

Aus dem Institut für Klinische Physiologie  
Direktor: Prof. Dr. M. Fromm  
und der Medizinischen Klinik I, Gastroenterologie / Infektiologie / Rheumatologie  
Direktor: Prof. Dr. M. Zeitz  
Campus Benjamin Franklin  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Habilitationsschrift

**Wachstumsfaktorrezeptoren als Zielproteine in der gastrointestinalen  
Onkologie: Bedeutung des EGF- und IGF-1-Rezeptors bei der  
Wachstumsregulation gastrointestinaler Tumoren**

zur Erlangung der Venia legendi im Fach

*Experimentelle Biomedizin*

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Michael Höpfner

geboren am 02.02.1966 in Berlin

Juni 2006

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Schirmacher, Heidelberg
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Guido Adler, Ulm

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)</b>	<b>2</b>
	1.1.1 Charakteristika des EGFR	2
<b>1.2</b>	<b>Der insulinartige Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF-1R)</b>	<b>4</b>
	1.2.1 Charakteristika des IGF-1R	4
<b>1.3.</b>	<b>EGFR- und IGF-1R-induzierte Signaltransduktion</b>	<b>6</b>
	1.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	6
	1.3.2 Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)	6
<b>1.4</b>	<b>Bedeutung von EGFR und IGF-1R bei Tumorentstehung und –wachstum</b>	<b>7</b>
	1.4.1 Bedeutung des EGFR	7
	1.4.2 Bedeutung des IGF-1R	9
<b>1.5</b>	<b>Therapeutische Beeinflussung von EGFR und IGF-1R</b>	<b>11</b>
	1.5.1 Therapeutische Beeinflussung des EGFR	11
	1.5.1.1 Tyrosinkinaseinhibitoren	11
	1.5.1.2 Monoklonale Antikörper	12
	1.5.2 Therapeutische Beeinflussung des IGF-1R	13
	1.5.2.1 Tyrosinkinaseinhibitoren	15
<b>1.6</b>	<b>Gastrointestinale Tumoren</b>	<b>15</b>
	1.6.1 Hepatozelluläre Karzinome	15
	1.6.2 Neuroendokrine gastroenteropankreatische Tumoren	17
	1.6.3 Kolorektale Karzinome	18
	1.6.4 Ösophaguskarzinome	19
<b>1.7</b>	<b>Fragestellungen und Ziele der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse in Form von Veröffentlichungen</b>	<b>23</b>

<b>2.1</b>	<b>I. Teil: Ergebnisse zur Inhibition von EGF- und IGF-1 Rezeptoren bei hepatozellulären Karzinomen</b>	<b>23</b>
2.1.1	Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (“Iressa”) for treatment of hepatocellular carcinoma. J. Hepatol, 2004; 41: 1008-1016	<b>24</b>
2.1.2	Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics. J. Hepatol, 2005; 43: 661-669	<b>34</b>
2.1.3	Signaling pathways modulated by epidermal growth factor receptor inhibition by erlotinib (Tarceva <sup>TM</sup> ) in hepatocellular cancer cells. World J Gastroenterol, 2006; 12: 5160-5167	<b>44</b>
2.1.4	EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. Biochem Pharmacol, 2005; 70: 1568-1578	<b>71</b>
2.1.5	Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells. Biochem Pharmacol 2006; 71: 1435-1448	<b>83</b>
<b>2.2</b>	<b>Zusammenfassung des I. Teils</b>	<b>98</b>
<b>2.3</b>	<b>II. Teil: Ergebnisse zur Inhibition von EGF- und IGF-1 Rezeptoren bei neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren</b>	<b>102</b>
2.3.1	A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumors. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (ZD1839). <i>Br J Cancer, 2003; 89, 1217-1222</i>	<b>103</b>
2.3.2	The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours. <i>Endocrine Related Cancer, 2006; 13: 135-149</i>	<b>114</b>
<b>2.4</b>	<b>Zusammenfassung des II. Teils</b>	<b>130</b>
<b>2.5</b>	<b>III. Teil: Ergebnisse zur Inhibition von EGF- und IGF-1 Rezeptoren bei ösophagealen und kolorektalen Karzinomen</b>	<b>135</b>
2.5.1	Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (Tarceva <sup>TM</sup> ) for the treatment of esophageal cancer. <i>Int J Cancer, 2005; 118: 1814-1822</i>	<b>136</b>
2.5.2	The tyrosine kinase of the insulin-like growth factor receptor as target for novel treatment and prevention strategies of colorectal cancer. <i>World J Gastroenterol, 2006; 12: 5635-5643</i>	<b>146</b>
<b>2.6</b>	<b>Zusammenfassung des III. Teils</b>	<b>179</b>

