

2. Ergebnisse in Form von Veröffentlichungen

2.1 I. Teil:

Ergebnisse zur Inhibition von EGF- und IGF-1 Rezeptoren bei hepatozellulären Karzinomen

- 2.1.1 **Höpfner M**, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherübl H.
Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (“Iressa”) for treatment of hepatocellular carcinoma.
J. Hepatol, 2004; 41: 1008-1016
- 2.1.2 Huether A, **Höpfner M**, Sutter AP, Schuppan D, Scherübl H.
Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics.
J. Hepatol, 2005; 43: 661-669
- 2.1.3 Huether A, **Höpfner M**, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H.
Signaling pathways modulated by epidermal growth factor receptor inhibition by erlotinib (TarcevaTM) in hepatocellular cancer cells.
World J Gastroenterol, 2006; 12: 5160-5167
- 2.1.4 Huether A, **Höpfner M**, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H.
EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer.
Biochem Pharmacol, 2005; 70: 1568-1578
- 2.1.5 **Höpfner M**, Huether A, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H.
Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells.
Biochem Pharmacol 2006; 71: 1435-1448

S. 24-33

2.1.1

Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (“Iressa”) for treatment of hepatocellular carcinoma

Höpfner M, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherübl H.

J. Hepatol, 2004; 41: 1008-1016

S. 34-43

2.1.2

Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics

Huether A, **Höpfner M**, Sutter AP, Schuppan D, Scherübl H.

J. Hepatol, 2005; 43: 661-669

S. 44-70

2.1.3

Signaling pathways modulated by epidermal growth factor receptor inhibition by erlotinib (TarcevaTM) in hepatocellular cancer cells

World J Gastroenterol, 2006; 12: 5160-5167

Huether A, **Höpfner M**, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H.

S. 71-82

2.1.4

EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer

Huether A, **Höpfner M**, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H.

Biochem Pharmacol, 2005; 70:1568-1578

S. 83-97

2.1.5

Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells

Höpfner M, Huether A, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H.

Biochem Pharmacol 2006; 71: 1435-1448

2.2 Zusammenfassung des I. Teils

Die Untersuchungen zur antiproliferativen Potenz von EGFR- und IGF-1R-Inhibitionen beim hepatozellulären Karzinom wurden an vier verschiedenen Zellmodellen humaner Hepatom- bzw. hepatozellulärer Karzinomzellen durchgeführt.

Zunächst wurde der Nachweis einer funktionellen Expression von EGFR und IGF-1R durch mRNA- und Proteinexpressionsstudien sowie durch molekularbiologische Methoden erbracht. Eine zusätzliche Expression der in Tumorzellen häufig auftretenden, konstitutiv aktiven EGFR-Mutante EGFRvIII wurde hingegen in den untersuchten Modellen nicht gefunden (vgl. 2.1.1, 2.1.5).

Die EGFR-TK-Inhibitoren Gefitinib (vgl. 2.1.1) und Erlotinib (vgl. 2.1.2, 2.1.3) und sowie die monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab (vgl. 2.1.4) bzw. ab3103 (vgl. 2.1.5) bewirkten ausgeprägte dosis- und zeitabhängige Wachstumsinhibitionen bei HCC-Zellen. Auch für die IGF-1R-TK-Inhibitoren NVP-AEW541 (vgl. 2.1.5) und AG1024 (vgl. 2.1.4) konnten zeit- und dosisabhängige Wachstumshemmungen bei HCC-Zellen gezeigt werden. Um die Wirkweise der verwendeten EGFR- und IGF-1R-Inhibitoren bei HCC-Zellen zu verstehen, wurden die beteiligten Signalwege charakterisiert. Mittels funktioneller und molekularbiologischer Methoden wurden die Anteile apoptotischer, zellzyklusmodulierender sowie zytotoxischer Effekte am Zustandekommen der beobachteten antineoplastischen Gesamteffekte identifiziert.

EGFR-Inhibition und Apoptose:

Die EGFR-TK-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib bewirkten eine mitochondrien- sowie Caspase-3 und Caspase-8-abhängige Apoptoseinduktion. Die EGFR-Inhibitor-induzierte Apoptose führte zu einer Suppression antiapoptotischer Faktoren wie Bcl-2, Bcl_{XL} und jun D. Zudem konnte gezeigt werden, dass die antiapoptotischen STAT-Proteine STAT1 und STAT3

durch Behandlung mit EGFR-TKIs dephosphoryliert und damit in ihrer zytoprotektiven Wirkung inhibiert werden (vgl. 2.1.1, 2.1.2, 2.1.4).

