopez CA, Normolle DP, Varambally S, Li X, Chun PY, Davis MA, Lawrence TS, Nyati MK (2007). Effect of epidermal growth factor receptor inhibitor class in the treatment of head and neck cancer with concurrent radiochemotherapy in vivo. *Clin Cancer Res*. 13(8):2512-8.

Foon KA, Yang XD, Weiner LM, Belldegrun AS, Figlin RA, Crawford J, Rowinsky EK, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Gollub J, Thompson JA, Schwartz G, Bukowski RM, Roskos LK, Schwab GM (2004). Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 58(3):984-90.

Friedländer E, Barok M, SzölloSI J, Vereb G (2008). ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol Lett*. 116(2):126-40.

Fujimoto N, Wislez M, Zhang J, Iwanaga K, Dackor J, Hanna AE, Kalyankrishna S, Cody DD, Price RE, Sato M, Shay JW, Minna JD, Peyton M, Tang X, Massarelli E, Herbst R, Threadgill DW, Wistuba II, Kurie JM (2005). High expression of ErbB family members and their ligands in lung adenocarcinomas that are sensitive to inhibition of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*. 65(24):11478-85.

Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato JD, Masui H, McLeod C, Mendelsohn J (1984). Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem*. 259(12):7755-60.

- Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res.* 1(11):1311-8.
- Gonçalves A, Esteyries S, Taylor-Smedra B, Lagarde A, Ayadi M, Monges G, Bertucci F, Esterni B, Delpero JR, Turrini O, Lelong B, Viens P, Borg JP, Birnbaum D, Olschwang S, Viret F (2008). A polymorphism of EGFR extracellular domain is associated with progression free-survival in metastatic colorectal cancer patients receiving cetuximab-based treatment. *BMC Cancer.* 8:169.
- Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16(7):1647-55.
- Groner B, Hartmann C, Wels W (2004). Therapeutic antibodies. *Curr Mol Med.* 4(5):539-47.
- Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL 3rd. (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(17):8132-6.
- Hamburger AW (2008). The role of ErbB3 and its binding partners in breast cancer progression and resistance to hormone and tyrosine kinase directed therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 13(2):225-33.
- Hanada N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC (2006). Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog.* 45(1):10-7.
- Harari PM, Allen GW, Bonner JA (2007). Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol.* 25(26):4057-65.
- Harris RC, Chung E, Coffey RJ. (2003). EGF receptor ligands. *Exp Cell Res.* 10;284(1):2-13.
- Helin K, Beguinot L (1991). Internalization and down-regulation of the human epidermal growth factor receptor are regulated by the carboxyl-terminal tyrosines. *J Biol Chem.* 266(13):8363-8.
- Herbst RS, Shin DM (2002). Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer.* 94(5):1593-611.
- Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N (2008). Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci.* 99(2):214-20.
- Higashiyama S, Iwamoto R, Goishi K, Raab G, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E (1995). The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J Cell Biol.* 128(5):929-38.
- Higginbotham JN, Demory Beckler M, Gephart JD, Franklin JL, Bogatcheva G, Kremers GJ, Piston DW, Ayers GD, McConnell RE, Tyska MJ, Coffey RJ (2011). Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr Biol.* 21(9):779-86.
- Hill CS, Treisman R (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* 80(2):199-211.

Hopper-Borge EA, Nasto RE, Ratushny V, Weiner LM, Golemis EA, Astsaturov I (2009). Mechanisms of tumor resistance to EGFR-targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets*. 13(3):339-62.

Huang SM, Li J, Harari PM (2002). Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol Cancer Ther*. 1(7):507-14.

Huang ZQ, Buchsbaum DJ, Raisch KP, Bonner JA, Bland KI, Vickers SM (2003). Differential responses by pancreatic carcinoma cell lines to prolonged exposure to Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody. *J Surg Res*. 111(2):274-83.

Huether A, Höpfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H (2005). EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem Pharmacol*. 70(11):1568-78.

Hung LY, Tseng JT, Lee YC, Xia W, Wang YN, Wu ML, Chuang YH, Lai CH, Chang WC (2008). Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res*. 36(13):4337-51. Epub 2008 Jun 27.

Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A (2001). The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer*. 8(3):151-9. Review.

Hynes NE, Lane HA (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 5(5):341-54.

Inui S, Higashiyama S, Hashimoto K, Higashiyama M, Yoshikawa K, Taniguchi N (1997). Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *J Cell Physiol*. 171(3):291-8.

Irmer D, Funk JO, Blaukat A (2007). EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene*. 26(39):5693-701.