---

<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>182</b>
<b>3.1</b>	<b>EGFR- und IGF-1R-Inhibitionen als innovative Therapiekonzepte für gastrointestinale Tumoren</b>	<b>182</b>
3.1.1	Apoptoseinduktion durch EGFR- und IGF-1R-Inhibition	183
3.1.2	Zellzyklusmodulation durch EGFR- und IGF-1R-Inhibition	186
3.1.3	Zytotoxizitätseffekte durch EGFR- und IGF-1R-Inhibition	187
<b>3.2</b>	<b>Regulation mitogener Signalwege durch EGFR- und IGF-1R-Inhibition</b>	<b>188</b>
3.2.1	MAP-Kinase-Regulation	188
3.2.2	Regulation des JAK-STAT-Signalwegs	189
<b>3.3</b>	<b>Kombinationstherapeutische Ansätze</b>	<b>190</b>
3.3.1	Modulation der antiproliferativen Effekte konventioneller Chemotherapeutika durch simultane EGFR- bzw. IGF-1R-Inhibition	190
3.3.2	Dualer Angriff am EGFR	194
3.3.3	Simultane Inhibition von EGFR und IGF-1R	195
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Fazit</b>	<b>197</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>200</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung</b>	<b>212</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung</b>	<b>213</b>

## **Zusammenfassung**

Die beiden Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und IGF-1R sind als Zielproteine für neuartige, zielgerichtete Krebstherapien aus verschiedenen Gründen interessant. Zum einen sind beide Rezeptoren in vielen Tumoren überexprimiert oder besitzen aufgrund von Mutationen eine unphysiologisch hohe Aktivität. Da gerade die Aktivität dieser beiden Wachstumsfaktorrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und -progression spielt, bieten Inhibitionen auf der Ebene der Rezeptoraktivierung bzw. Hemmungen der vorhandenen Rezeptoraktivität interessante Behandlungsstrategien für innovative Tumortherapieansätze. Zum anderen könnten sich neue Möglichkeiten für nebenwirkungsärmere und patientenverträglichere Therapien eröffnen, da Wachstumsfaktorrezeptor-basierte Ansätze im Gegensatz zu den konventionellen palliativen Behandlungsmethoden mit Zytostatika und/oder Bestrahlung eine größere Zielgerichtetheit und Selektivität aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit der zielgerichteten Blockade von EGFR und IGF-1R an verschiedenen gastrointestinalen Tumorentitäten überprüft, die bislang in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht worden sind. Hierbei konnte der Nachweis der *in-vitro*-Wirksamkeit dieses Therapiekonzepts gezeigt werden. Durch die zusätzliche Charakterisierung der beteiligten Signaltransduktionswege erweitern die Untersuchungsergebnisse außerdem das Verständnis hinsichtlich der Bedeutung von EGFR- und IGF-1R-Inhibitionen zur Proliferationskontrolle gastrointestinaler Karzinome.

So konnte gezeigt werden, dass die Blockade von EGFR und IGF-1R durch spezifische EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren oder durch monoklonale Antikörper das Wachstum der Tumorzellen von hepatozellulären, kolorektalen, ösophagealen und neuroendokrinen gastrointestinalen Karzinomen inhibiert, und dass daran Apoptose und/oder Zellzyklusmodulationen beteiligt sind. Aus dem Wissen um die beteiligten Signalwege lassen sich wichtige Schlussfolgerungen für mögliche kombinationstherapeutische Ansätze ableiten, bei denen die Wachstumsfaktorrezeptor-basierten Inhibitionen mit Arzneistoffen kombiniert

werden, die in der Therapie der jeweiligen Tumoren bereits etabliert sind. In diesem Zusammenhang konnte herausgearbeitet werden, dass EGFR- und IGF-1R-Inhibitoren das Potenzial besitzen, die Wirkung konventioneller Chemotherapeutika (über-)additiv zu steigern. Diese Eigenschaft könnte sie daher in besonderem Maße für kombinations-therapeutische Ansätze zur dringend benötigten effizienteren medikamentösen Therapie gastrointestinaler Tumoren qualifizieren.

Ferner wurde die Transaktivierung des EGFR durch Aktivierung des IGF-1R nachgewiesen. Der interessante Ansatz einer kombinierten Inhibition der beiden miteinander interagierenden Wachstumsfaktorrezeptoren wurde weiter verfolgt und es konnte gezeigt werden, dass die simultane Blockade von EGFR- und IGF-1R zu einer (über-)additiven Steigerung der antiproliferativen Wirksamkeit führt.