IGF-1R-Inhibition und Apoptose:

Auch die durch IGF-1R-TK-Inhibitoren verursachte Apoptose erfolgte unter Beteiligung der Mitochondrien und der Caspasen-3 und -8. Im Gegensatz zur EGFR-Inhibitor-vermittelten Apoptose wurde jedoch festgestellt, dass bei der IGF-1R-TKI-induzierten Apoptose die Aktivierung der Caspase-8 nicht unabhängig, sondern als Caspase-3-abhängiger Effekt ausgelöst wurde. IGF-1R-TK-Inhibition führte zur Suppression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Survivin, während die Expression von proapoptotischem BAX induziert wurde (vgl. 2.1.5).

Zellzyklusregulation:

Inhibitionen von EGFR- (vgl. 2.1.1, 2.1.2, 2.1.4) sowie IGF-1R (vgl. 2.1.5) führten bei HCC-Zellen zu einer Arretierung in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus. In höheren Konzentrationen wurde bei EGFR-TK-Inhibition durch Gefitinib z.T. auch eine zusätzliche Arretierung in der G_{2/M}-Phase beobachtet (vgl. 2.1.1).

Mittels cDNA-Array-Technologie und *Western Blotting* konnte der Mechanismus des durch EGFR-Inhibition induzierten Zellzyklusarrests charakterisiert werden (vgl. 2.1.3). Die Hemmung der ERK1/2-MAPK durch EGFR-Blockade führt zu transkriptionellen Veränderungen zellzyklusrelevanter Gene. Dadurch kommt es zu einer Expressionszunahme zellzyklusarretierender Proteine wie die der gadd45 und 153 (growth arrest and DNA-damage inducible genes) und der Zellzyklusinhibitoren p21^{Waf1/CIP1} und p27^{Kip1}, während die Expression von Zellzykluspromotoren wie Cyclin D1 supprimiert wurde.

Zytotoxizität:

Um nekrotische/membranschädigende Effekte von EGFR- und IGF-1R Inhibitionen bei HCC Zellen abzuschätzen, wurden Membranintegritätsmessungen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von HCC-Zellen mit EGFR- (vgl. 2.1.1, 2.1.2; 2.1.4) bzw. IGF-1R-Inhibitoren (vgl. 2.1.5) nicht zu unspezifischen zytotoxischen Ereignissen führt. Zwar wurde nach langandauernder Inkubation mit hohen Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren (TK-Inhibitoren bzw. Antikörper) eine signifikante Zunahme des Zytotoxizitätsmarkers LDH im Zellkulturmedium detektiert. Bedingt durch die fehlende Eliminierung apoptotischer Zellen durch Makrophagen bei den durchgeführten *in vitro* Messungen ist jedoch davon auszugehen, dass die gemessene LDH-Zunahme im Kulturmedium das Resultat vorangegangener apoptotischer Ereignisse war, da eine enge Korrelation zwischen dem durch die jeweiligen Inhibitoren ausgelösten Ausmaß an Apoptose und der gemessenen LDH-Konzentration vorlag (vgl. 2.1.5). Insgesamt belegen die Zytotoxizitätsuntersuchungen, dass die getesteten EGFR- (vgl. 2.1.1, 2.1.2, 2.1.4) und IGF-1R-Blocker (vgl. 2.1.5) bei humanen hepatozellulären Karzinomzellen keine nennenswerte, unspezifische Zytotoxizität induzieren.

Kombinationsansätze:

Kombinationstherapien stellen eine vielversprechende Strategie zur Vermeidung bzw. Überwindung von Resistenzen gegen Monotherapien dar. Als Basis für einen künftigen klinischen Einsatz wurden Synergismen der antineoplastischen Wirkung von EGFR- sowie von IGF-1R-Inhibitionen mit experimentellen oder bereits etablierten Chemotherapeutika untersucht. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass durch Inhibition des EGFR-Signalwegs mittels TKIs oder Antikörperbehandlung die antiproliferativen Wirkungen des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Fluvastatin, des Topoisomerase-2-Inhibitors Doxorubicin, des Taxans Docetaxel, des Topoisomerase-1-Inhibitors SN-38, des COX-2-Inhibitors