Irmer D (2008). Molecular analyses of resistance and sensitivity mechanisms to anti-EGFR directed tumor therapy Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, Fieuws S, Vandesompele J, Peeters M, Van Laethem JL, Humblet Y, Pénault-Llorca F, De Hertogh G, Laurent-Puig P, Van Cutsem E, Tejpar S (2009). Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 27(30):5068-74. Epub 2009 Sep 8.

Janmaat ML, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G (2003). Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res*. 9(6):2316-26.

Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX (1999). Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett*. 447(2-3):227-31.

- Karnes WE Jr, Walsh JH, Wu SV, Kim RS, Martin MG, Wong HC, Mendelsohn J, Park JG, Cuttitta F (1992). Autonomous proliferation of colon cancer cells that coexpress transforming growth factor alpha and its receptor. Variable effects of receptor-blocking antibody. *Gastroenterology*. 102(2):474-85.
- Kataoka H (2009). EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci*. 56(3):148-53.
- Kettleborough CA, Saldanha J, Heath VJ, Morrison CJ, Bendig MM. (1991). Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. *Protein Eng*. 4(7):773-83.
- Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ (2007). Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 25(22):3230-7.
- Khambata-Ford S, Harbison CT, Hart LL, Awad M, Xu LA, Horak CE, Dakhil S, Hermann RC, Lynch TJ, Weber MR (2010). Analysis of potential predictive markers of cetuximab benefit in BMS099, a phase III study of cetuximab and first-line taxane/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 28(6):918-27.
- Kleespies A, Ischenko I, Eichhorn ME, Seeliger H, Amendt C, Mantell O, Jauch KW, Bruns CJ (2008). Matuzumab short-term therapy in experimental pancreatic cancer: prolonged antitumor activity in combination with gemcitabine. *Clin Cancer Res*. 14(17):5426-36.
- Klinghammer K, Knödler M, Schmittel A, Budach V, Keilholz U, Tinhofer I (2010). Association of epidermal growth factor receptor polymorphism, skin toxicity, and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res*. 16(1):304-10.
- Krall JA, Beyer EM, MacBeath G (2011). High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways. *PLoS One*. 6(1):e15945.
- Kranenburg O (2005). The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta*. 1756(2):81-2.
- Kruser TJ, Wheeler DL (2010). Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res*. 316(7):1083-100.
- Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T, Touge H, Makino H, Takata M, Miyata M, Nakamoto M, Burioka N, Shimizu E (2007). Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 13(5):1552-61.
- Laskin JJ, Sandler AB (2004). Epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer therapy. *Semin Respir Crit Care Med*. 25 Suppl 1:17-27.
- Lemmon MA (2009). Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res*. 15;315(4):638-48. Review.
- Lemmon MA, Schlessinger J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141(7):1117-34. Review.

- Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell.* 4(6):1029-40.
- Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell.* 7(4):301-11.
- Liebmann C (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal.* 13(11):777-85.
- Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66(8):3992-5.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 3(9):802-8.
- Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell.* 7(6):575-89.
- Lonberg N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol.* 23(9):1117-25.
- Luetke NC, Qiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, Lee DC (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development.* 126(12):2739-50.
- Lurje G, Lenz HJ. (2009). EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 77(6):400-10. Review.
- Lurje G, Nagashima F, Zhang W, Yang D, Chang HM, Gordon MA, El-Khoueiry A, Husain H, Wilson PM, Ladner RD, Mauro DJ, Langer C, Rowinsky EK, Lenz HJ (2008). Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin Cancer Res.* 14(23):7884-95.
- Ma F, Sun T, Shi Y, Yu D, Tan W, Yang M, Wu C, Chu D, Sun Y, Xu B, Lin D (2009). Polymorphisms of EGFR predict clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with Gefitinib. *Lung Cancer.* 66(1):114-9.
- Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR (1993). Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 73(2):249-61
- Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol.* 158(1):1-9.
- Mattoon DR, Lamothe B, Lax I, Schlessinger J (2004). The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol.* 2:24.
- Mellstedt H (2003). Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc).* 39 Suppl C:1-16.