Auch die Möglichkeit eines dualen Angriffs an einem Wachstumsfaktorrezeptor zur Wirkungssteigerung wurde untersucht. So konnte am Beispiel des EGFR gezeigt werden, dass die simultane Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibition mittels Tyrosinkinaseinhibitor und monoklonalem Antikörper zu einer deutliche Zunahme der antiproliferativen Effektivität bei den untersuchten gastrointestinalen Karzinomzellmodellen führt.

Zur Übertragbarkeit der an Zelllinien gewonnenen Ergebnisse wurden zudem Untersuchungen an Primärzellkulturen aus Biopsaten/Resektaten von humanen kolorektalen-, neuroendokrinen- und ösophagealen Karzinomen durchgeführt, welche im Vergleich zur ausschließlichen Verwendung humaner Zelllinien ein patientennäheres Untersuchungsmodell darstellen. Die besondere Notwendigkeit und das prädiktive Potenzial derartiger Testungen wurde dadurch unterstrichen, dass trotz des grundsätzlich guten Ansprechens auf die Behandlungen deutliche individuelle Sensitivitätsunterschiede bis hin zur relativen Unsensitivität einzelner Proben beobachtet wurden. Insofern erscheint die vorgestellte Methode zur *in-vitro*-Testung an Primärkulturzellen als eine einfache und praktikable Möglichkeit zur Einschätzung, ob ein individuelles Therapieansprechen zu erwarten ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hier vorgestellten Ergebnisse eindeutig belegen, dass EGFR- und IGF-1R vielversprechende Zielstrukturen für innovative und zielgerichtete Therapieansätze bei gastrointestinalen Tumoren sind.

Mit dieser Arbeit konnte somit ein erster Beitrag zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden Wirkmechanismen und der antiproliferativen Potenz von EGFR- und IGF-1R-basierten Therapieansätzen bei gastrointestinalen Tumoren geleistet werden. Die vorgestellten Ergebnisse eröffnen vielfältige Anknüpfungspunkte für weiterführende Untersuchungen - insbesondere hinsichtlich kombinationstherapeutischer Ansätze und der Möglichkeit, die antiproliferative Effektivität der Therapie durch die duale Blockade eines Rezeptors bzw. durch die gleichzeitige Blockade der beiden interagierenden Wachstumsfaktorrezeptoren zu erhöhen.

Das Ziel künftiger Überprüfungen wird es jedoch zunächst sein müssen, die *in-vivo*-Tauglichkeit der hier vorgestellten Ansätze zu verifizieren. Die vielversprechenden *in-vitro*-Ergebnisse dieser Arbeit lassen die berechtigte Annahme zu, dass dies gelingen kann.

**Summary:**

Due to several reasons the epidermal growth factor receptor (EGFR) and also the insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-1R) are promising targets for innovative and targeted anti-tumor therapies. Tumor -development and -progression particularly depend on the activity of these two receptors, which are over-expressed and/or over-activated in many tumors. Thus, inhibition of EGFR- and IGF-1R –signaling by blocking the receptors' intrinsic tyrosine kinase activities or by blocking the receptors' ligand binding sites with monoclonal antibodies are encouraging strategies for future anti-tumor therapies. Moreover, growth factor receptor-based strategies may offer new possibilities for a more effective and well-tolerated medical treatment, because of an enhanced tumor selectivity as compared to conventional chemotherapy with cytostatics and/or radiation.

In the present work the growth inhibitory effectiveness and specificity of EGFR- and IGF-1R-blockade was evaluated in gastrointestinal tumors (e.g. hepatocellular-, colorectal-, esophageal carcinoma and neuroendocrine gastrointestinal tumors), which have not been evaluated in this respect so far.

In-vitro-studies clearly demonstrated the excellent suitability of EGFR- and IGF-1R-inhibition for growth control of gastrointestinal tumor cells. The antiproliferative effects were shown to be based on cell cycle arrest and/or the induction of apoptosis, while unspecific cytotoxicity did not contribute to the observed growth inhibition.

The in-depth characterization of the signaling events and pathways which were causative for the observed antineoplastic effects expands the current knowledge on the particular meaning of EGFR- and IGF-1R-inhibition for growth control of gastrointestinal tumors.