Meloxicam sowie die von L-Selenomethionin (über-)additiv verstärkt werden konnten (vgl. 2.1.2, 2.1.4). Zusätzlich wurde die duale Blockade des EGFR-Signalwegs durch gleichzeitige Inkubation mit EGFR-TKI und EGFR-Antikörper überprüft. Auch hier wurde eine synergistische Verstärkung der antiproliferativen Effekte festgestellt (vgl. 2.1.4). Demgegenüber führten Kombinationen aus EGFR-TK-Inhibitoren mit Interferon- α oder mit Cisplatin nicht zu einer Wirkungsverstärkung (vgl. 2.1.2).

Antiproliferative Synergismen wurden auch bei Kombinationen des IGF-1R-TK-Inhibitors NVP-AEW541 mit Doxorubicin oder Docetaxel beobachtet. Ebenfalls additive Wachstumshemmungen wurden bei dualer Blockade des IGF-1R mittels gleichzeitiger Inkubation mit TK-Inhibitoren und Rezeptorantikörpern festgestellt (vgl. 2.1.5). Demgegenüber wurde bei der Kombination von NVP-AEW541 mit dem aktiven Irinotecan-Metaboliten SN-38 keine antiproliferative Wirkungsverstärkung festgestellt (vgl. 2.1.5).

Auf der Grundlage der gezeigten Transaktivierung des EGFR durch IGF-1R-vermittelte mitogene Stimuli (vgl. 2.1.3) wurden außerdem Kombinationsversuche durchgeführt, bei denen eine simultane Inhibition von EGFR- und IGF-1R-Signalwegen überprüft wurde. Die gleichzeitige Inhibition von EGFR- und IGF-1R-Signalwegen führte dabei zu synergistischen Wachstumshemmungen bei HCC Zellen (vgl. 2.1.3, 2.1.5). Mit diesen Untersuchungen konnte somit auch ein wichtiger Ansatzpunkt für Strategien zur Überwindung von Resistenzen gegenüber anti-EGFR-basierten Therapien geliefert werden, da durch die simultane Inhibition jene kompensatorischen Mechanismen ausgeschaltet werden können, mit denen der IGF-1R einer EGFR-Inhibition entgegenwirken kann.

Ergebnisse in Form von Veröffentlichungen

2.3 **II. Teil:** **Ergebnisse zur Inhibition von EGF- und IGF-1 Rezeptoren bei neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren**

2.3.1 **Höpfner M**, Sutter AP, Gerst B, Zeitz M, Scherübl H.

A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumors. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (ZD1839).

Br J Cancer, 2003; 86: 1217-1222

2.3.2 **Höpfner M**, Baradari V, Huether A, Schöfl C, Scherübl H.

The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours.

Endocrine Related Cancer, 2006; 13: 135-149

S. 103-113

2.3.1

A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumors. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (ZD1839).

Höpfner M, Sutter AP, Gerst B, Zeitz M, Scherübl H.

Br J Cancer, 2003; 86: 1217-1222

S. 114-129

2.3.2

The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours.

Höpfner M, Baradari V, Huether A, Schöfl C, Scherübl H.

Endocrine Related Cancer, 2006; 13: 135-149

2.4 Zusammenfassung des II. Teils

Um der besonderen Tumorbiologie und Spannweite im Wachstumsverhalten von GEPNETs gerecht zu werden (vgl. 1.6.2), wurden die Untersuchungen zur antineoplastischen Potenz von EGFR- und IGF-1R-Inhibitoren an drei Zelllinien neuroendokriner gastrointestinaler Tumoren mit unterschiedlichem Ursprung und unterschiedlicher Proliferationskinetik durchgeführt. Als Beispiel für langsam wachsende GEPNETs diente die neuroendokrine Dünndarmtumorzelllinie STC-1. Die Pankreas-Karzinoidzelllinie BON wurde als Beispiel für ein moderat wachsendes GEPNET untersucht. Die Insulinomzelllinie CM wurde als Beispiel eines schnell wachsenden GEPNET verwendet. Zusätzlich wurden erstmals auch Primärzellkulturen aus GEPNET-Resektaten in diesen Zusammenhang untersucht. In allen Zellmodellen (Zelllinien und Primärzellkulturen) konnte die Expression funktioneller EGFR- bzw. IGF-1-Rezeptoren nachgewiesen werden. Eine Expression der EGFR-Mutante EGFRvIII konnte hingegen - vergleichbar zu den Ergebnissen bei HCC Zellen - auch bei GEPNET-Zelllinien nicht detektiert werden (vgl. 2.3.1).

Ergebnisse zur EGFR-Inhibition bei GEPNETs (vgl. 2.3.1):

Am Beispiel des EGFR-TK-Inhibitors Gefitinib konnte die antineoplastische Potenz einer EGFR-Inhibition bei neuroendokrinen gastrointestinalen Tumorzellen eindrucksvoll gezeigt werden. Interessanterweise zeigte sich, dass die EGFR-TK-Inhibition in Abhängigkeit von der Proliferationskinetik bzw. des Ursprungs der verschiedenen GEPNET-Zellmodelle deutliche Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität und der an der antiproliferativen Wirkung beteiligten Signalwege aufweist. So fand sich eine enge Korrelation zwischen der Verdopplungszeit der Zelllinien mit dem IC_{50} -Wert des EGFR-Inhibitors: Je länger die Verdopplungszeit, desto größer war der IC_{50} -Wert des EGFR-TK-Inhibitors.

Sowohl die Induktion von Apoptose als Zellzyklusalterationen trugen zu den antineoplastischen Effekten der EGFR-TK-Inhibition bei. Als Apoptosenachweis wurde die

zeit- und dosisabhängige Aktivierung der Caspase-3 untersucht sowie zusätzlich die Fragmentierung der DNA mittels Cell Death Detection ELISA dargestellt. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse Propidiumiodid-gefärbter Zellkerne wurde eine Akkumulation Gefitinib-behandelter Zellen in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus nachgewiesen. Interessanterweise war die Zellzyklusarretierung am ausgeprägtesten in schnell wachsenden CM-Zellen, die Apoptoseantwort dagegen am stärksten in langsam wachsenden STC-1-Zellen.

Bei Kombinationsexperimenten konnte eine synergistische Wachstumsinhibition bei gleichzeitiger Inkubation mit Gefitinib und dem Noradrenalinderivat meta-Iodobenzylguanidin (MIBG) gezeigt werden. Die synergistische Wachstumshemmung beruhte auf einer verstärkten Apoptoseantwort. In seiner radioaktiv markierten Form wird MIBG (¹³¹I-MIBG) seit langem zur Diagnose und Therapie von neuroendokrinen Tumoren angewandt, sofern diese über funktionstüchtige plasmamembranäre und vesikuläre Monoamintransporter verfügen. In den Kombinationsversuchen wurde jedoch nicht-radioaktives MIBG eingesetzt, dessen antiproliferative Wirkung auf die Nordrenalintransporter-positive GEPNET-Zelllinie STC-1 bereits in einer vorangegangenen Untersuchung gezeigt werden konnte (Höpfner *et al.*, 2002).

Differenzielle Expression zellzyklus- und apoptoseregulierender Gene durch EGFR-Inhibition:

Die cDNA-Array-Technologie zur simultanen Erfassung einer Vielzahl genetischer Veränderungen wurde zur molekularbiologischen Überprüfung von Gefitinib-induzierten Veränderungen der Expression apoptose- und zellzyklusregulierender Gene eingesetzt. Am Modell humaner Insulinomzellen (CM-Zellen) wurde nach EGFR-Inhibition mit Gefitinib eine deutliche Überexpression von apoptosefördernden Genen wie Caspase-4, *programmed cell death 2*, *Bad* und *Harakiri* sowie eine Suppression zellzyklusstimulierender Cycline und Kinasen (*Cyclin H*, *Cyclin E1*, *ERK1*, *CDC-like kinase 3*, *cyclin-dependent kinase 10*)

festgestellt. Gleichzeitig wurde PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), das an DNA-Replikation und -Reparatur beteiligt ist, supprimiert. Gadd 153, das sowohl für Apoptose-induktion als auch für Zellzyklusarretierung in der G₁/G₀-Phase bedeutsam ist, wurde überexprimiert. Die Ergebnisse korrelierten somit mit dem bei durchflusszytometrischen Bestimmungen gefundenen G₁/G₀-Arrest.

Die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und die p38-MAPKinase vermitteln bekanntermaßen die Effekte von Wachstumsfaktoren bei nicht-neuroendokrinen Tumoren (Harper *et al.*, 2002; Raucci *et al.*, 2004; vgl. auch 1.3.1). Auch für GEPNET-Zellen konnte nunmehr gezeigt werden, dass es durch EGFR-TK-Inhibition zu einer dosis- und zeitabhängigen Dephosphorylierung der mitogen und antiapoptotisch wirksamen ERK1/2-MAPK kommt. Dagegen wurde die Phosphorylierung der Stress-aktivierten p38-MAPK nicht durch EGFR-TK-Inhibition beeinflusst.

Ergebnisse zur IGF-1R-Inhibition bei GEPNET (vgl. 2.3.2):

Die antiproliferativen Effekte einer IGF-1R-Inhibition wurden ebenfalls bei GEPNET-Zellen mit unterschiedlicher Proliferationskinetik (CM- und BON-Zellen) sowie an Primärkulturzellen aus Operationsrektaten überprüft. Als Inhibitor wurde der spezifische IGF-1R-TK-Inhibitor NVP-AEW541 eingesetzt.

NVP-AEW541 bewirkte eine dosis- und zeitabhängige Wachstumsinhibition, an der sowohl die Induktion von Apoptose als auch der Arrest der Zellen in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus beteiligt waren. Zytotoxizitätsmessungen zeigten, dass selbst hohe Konzentrationen des TK-Inhibitors keine akuten und unspezifischen Zytotoxizitätseffekte auslösten. Vergleichbar zu den Ergebnissen, die bei der EGFR-Inhibition von GEPNET-Zellen festgestellt wurden, reagierten auch bei der IGF-1R-TKI-induzierten Proliferationshemmung die schnell proliferierende GEPNET-Zellen sensitiver auf die Inhibitorbehandlung als jene mit langsamerer Verdopplungszeit.

Die Caspase-3-abhängige Apoptoseinduktion durch NVP-AEW541 war gekennzeichnet durch eine Zunahme von proapoptotischem BAX bei gleichzeitiger Abnahme von antiapoptotischem Bcl-2. Die Arretierung des Zellzyklus in der G₁/G₀-Phase ging einher mit der Hochregulation des zellzyklusarretierenden, cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p27^{Kip1}, während der Zellzykluspromotor Cyclin D1 supprimiert wurde. Außerdem wurden die Dephosphorylierung des IGF-1R sowie die Inaktivierung der ERK1/2-MAPK durch NVP-AEW541 mittels Western Blotting gezeigt.

Als Grundlage für kombinationstherapeutische Ansätze zur Verbesserung der palliativen Behandlungsmöglichkeiten von GEPNETs wurden abschließend Kombinationsexperimente durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine additive bis überadditive antiproliferative Wirkung erzielt werden kann, wenn die IGF-1R-Inhibition mit Zytostatika wie Doxorubicin oder dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Fluvastatin kombiniert wird. Demgegenüber ergaben Kombinationen mit dem in der Chemotherapie etablierten 5-Fluorouracil (5-FU) keine Wirkungsverstärkung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Inhibitionen von EGFR- und IGF-1R auch bei GEPNET-Zellen eine effektive Möglichkeit zur Wachstumshemmung darstellen. Trotz einzelner Unterschiede auf der Ebene der beteiligten regulatorischen Proteine ähneln die Ergebnisse denen, die bei den analogen Untersuchungen an hepatozellulären Karzinomzellen gefunden wurden - sowohl hinsichtlich der Wirkweise und involvierten Wirkmechanismen (Apoptose, Zellzyklusarrest) als auch der hohen Spezifität bei ausbleibender Zytotoxizität. Somit können die an den GEPNET-Modellen gewonnenen Ergebnisse auch im Sinne eines „proof of principle“ aufgefasst werden, dass die Eignung von EGFR- und IGF-1R-basierten Ansätzen für innovative Therapiestrategien bei gastrointestinalen Tumoren unterstreicht.

Die zusätzlich an Primärzellkulturen erhobenen Ergebnisse unterstreichen die Wirksamkeit am patientennahen Modell. Wegen der festgestellten individuellen Sensitivitätsunterschiede

zeigen die Ergebnisse aber auch wie wichtig individuelle Testungen zur Prädiktion des Ansprechens auf derartige „targeted Therapien“ sind und lassen die vorgestellte Methode einer *ex vivo*-Testung als interessante Möglichkeit hierzu erscheinen.

Ergebnisse in Form von Veröffentlichungen

2.5 III. Teil: Ergebnisse zur Inhibition von EGF- und IGF-1 Rezeptoren bei ösophagealen und kolorektalen Karzinomen

2.5.1 Sutter AP*, **Höpfner M***, Huether A, Maaser K, Scherübl H.
Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (TarcevaTM)
for the treatment of esophageal cancer.

Int J. Cancer, 2005; 118: 1814-1822

2.5.2 **Höpfner M**, Sutter AP, Huether A, Baradari V, Scherübl H.
The tyrosine kinase of the insulin-like growth factor receptor as target for novel
treatment and prevention strategies of colorectal cancer.

World J. Gastroenterol, 2006; 12: 563-5643.

* Dual-first authorship

S. 136-145

2.5.1

Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (TarcevaTM) for the treatment of esophageal cancer

Sutter AP, **Höpfner M**, Huether A, Maaser K, Scherübl H.

Int J.Cancer, 2005; 118: 1814-1822

S. 146-178

2.5.2

The tyrosine kinase of the insulin-like growth factor receptor as target for novel treatment and prevention strategies of colorectal cancer

Höpfner M, Sutter AP, Huether A, Baradari V, Scherübl H.

World J Gastroenterol, 2006; 12: 5635-5643.

2.6 Zusammenfassung des III. Teils

Zur weiteren Evaluierung der wachstumsinhibitorischen Wirksamkeit EGFR- und IGF-1R-basierter Ansätze bei gastrointestinalen Tumoren wurden zusätzliche Untersuchungen an Zellmodellen kolorektaler und ösophagealer Karzinome durchgeführt.

EGFR-Inhibition beim Ösophaguskarzinom (vgl. 2.5.1):

Um den beiden unterschiedlichen Histologien des Ösophaguskarzinoms Rechnung zu tragen, wurden drei Plattenepithel- und eine Adenokarzinomzelllinie sowie Primärzellkulturen aus Biopsaten humaner Ösophaguskarzinome untersucht. Als EGFR-Blocker wurden der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab und der EGFR-TK-Inhibitor Erlotinib eingesetzt. Zur Inhibition des IGF-1R-TK wurde das synthetische Tyrphostin AG1024 verwendet.

Die Ergebnisse waren denen, die bereits für das HCC gefunden wurden, größtenteils analog (vgl. 2.1.2-2.1.4). Inhibitionen von EGFR- bzw. IGF-1R führten zur dosisabhängigen Wachstumsinhibition der zuvor auf ihre jeweilige Rezeptorexpression verifizierten Zellmodelle. Das Ansprechen auf eine Behandlung mit dem EGFR-TK-Inhibitor Erlotinib offenbarte hinsichtlich der beiden Ösophaguskarzinomhistologien (Adeno- bzw. Plattenepithelkarzinom) keine Unterschiede. Andererseits gab es innerhalb der untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien deutliche Sensitivitätsunterschiede. Vier der fünf getesteten, EGFR-exprimierenden Primärzellkulturen reagierten mit hoher Sensitivität auf eine Behandlung mit Erlotinib. Eine Primärkultur zeigte hingegen selbst bei hohen Erlotinibkonzentrationen kein signifikantes Ansprechen.

Den antineoplastischen Effekten der EGFR-Inhibition lag neben den Dephosphorylierungen von EGFR und der nachgeschalteten mitogenen ERK1/2-MAPK vor allem eine ausgeprägte Zellzyklusarretierung in der G₁/G₀-Phase zugrunde. Passend zum G₁/G₀-Arrest wurde eine Suppression des Zellzykluspromotors Cyclin D1 gefunden, während die Expression der beiden CDK-Inhibitoren p21^{waf1/CIP1} und p27^{kip1} hochreguliert wurde. Zytotoxizitäts-

messungen zeigten, dass akute bzw. unspezifische Zytotoxizität nicht an der Erlotinib-induzierten Proliferationshemmung beteiligt war.

Interessanterweise wurde im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen an HCC- und GEPNET-Zellen bei den Ösophaguskarzinomzellen keine Apoptoseinduktion durch die EGFR-Inhibition mit Erlotinib beobachtet. So konnten weder mitochondriale Veränderungen noch Aktivierungen der proapoptotischen Caspasen 3 und/oder 8 festgestellt werden. Auch eine apoptosespezifische Fragmentierung der DNA konnte nicht detektiert werden.

Kombinationsansätze, bei denen eine duale Blockade des EGFR durch simultane Inkubation mit Cetuximab und Erlotinib vorgenommen wurde, ergaben synergistische Wachstumshemmungen. Ebenfalls leicht überadditive Proliferationshemmungen wurden bei simultaner Inhibition von EGFR- und IGF-1R durch Erlotinib plus AG1024 beobachtet. Ein ausgeprägter antiproliferativer Synergismus wurde zudem bei der Kombination von Erlotinib mit dem HMG-CoA Reduktase-Inhibitor Fluvastatin beobachtet.

IGF-1R-Inhibition beim kolorektalen Karzinom (vgl. 2.5.2):

Abschließend wurden erstmals die antineoplastischen Effekte einer IGF-1R-Inhibition durch den IGF-1R-TK-Inhibitor NVP-AEW514 bei Zelllinien und Primärzellkulturen kolorektaler Karzinome untersucht. Auch hier offenbarte sich, dass durch die IGF-1R-TK-Inhibition das Wachstum der IGF-1R- (sowie EGFR-) exprimierenden Zelllinien dosis- und zeitabhängig gehemmt wird. Bei den Primärzellkulturen zeigten 6 der 8 untersuchten Kulturen ein gutes Ansprechen auf die IGF-1R-Inhibition, während bei zwei Kulturen nur eine geringfügige Wachstumsinhibition beobachtet wurde. Vergleichbar zu den bereits für HCC und GEPNET gefundenen Ergebnissen (vgl. 2.1.5 und 2.3.2) waren auch bei kolorektalen Karzinomzellen Zellzyklusmodulationen (G_1/G_0 -Arrest verbunden mit der Suppression von Cylin 1D und Hochregulierung von $p21^{waf/CIP1}$ und $p27^{Kip1}$) und Apoptoseinduktion (nachgewiesen durch Caspase-3-Aktivierung, Suppression von antiapoptotischem Bcl-2 und der Induktion von

proapoptotischem BAX) an der antiproliferativen Wirkung der IGF-1R-Inhibition beteiligt. Ferner konnte auch am kolorektalen Modell bestätigt werden, dass eine IGF-1R-TK-Inhibition mit NVP-AEW541 nicht zum Auftreten von akuter bzw. unspezifischer Zytotoxizität führt. Neben einer Inaktivierung der mitogenen ERK1/2-MAPK wurde beim kolorektalen Modell auch die Dephosphorylierung der für die IGF-1R-Signaltransduktion bedeutsamen Akt/PKB (vgl. 1.2.1) nachgewiesen.

Die abschließenden Kombinationsversuchen bestätigten, dass auch bei kolorektalen Karzinomzellen synergistische antiproliferative Effekte durch eine gleichzeitige Inhibition von EGFR- und IGF-1R mittels Cetuximab und NVP-AEW541 erzielt werden konnten. Gleiches galt für Kombinationen aus NVP-AEW541 und dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Fluvastatin. Für die Kombination aus NVP-AEW541 und dem aktiven Irinotecan-Metaboliten SN-38 konnte hingegen keine eindeutige Wirkungsverstärkung belegt werden.

Im Gegensatz zu den Kombinationsversuchen bei GEPNETs (vgl. 2.3.2) führte bei kolorektalen Karzinomzellen auch die Kombination von NVP-AEW541 mit dem für die Therapie kolorektaler Karzinome bedeutsamen 5-Fluorouracil (5-FU) zu einer synergistischen Wirkungsverstärkung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Ergebnisse, die an den beiden zusätzlich untersuchten gastrointestinalen Tumormodellen erhoben wurden, die allgemeine Gültigkeit des Konzepts einer EGFR- und IGF-1R-medierten Wachstumsinhibition bei gastrointestinalen Tumoren bestätigt und erweitert werden konnte. Die Arbeiten zeigen aber auch, dass hinsichtlich der beteiligten Signalwege tumorspezifische Unterschiede auftreten, die bei der künftigen Entwicklung effektiver kombinationstherapeutischer Ansätze von Bedeutung sein können. Darüberhinaus unterstreichen die Arbeiten an Primärzellkulturen, dass zur Prädiktion des Therapieansprechens individuelle *in vitro*-Testungen eine vielversprechende Möglichkeit darstellen.