- Mendelsohn J, Baselga J (2006). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol.* 33(4):369-85.
- Moehler M, Frings C, Mueller A, Gockel I, Schimanski CC, Biesterfeld S, Galle PR, Holtmann MH (2008). VEGF-D expression correlates with colorectal cancer aggressiveness and is downregulated by cetuximab. *World J Gastroenterol.* 14(26):4156-67.
- Morandell S, Stasyk T, Skvortsov S, Ascher S, Huber LA (2008). Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics.* 8(21):4383-401.
- Moriai T, Kobrin MS, Hope C, Speck L, Korc M (1994). A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(21):10217-21.
- Moriai T, Kobrin MS, Korc M (1993). Cloning of a variant epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 191(3):1034-9.
- Murthy U, Basu A, Rodeck U, Herlyn M, Ross AH, Das M. (1987). Binding of an antagonistic monoclonal antibody to an intact and fragmented EGF-receptor polypeptide. *Arch Biochem Biophys.* 252(2):549-60.
- Mutsaers AJ, Francia G, Man S, Lee CR, Ebos JM, Wu Y, Witte L, Berry S, Moore M, Kerbel RS (2009). Dose-dependent increases in circulating TGF-alpha and other EGFR ligands act as pharmacodynamic markers for optimal biological dosing of cetuximab and are tumor independent. *Clin Cancer Res.* 15(7):2397-405
- Naramura M, Gillies SD, Mendelsohn J, Reisfeld RA, Mueller BM (1993). Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model for human melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 37(5):343-9.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 366(1):2-16. Review.
- O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, Barrios C, Eschbach C, Martens UM, Hotko Y, Kortsik C, Paz-Ares L, Pereira JR, von Pawel J, Ramlau R, Roh JK, Yu CT, Stroh C, Celik I, Schueler A, Pirker R (2011). Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol.* 12(8):795-805.
- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell.* 110(6):775-87.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19(13):3159-67.
- Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PM, Storm G, Schiffelers RM (2006). Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 6(6):605-17.
- Ono M, Kuwano M (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res.* 12(24):7242-51.

- Patterson RL, van Rossum DB, Nikolaidis N, Gill DL, Snyder SH (2005). Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci.* 30(12):688-97.
- Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS (2001). The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol.* 12(6):745-60.
- Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP (1999). Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res.* 5(2):257-65.
- Press OA, Zhang W, Gordon MA, Yang D, Lurje G, Iqbal S, El-Khoueiry A, Lenz HJ (2008). Gender-related survival differences associated with EGFR polymorphisms in metastatic colon cancer. *Cancer Res.* 68(8):3037-42.
- Quatrala AE, Petriella D, Porcelli L, Tommasi S, Silvestris N, Colucci G, Angelo A, Azzariti A (2011). Anti-EGFR monoclonal antibody in cancer treatment: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Front Biosci.* 16:1973-85.
- Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W, Barón AE, Zeng C, Johnson TK, Bunn PA Jr (2005). The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 11(2 Pt 1):795-805.
- Ramakrishnan MS, Eswaraiah A, Crombet T, Piedra P, Saurez G, Iyer H, Arvind AS (2009). Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origin. *MAbs.* 1(1):41-8.
- Roberts PJ, Der CJ (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 26(22):3291-310.
- Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SL, Lerdrup M, Grøvdal L, Willumsen BM, van Deurs B (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic.* 10(8):1115-27.
- Roepstorff K, Grøvdal L, Grandal M, Lerdrup M, van Deurs B (2008). Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol.* 129(5):563-78.
- Saif MW (2010). Colorectal cancer in review: the role of the EGFR pathway. *Expert Opin Investig Drugs.* 19(3):357-69
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 19(3):183-232.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* 24:104-8.
- Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, Sfakianaki M, Pega F, Kalikaki A, Tsakalaki E, Trypaki M, Messaritakis I, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J (2011). Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in ≥ 2 line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. *PLoS One.* 6(1):e15980.

- Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Di Nicolantonio F, Pozzi F, Funaioli C, Gambi V, Arena S, Martini M, Lamba S, Cassingena A, Schiavo R, Bardelli A, Siena S (2010). Integrated molecular dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR) oncogenic pathway to predict response to EGFR-targeted monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer. *Target Oncol.*5(1):19-28.
- Sasaki H, Okuda K, Shimizu S, Takada M, Kawahara M, Kitahara N, Okumura M, Matsumura A, Iuchi K, Kawaguchi T, Kubo A, Kawano O, Yukiue H, Yano M, Fujii Y (2009). EGFR R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for advanced lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135(2):313-8.
- Schmiedel J, Blaukat A, Li S, Knöchel T, Ferguson KM. (2008). Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell.* 13(4):365-73.
- Schmitz KR, Ferguson KM. (2009). Interaction of antibodies with ErbB receptor extracellular regions. *Exp Cell Res.* 315(4):659-70.
- Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, Moasser MM (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature.* 445(7126):437-41.
- Shao H, Cheng HY, Cook RG, Tweardy DJ (2003). Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 63(14):3923-30.
- Shelton JG, Steelman LS, Abrams SL, Bertrand FE, Franklin RA, McMahon M, McCubrey JA (2005). The epidermal growth factor receptor gene family as a target for therapeutic intervention in numerous cancers: what's genetics got to do with it? *Expert Opin Ther Targets.* 9(5):1009-30.
- Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA (2010). ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(17):7692-7.
- Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ (1989). Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science.* 243(4894 Pt 1):1074-6.
- Siavash H, Nikitakis NG, Sauk JJ (2004). Signal transducers and activators of transcription: insights into the molecular basis of oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15(5):298-307.
- Siegel-Lakhai WS, Beijnen JH, Schellens JH (2005). Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa). *Oncologist.* 10(8):579-89.
- Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A (2009). Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 101(19):1308-24.
- Singh AB, Harris RC (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal.* 17(10):1183-93.
- Stover DR, Becker M, Liebetanz J, Lydon NB (1995). Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. *J Biol Chem.* 270(26):15591-7.

- Stroh C, Reusch C, Schmidt J, Splittgerber J, Blaukat A (2010). Pharmacological and immunological characterization of the therapeutic anti-EGFR antibodies cetuximab, panitumumab and matuzumab: The combination of cetuximab and matuzumab results in enhanced effector functions. In: Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2010 Apr 17-21; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR. Abstract nr LB-316
- Takahashi K, Saga Y, Mizukami H, Takei Y, Machida S, Fujiwara H, Ozawa K, Suzuki M (2009). Cetuximab inhibits growth, peritoneal dissemination, and lymph node and lung metastasis of endometrial cancer, and prolongs host survival. *Int J Oncol.* 35(4):725-9.
- Talavera A, Friemann R, Gómez-Puerta S, Martínez-Fleites C, Garrido G, Rabasa A, López-Requena A, Pupo A, Johansen RF, Sánchez O, Krengel U, Moreno E. (2009). Nimotuzumab, an antitumor antibody that targets the epidermal growth factor receptor, blocks ligand binding while permitting the active receptor conformation. *Cancer Res.* 69(14):5851-9.
- Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takayama Y, Isobe T, Okuyama T, Hanada K (1995). Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem.* 270(13):7495-500.
- Troyer KL, Luetke NC, Saxon ML, Qiu TH, Xian CJ, Lee DC (2001). Growth retardation, duodenal lesions, and aberrant ileum architecture in triple null mice lacking EGF, amphiregulin, and TGF- α . *Gastroenterology.* 121(1):68-78.
- Tullai JW, Schaffer ME, Mullenbrock S, Sholder G, Kasif S, Cooper GM (2007). Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *J Biol Chem.* 282(33):23981-95.
- Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y. (1997). Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J* 16(16):4938-50.
- Vakiani E, Solit DB (2011). KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol.* 223(2):219-29.
- Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 360(14):1408-17.
- Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Zhang K, Pastan I, Lowy DR (1989). Retroviruses expressing different levels of the normal epidermal growth factor receptor: biological properties and new bioassay. *J Cell Biochem.* 39(2):153-66.
- Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G (2008). The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol.* 68(2):93-106. Epub 2008 Aug 3.
- Vivanco I, Sawyers CL (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2(7):489-501.
- Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, Xia W, Chen CT, Yang CC, McIntush EW, Li LY, Hawke DH, Kobayashi R, Hung MC (2006). Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol.* 8(12):1359-68. Epub 2006 Nov 19.

- Wang WS, Chen PM, Chiou TJ, Liu JH, Lin JK, Lin TC, Wang HS, Su Y (2007). Epidermal growth factor receptor R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for patients with colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 13(12):3597-604.
- Wang YN, Yamaguchi H, Hsu JM, Hung MC (2010). Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene.* 29(28):3997-4006.
- Waterman H, Katz M, Rubin C, Shtiegman K, Lavi S, Elson A, Jovin T, Yarden Y (2002). A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *EMBO J.* 21(3):303-13.
- Weinstein IB, Joe A (2008). Oncogene addiction. *Cancer Res.* 68(9):3077-80.
- Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, Gondi V, Hsu KT, Harari PM (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene.* 27(28):3944-56.
- Willmarth NE, Ethier SP (2006). Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 281(49):37728-37.
- Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, Riese DJ 2nd. (2009). Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther.* 122(1):1-8.
- Winder T, Mündlein A, Rhomberg S, Dirschmid K, Hartmann BL, Knauer M, Drexel H, Wenzl E, De Vries A, Lang A (2009). Different types of K-Ras mutations are conversely associated with overall survival in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep.* 21(5):1283-7.
- www.clinicaltrials.gov.
- Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG (2001). Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 38(1):17-23. Review.
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):127-37.
- Yarden Y. (2001): The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S3-8. Review.
- Yi ES, Harclerode D, Gondo M, Stephenson M, Brown RW, Younes M, Cagle PT (1997). High c-erbB-3 protein expression is associated with shorter survival in advanced non-small cell lung carcinomas. *Mod Pathol.* 10(2):142-8.
- Yonesaka K, Zejnullahu K, Lindeman N, Homes AJ, Jackman DM, Zhao F, Rogers AM, Johnson BE, Jänne PA (2008). Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin Cancer Res.* 14(21):6963-73.
- Yoshida T, Okamoto I, Iwasa T, Fukuoka M, Nakagawa K (2008). The anti-EGFR monoclonal antibody blocks cisplatin-induced activation of EGFR signaling mediated by HB-EGF. *FEBS Lett.* 582(30):4125-30.
- Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 125(6):1137-49.

Zhou H, Liu L, Lee K, Qin X, Grasso AW, Kung HJ, Willis JE, Kern J, Wagner T, Gerson SL (2002). Lung tumorigenesis associated with erb-B-2 and erb-B-3 overexpression in human erb-B-3 transgenic mice is enhanced by methylnitrosourea. *Oncogene*. 21(57):8732-40.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff danke ich für die Möglichkeit, eine externe Promotion anzufertigen, für die stets unkomplizierte und hilfreiche Betreuung und die Bewertung der vorliegenden Arbeit als Erstgutachter. Bei Herrn Prof. Dr. Michael Schwarz möchte ich mich für die Bereitschaft, meine Arbeit als Zweitgutachter zu beurteilen, bedanken. Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko und Herrn Prof. Dr. Michael Bitzer danke ich für das Interesse an meiner Arbeit.

Ich danke der Firma Merck Serono in Darmstadt und insbesondere Dr. Jens Oliver Funk für die großzügige Unterstützung und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Abteilung *Therapeutic Area Oncology* anzufertigen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Christopher Stroh, Dr. Dirk Wienke und Dr. Andree Blaukat bedanken, die mich als Doktorandin bei Merck Serono eingestellt und mir dadurch eine großartige Zeit geschenkt haben. Bei Fragen und Problemen habe ich stets ein offenes Ohr gefunden und fühlte mich immer kompetent beraten, was sowohl fachliche Fragestellungen als auch die Unterstützung meines persönlichen Werdegangs anging.

Während meiner Promotion haben mich viele Kollegen mit Rat und Tat unterstützt, denen ich hiermit sehr herzlich danken möchte: Dr. Tanja Henzler und Stefanie Pohl danke ich für die Einführung und Bereitstellung des EGFR-Luminex Kits und für die Idee, meine Ergebnisse auf einer Konferenz in San Diego zu präsentieren. Bei den Laboren Dr. Tobias Haas und Dr. Detlev Güssow bedanke ich mich für die durchgeführten Sequenzierungen und die Real-Time PCR-Analyse. Dem Labor Dr. Christa Burger danke ich für die Bereitstellung zahlreicher Zelllinien. Die Affymetrix-Studie wurde mir durch die Zusammenarbeit mit Dr. Hans Jürgen Grote, Melanie Kühnl, Dr. Catherine Salvat und Marie-Laure Curchot ermöglicht. Für die Auswertung der Affymetrix-Daten möchte ich mich bei Dr. Eike Staub bedanken. Meinen Praktikanten Janis Müller und Anna Riemer danke ich für die wahnsinnig tatkräftige Unterstützung bei meinen experimentellen Arbeiten. Den Mitarbeitern der Abteilung *TA Oncology* danke ich für die Hilfsbereitschaft und die Freundlichkeit, mit der man mir begegnete, und die dazu beigetragen hat, dass ich jeden Tag aufs Neue gerne zur Arbeit gegangen bin.

Die Zeit bei Merck wird mir vor allem durch das wunderbare Miteinander und den freundschaftlichen Zusammenhalt im Doktorandenlabor in Erinnerung bleiben. Dafür verantwortlich sind die (ehemaligen) Doktoranden Bettina Faden, Denis Irmer, Elena Kilian, Ralf Reiners, Friederike Sander (geb. Krop), Dirk Vocke und viele weitere Mitarbeiter, die im Laufe der Zeit bei uns waren. Ich danke euch für dieses tolle Erlebnis!