Moreover, these findings are of great interest for combination treatments, in which growth-factor receptor inhibitors were combined with cytostatics that are already in use for the palliative treatment of the respective gastrointestinal cancers. Both EGFR- as well as IGF-1R-



inhibitors were shown to (over-)additively enhance the effectiveness of conventional cytostatics qualifying them as promising drugs for future combination treatments.

Moreover, transactivation of the EGFR-system by IGF-1R activation was detected, leading to the idea of dual-targeting gastrointestinal tumor cells by both EGFR- and IGF-1R inhibitors for enhanced growth inhibition. In fact, the simultaneous blockade of both growth-factor receptors resulted in additive and even over-additive growth inhibitory effects.

Additionally, the growth inhibitory potency of a dual inhibition of EGFR signaling by simultaneous treatment with EGFR-specific monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors was evaluated. This dual inhibition strategy also resulted in enhanced antiproliferative and apoptotic effects as compared to mono-treatment with either inhibitor alone.

In addition to in-vitro studies on permanent cell lines, primary cell cultures of human gastrointestinal cancers (e.g. colorectal-, esophageal carcinoma and neuroendocrine gastrointestinal tumors) were established and investigated. The primary goal of these additional investigations was to study the antineoplastic potency of EGFR- and IGF-1R-inhibition in clinically more relevant cell models, as permanent cell lines may represent well-suited but nevertheless non-representative models of the respective gastrointestinal cancers. Moreover, chemosensitivity testing of primary cultures was performed to establish a new method for predicting the response of an individual patient to a certain drug.

The findings on primary cell cultures generally underlined the suitability of EGFR- and IGF-1R blockade for growth inhibition of gastrointestinal cancers. Nevertheless, as discrepancies concerning the individual sensitivity to the respective treatment with EGFR- and IGF-1R inhibitors were observed between the different gastrointestinal cancers but also within a respective tumor entity, these findings also emphasize the need for individual pre-testings. Because of its convenience and practicability the presented approach using preprocessed primary cell cultures appears to be a promising method to do that.

Taken together, the findings present here clearly demonstrated that both the EGFR as well as the IGF-1R are promising targets for innovative and targeted anti-tumor therapies of gastrointestinal tumors.

The present work provided first information for a better understanding of the underlying mechanisms of the antiproliferative potency of EGFR- and IGF-1R-based approaches for the treatment of gastrointestinal tumors. The findings will open up multiple points of contact for further investigations, especially concerning the development of tailored combination treatments with enhanced efficacy. Moreover, the interesting data on dual targeting gastrointestinal tumor cells with EGFR- and IGF-1R inhibitors for simultaneous inhibition of these two interacting growth factor receptors appears to be a very promising approach for future treatment strategies. The same holds true for dual inhibition of one growth factor receptor by simultaneous blockade with tyrosine kinase inhibitors and monoclonal antibodies. Future investigations will aim to confirm the *in vivo* suitability of the *in vitro* data presented in this study. The encouraging findings on primary cell culture testings give rise to the assumption that respective *in vivo* evaluations will be successful.

## 6 Danksagung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden im Zeitraum von 2001 bis 2006 in der Medizinischen Klinik I, Gastroenterologie / Infektiologie / Rheumatologie der Charité – Universitätsmedizin in Berlin, Campus Benjamin Franklin durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. Fromm und Herrn Prof. Dr. Zeitz möchte ich mich herzlich für die entgegengebrachte Unterstützung und das große Interesse an meiner Arbeit bedanken. Insbesondere für die hilfreichen Anregungen und die stets freundliche sowie unkomplizierte Art, in der Herr Prof. Dr. Fromm mir bei der Vermeidung von organisatorischen und planerischen Problemen geholfen hat, möchte ich mich an dieser Stelle besonders bedanken.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Scherübl, in dessen Arbeitsgruppe ich die besten Voraussetzungen zur Umsetzung dieser Arbeit fand. Seine hilfsbereite und kritische Betreuung, die anregenden Diskussionen mit ihm sowie sein Vertrauen in meine eigenständige Arbeit bildeten die Eckpfeiler für das Gelingen dieses Vorhabens.

Eine gute Arbeit kann natürlich nur in einem guten Umfeld gelingen. Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sowie den benachbarten Kollegen aus dem Institut für Physiologie der Charité am Campus Benjamin Franklin gebührt mein herzlicher Dank für das stets hervorragende Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. Andreas Sutter, Herrn Dr. Alexander Hüther und Frau Dr. Kerstin Maaser für die produktive Zusammenarbeit, die fruchtbaren Diskussionen und die vielfältige Unterstützung.

**7 Erklärung****ERKLÄRUNG**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift