

### 3 Diskussion

#### 3.1 EGFR- und IGF-1R-Inhibitionen als innovative Therapiekonzepte für gastrointestinale Tumoren

Die antiproliferative Wirksamkeit der Rezeptorblockaden von EGFR und IGF-1R bei verschiedenen gastrointestinalen Karzinomzellen wurde anhand von Vertretern aus den Arzneistoffgruppen der Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren und der monoklonalen Antikörper überprüft. Zur Inhibition des IGF-1R wurde der in der präklinischen Testung befindliche TK-Inhibitor NVP-AEW541 eingesetzt. In Kombinationsansätzen wurden aber auch der monoklonale IGF-1R-Antikörper ab3101 oder der IGF-1R-spezifische TK-Inhibitor AG1024 verwendet. Beim EGFR wurden die von den Gesundheitsbehörden verschiedener Länder zur Therapie anderer Tumorentitäten bereits zugelassenen Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib sowie der monoklonale Antikörper Cetuximab eingesetzt.

Die IGF-1R- und EGFR-TK-Inhibitoren zeigten bei allen untersuchten Tumorentitäten im mikromolaren Konzentrationsbereich zeit- und dosisabhängige antiproliferative Effekte. Hingegen waren die wachstumsinhibitorischen Effekte der monoklonalen Antikörper Cetuximab (EGFR) bzw. ab3101 (IGF-1R) in den untersuchten Zellmodellen tendenziell schwächer ausgeprägt als die der jeweiligen TK-Inhibitoren. Dieser Befund lässt sich zum einen mit den unterschiedlichen Wirkmechanismen von TKIs und monoklonalen Antikörpern erklären. So ist beispielsweise neben der reinen Rezeptorblockade für Cetuximab eine nachfolgende Internalisierung und *down*-Regulation des EGFR beschrieben worden (Kim *et al.*, 2001). Zum anderen soll Cetuximab gezielt zytotoxische Effektorzellen des Immunsystems auf die EGFR-exprimierenden Tumorzellen lenken und auf diese Art und Weise eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität vermitteln (Carter, 2001). Außerdem supprimiert Cetuximab die Expression des Wachstumsfaktors VEGF, wodurch Angiogeneseeffekte im tumorversorgenden bzw. umgebenden Gewebe gehemmt werden. Die

Auswirkungen dieser zusätzlichen Wirkprinzipien von Antikörperbehandlungen lassen sich jedoch im *in-vitro* Modell nicht nachweisen, so dass *in-vivo* häufig deutlich stärkere antiproliferative Effekte erzielt werden als in Zellkulturmodellen entsprechender Tumore (Huang und Harari, 1999; Mendelsohn, 2001). Ein weiterer Grund für die stärkeren antiproliferativen Effekte der EGFR-TKIs gegenüber Cetuximab könnte außerdem auch in der Unterdrückung der beschriebenen Transaktivierung des EGFR-TK durch den IGF-1R bestehen (vgl. 2.1.3).

### **3.1.1 Apoptoseinduktion durch EGFR- und IGF-1R-Inhibition**

Durch die Untersuchungen konnte erstmals die apoptotische Wirkung von EGFR-Blockern bei humanen HCC- und GEPNET-Zellen gezeigt werden. EGFR-Inhibitionen führten dosisabhängig zu einer Induktion der Caspase-3, einem Schlüsselenzym des apoptotischen Programms, und zur Fragmentierung der DNA, die den Endpunkt des apoptotischen Prozesses darstellt.

Die Aktivierung der Caspase-3 kann sowohl mitochondrienabhängig als auch mitochondrienunabhängig erfolgen. Gefitinib-behandelte HCC-Zellen zeigten eine ausgeprägte Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials, die mit einer Zunahme des mitochondrialen Volumens einherging. Dieses Ergebnis belegt eine Beteiligung der Mitochondrien an dem durch EGFR-Blockade ausgelösten apoptotischen Prozess. Zahlreiche Studien zeigen, dass während der mitochondrial vermittelten Apoptose entgegen der hier festgestellten Hyperpolarisation eine Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran erfolgt (Sutter *et al.*, 2003; Zamzami *et al.*, 1996). Die Depolarisation ist häufig begleitet von einem vorübergehenden Anschwellen der mitochondrialen Matrix, und dadurch bedingtem mechanischem Reißen der äußeren Mitochondrienmembran und/oder der transienten Permeabilisierung der Membran durch die Öffnung großer proteinpermeabler Poren (*permeability transition pore*, PTP) (Sutter *et al.*, 2003; Zamzami *et al.*, 1996). Andererseits

konnte kürzlich demonstriert werden, dass mitochondrial vermittelte Apoptose auch mit einer Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran verbunden sein kann (Piret *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte hierbei gezeigt werden, dass eine apoptosespezifische Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran durch den Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden kann (Vander Heiden *et al.*, 1999). Insofern bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit letztere Befunde. Ein mechanisches Reißen der Mitochondrienmembran durch Unterbrechung der EGFR-Signaltransduktion, welches in der Regel innerhalb weniger Stunden nach Beginn der Schwellung auftritt, kann hingegen ausgeschlossen werden, da die bei den hepatozellulären Karzinomzellen beobachtete Zunahme des Mitochondrienvolumens selbst nach 24-stündiger Inkubation noch vorhanden war. Die durch EGFR-Blockade induzierte mitochondrienabhängige Apoptose beim HCC verläuft offensichtlich über bisher wenig bekannte Signalwege.

Zusätzlich konnte durch molekularbiologische Untersuchungen gezeigt werden, dass bei der mitochondrienabhängigen Apoptoseinduktion durch EGFR-Inhibition eine dosisabhängige Suppression antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bcl-2 sowie Bcl-X<sub>L</sub>) beteiligt ist. Sowohl für Bcl-2 (Takahashi *et al.*, 1999) als auch für Bcl-X<sub>L</sub> (Watanabe *et al.*, 2004) ist eine häufige Überexpression in hepatozellulären Tumoren beschrieben worden, die mit einer verschlechterten Prognose verbunden ist. Außerdem ist die Überexpression von Bcl-2 häufig mit Chemotherapeutikaresistenzen assoziiert (Pratesi *et al.*, 2001; Wang und Reed, 1998). Die Tatsache, dass eine EGFR-Blockade antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie bei gastrointestinalen Karzinomzellen supprimiert, ist somit auch in besonderem Maße für Kombinationstherapien zur Steigerung der Effektivität konventioneller Zytostatika und zur Überwindung von Chemotherapeutikaresistenzen von wichtiger Bedeutung (vgl. 3.3.1).

Für verschiedene Tumorentitäten ist die Induktion von Apoptose durch EGFR-Blockade mit Gefitinib, Erlotinib oder Cetuximab bereits beschrieben worden (Ciardiello *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1999; Moyer *et al.*, 1997), aber die zugrunde liegenden Mechanismen konnten

bislang noch nicht hinreichend aufgeklärt werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern somit neue Erkenntnisse zur Apoptoseinduktion durch anti-EGFR-basierte Arzneistoffe. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, die bei der Überprüfung der apoptoseauslösenden Wirkung von EGFR-Inhibitionen bei Ösophaguskarzinomzellen beobachtet wurden, dass die beteiligten Signalwege je nach zellulärem Kontext und Zelltyp dennoch sehr unterschiedlich sein können. So fand sich bei Ösophaguskarzinomzellen keine Beteiligung apoptotischer Signalwege an den antiproliferativen Effekten einer EGFR-Inhibition mittels Erlotinib. Dieses Ergebnis zeigt, dass von den Befunden, die an einzelnen Tumorzellmodellen gemacht wurden, keine allgemeinen Prädiktionen hinsichtlich der Wirkung bzw. Art der Wirkung bei anderen Tumorentitäten abgeleitet werden können bzw. dürfen und unterstreicht die Wichtigkeit der Überprüfung der in dieser Arbeit untersuchten gastrointestinalen Tumorentitäten.

Die IGF-1R-Blockade-induzierte Apoptose mittels NVP-AEW541 wurde erstmals an Zellmodellen hepatozellulärer, kolorektaler sowie neuroendokriner gastroenteropankreatischer Karzinome untersucht. Die dabei gefundenen Ergebnisse bestätigen und erweitern das Bild, das hinsichtlich der apoptoseinduzierenden Wirkung von IGF-1R-Inhibitionen bei nicht-gastrointestinalen Tumormodellen gewonnen wurde (Camirand und Pollak, 2004; Baserga *et al.*, 2003; LeRoith und Roberts, 2003). Vergleichbar zu der für die EGFR-Inhibition gezeigten Apoptose wurde auch durch IGF-1R-TK-Inhibition eine mitochondrien- und Caspase-3-abhängige Apoptoseauslösung beobachtet, die mit einer Verschiebung des BAX/Bcl-2-Gleichgewichts verbunden war. Das apoptosefördernde BAX wurde induziert, während die Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Survivin supprimiert wurde (vgl. 2.1.5; 2.3.2).

### 3.1.2 Zellzyklusmodulation durch EGFR- und IGF-1R-Inhibition

Im Zuge der Karzinogenese gastrointestinaler Tumoren kommt es häufig zu charakteristischen Mutationen bzw. Veränderungen im Expressions- und Aktivitätsprofil zellzyklusregulierender Proteine, die eine Aufhebung des G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunktes des Zellzyklus bewirken (Tannapfel und Wittekind, 2002). So sind Zellzykluspromotoren wie Cyclin D1 häufig überexprimiert oder überaktiv (Lu *et al.*, 2005; Schernhammer *et al.*, 2006), während Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) wie p27<sup>Kip1</sup> und p21<sup>Waf1/CIP1</sup> oft supprimiert werden (Hui *et al.*, 1998). Daher ist die Beeinflussung der Zellzyklusregulation ein vielversprechender Ansatz in der Therapie von gastrointestinalen Karzinomen.

Zellzyklusmodulierende Effekte durch EGFR- bzw. IGF-1R-Blockade sind bereits für verschiedene Tumorentitäten beschrieben worden (Harari, 2004, Mitsiades *et al.*, 2004). Die untersuchten EGFR-TK-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib sowie der IGF-1R-TK-Inhibitor NVP-AEW541 führten bei den untersuchten gastrointestinalen Karzinomzellmodellen zu einem Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus, verbunden mit einer gleichzeitigen Abnahme des Anteils der Zellen in der S-Phase. Die bei HCC-Zellen untersuchte EGFR-Blockade mit Cetuximab ergab größtenteils analoge Resultate.

Der beobachtete Zellzyklusarrest durch EGFR-Blockade mittels der Tyrosinkinaseinhibitoren ging einher mit einer starken Überexpression der Zellzyklusinhibitoren p27<sup>Kip1</sup> und p21<sup>Waf1/CIP1</sup>. Die Cetuximabbehandlung führte zusätzlich zur Suppression des Zellzykluspromoters Cyclin D1. Bei IGF-1R-TK-Inhibition wurde analoge Ergebnisse hinsichtlich der Überexpression von p27<sup>Kip1</sup> und p21<sup>Waf1/CIP1</sup> sowie der Suppression von Cyclin D1 beobachtet. Zusätzlich zum ausgeprägten G<sub>1</sub>-Arrest konnte unter EGFR-Inhibition zumindest bei einem Teil der untersuchten Zellmodelle auch ein leicht zunehmender Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase beobachtet werden. Dies lässt auf einen zusätzlichen, zumindest partiellen, G<sub>2</sub>/M-Arrest schließen. Ein derartiger G<sub>2</sub>/M-Arrest ließe sich zum einen mit der beobachteten Überexpression des *growth arrest and DNA damage inducible gene 45* (gadd45) in Folge der

EGFR-Blockade erklären, da die zellzyklusarretierende Wirkung von gadd45 bereits für andere Tumorentitäten beschrieben werden konnte (Sun *et al.*, 2003). Zum anderen könnte der G<sub>2</sub>/M-Arrest auch durch die in den Versuchen zur differentiellen Genexpression durch EGFR-Inhibition gefundene Überexpression von Cyclin B1 bedingt sein. So führt eine Expressionszunahme von Cyclin B1 zum Eintritt der Zelle in die G<sub>2</sub>/M-Phase. Die anschließende Abnahme der Proteinmenge von Cyclin B1 hingegen ist essentiell für das Verlassen der Mitosephase (Rieder und Khodjakov, 1997). Eine dauerhafte Überexpression von Cyclin B1 führt folglich zum Arrest der Zelle in der M-Phase des Zellzyklus.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Blockade von EGFR bzw. IGF-1R den tumorspezifischen Veränderungen in der Expression und Aktivität zellzyklusregulierender Proteine offenbar entgegengewirkt werden kann, was die untersuchten Inhibitoren für einen Einsatz bei gastrointestinalen Karzinomen besonders qualifiziert. Darüber hinaus ergeben sich aus den gefundenen Zellzyklusarretierungen auch wichtige Anhaltspunkte für die geeignete Wahl von Kombinationssubstanzen, sofern deren Wirkung abhängig ist von einer bestimmten Zellzyklusphase der Zielzelle.

### **3.1.3 Zytotoxizitätseffekte durch EGFR- und IGF-1R-Inhibition**

Unspezifische Zytotoxizität chemotherapeutischer Substanzen führt häufig zu Nekrose und damit verbunden zu unerwünschten immunologischen Reaktionen, weil die zytotoxisch geschädigten Zellen durch den Verlust ihrer Plasmamembranintegrität osmotisch bedingt anschwellen bzw. zerplatzen und so ihren Inhalt in den Interzellularraum entleeren.

Um die Wirksamkeit der Inhibition von EGFR- und IGF-1R nachzuweisen und um die Beteiligung unspezifischer Zellschädigungen an den beobachteten antiproliferativen Effekten auszuschließen, wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass zytotoxische Effekte weder bei der Inhibition des EGFR durch Cetuximab,

Gefitinib oder Erlotinib eine bedeutsame Rolle spielten noch bei der Inhibition des IGF-1R durch NVP-AEW541.

Diese Ergebnisse sind insofern von großer Bedeutung, da durch das Ausbleiben zytotoxischer Reaktionen die Spezifität der Proliferationshemmung mit TK-Inhibitoren oder Antikörpern unterstrichen wird. Sie deuten außerdem auf eine in dieser Hinsicht nebenwirkungsarmen und damit patientenverträglichen Art der Behandlung hin.

### **3.2 Regulation mitogener Signalwege durch EGFR- und IGF-1R-Inhibition**

#### **3.2.1 MAP-Kinase-Regulation**

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind wichtige Regulatoren von Apoptose, Proliferation und Differenzierung (Rubinfeld und Seger, 2005). Bei den Untersuchungen zu den Effekten von EGFR- und IGF-1R-Inhibitionen bei den verschiedenen gastrointestinalen Karzinomzellmodellen wurde auch die Aktivierung der ERK1/2 (p44/p42MAPK), einem Schlüsselprotein des Ras-Raf-MAP-Kinasewegs, untersucht. ERK1/2 transloziert nach seiner Aktivierung in den Zellkern und ist dort an der Regulation der Genexpression beteiligt (vgl. 1.3.1). So wird durch den aktivierten MAP-Kinase-Weg unter anderem die Expression des Zellzykluspromoters Cyclin D1 gefördert (Lavoie *et al.*, 1996), während die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21<sup>Waf1/CIP1</sup> (McMillan *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004) und p27<sup>Kip1</sup> (Cheng *et al.*, 1998) supprimiert wird. Ferner führt Inhibition der ERK1/2 zur Expressionszunahme von gadd45 (Kultz *et al.*, 1998), was durch die cDNA-Expressionsstudien an EGFR-inhibierten HCC-Zellen bestätigt werden konnte. Gadd45 interagiert mit p21<sup>Waf1/CIP1</sup> bei der Induktion eines Zellzyklusarrests in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase (Vairapandi *et al.*, 1996). Die Aktivierung verschiedener zytosolischer Caspasen wird durch den ERK1/2-Signalweg supprimiert (Erhardt *et al.*, 1999), ebenso die Expression verschiedener antiapoptotischer Faktoren (Rubinfeld und Seger, 2005).

Es konnte am Beispiel von hepatozellulären Karzinomzellen gezeigt werden, dass die Stimulation mit EGF zur Phosphorylierung des EGFR mit nachgeschalteter Phosphorylierung der ERK1/2 führt (vgl. 2.1.3). Umgekehrt konnte der mitogene MAP-Kinaseweg durch EGFR-Blockade mit Gefitinib, Erlotinib oder Cetuximab unterbrochen werden, wodurch die Effekte der EGFR-Blockade hinsichtlich der Induktion von Apoptose bzw. der Arretierung des Zellzyklus erklärt werden können.

Allerdings lag die zur vollständigen Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung notwendige Blockerkonzentration dabei ca. 100-fach über der zur vollständigen Hemmung der EGFR-Aktivierung erforderlichen Konzentration. Diese Beobachtung macht deutlich, dass die Ras-Raf-MAPK-Signalkaskade nicht exklusiv vom EGFR, sondern auch von anderen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren aktiviert wird. Am hepatozellulären Model wurde entsprechend gezeigt, dass der MAP-Kinase-Weg auch durch IGF-1R aktiviert wird. Aufgrund der Komplexität der zellulären Signalwege erscheint folglich ein simultaner Angriff an mehreren Punkten dieses Netzwerks sinnvoll (vgl. 3.3.3).

### **3.2.2 Regulation des Jak-STAT-Signalwegs**

Der Jak-STAT-Signalweg ist ebenso wie der Ras-Raf-MAPK-Weg mit Zellproliferation und Zellzyklusprogression assoziiert (vgl. 1.3.2; Bromberg und Darnell, 2000). Insbesondere für STAT3 und STAT5 sind pro-proliferative Effekte und Apoptoseinhibition beschrieben (Bowman *et al.*, 2000). Die Rolle von STAT1 bei Tumorentstehung und -progression ist dagegen umstritten (Bowman *et al.*, 2000; Bromberg *et al.*, 1996). Die Effekte einer EGFR-Inhibition auf den Jak-STAT-Signalweg wurden bisher für keine Tumorentität untersucht. Am beispielhaft untersuchten hepatozellulären Karzinomzellmodell konnte die Expression von STAT1, STAT3 und STAT5 gezeigt werden. Durch gezielte Aktivierung des EGFR mittels EGF wurde eine Aktivierung von STAT1 und STAT3 induziert, jedoch nicht von STAT5. Umgekehrt konnte durch EGFR-Blockade die EGF-vermittelte STAT-Aktivierung



dosisabhängig unterdrückt werden. Der mitogene Jak-STAT-Signalweg in HCC-Zellen wird folglich durch EGFR-Inhibition unterbrochen. Allerdings waren analog zur Inhibition des Ras-Raf-MAP-Kinaseswegs durch EGFR-Blockade hierzu höhere Inhibitorkonzentrationen notwendig als zur vollständigen Hemmung der EGFR-Aktivierung. Dies deutet auch für den JAK-STAT-Signalweg auf die Beteiligung weiterer Rezeptoren wie den IGF-1R hin bzw. zeigt, dass EGFR-Transaktivierungsvorgänge eine Rolle spielen.

Ähnlich wie der MAP-Kinasesweg fördert aktiviertes STAT3 die Apoptoseinhibition durch Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> und die Zellzyklusprogression über die Induktion der Cyclin D1-Expression (Calo *et al.*, 2003). Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass STAT3 die verstärkte Expression des EGFR induzieren kann und über erhöhte Expression der Liganden des EGFR die Aktivität des Rezeptors steigert (Garcia *et al.*, 2001). Durch die Unterbrechung der STAT3-induzierten Signalwege mittels EGFR-Blockade sollten somit nicht nur Apoptose und Zellzyklusarrest induziert werden, sondern zusätzlich die Aktivität des Rezeptors vermindert werden.

### **3.3 Kombinationstherapeutische Ansätze**

#### **3.3.1 Modulation der antiproliferativen Effekte konventioneller Chemotherapeutika durch simultane EGFR- bzw. IGF-1R-Inhibition**

In dieser Arbeit wurden Kombinationen aus IGF-1R- bzw. EGFR-Inhibitoren mit verschiedenen Chemotherapeutika untersucht, die in der palliativen Therapie der jeweiligen gastrointestinalen Karzinome bereits etabliert sind oder vielversprechende Kandidaten für künftige Chemotherapieansätze darstellen.

Beim hepatozellulären Karzinom wurden dabei Kombinationssubstanzen ausgewählt, die bei der transarteriellen Chemoembolisation zum Einsatz kommen, da hier eine systemische Chemotherapie aufgrund nicht vertretbarer Toxizitäten bei den in der Regel leberinsuffizienten HCC-Patienten meist nicht angezeigt ist. Untersucht wurden vier

Chemotherapeutika mit verschiedenen Wirkungsprinzipien: das DNA-quervernetzende Cisplatin, der Mikrotubuli-Inhibitor Docetaxel, der aktive Metabolit des Topoisomerase-I-Inhibitors Irinotecan SN-38 sowie das zytostatisch wirksame Antibiotikum Doxorubicin, welches über Interkalation in die DNA und RNA das Tumorwachstum hemmt. Unabhängig von der unterschiedlichen Pharmakodynamik der Zytostatika resultierten fast alle Kombinationen in additiven bzw. synergistischen antineoplastischen Effekten. Die HCC-Zelllinien zeigten sich zwar gegenüber einer Monobehandlung mit Cisplatin weitgehend resistent, sprachen aber dennoch auf die EGFR-Inhibition mit Erlotinib an. Diese Beobachtung könnte den Einsatz von Erlotinib für die Zweit- bzw. Drittlinietherapie nach Zytostatikatherapieversagen interessant machen.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass bei den antiproliferativ synergistischen Kombinationen die Wirkungsverstärkung vor allem auf einer deutlichen Erhöhung der Apoptoseinduktion beruhte. Dies könnte unter anderem an den mittels *Western Blot* und *cDNA-Array* gezeigten molekularen Effekten der EGFR-Inhibition liegen, dass nämlich antiapoptotische Faktoren wie Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> oder das jun-D-Protoonkogen unterdrückt werden, während proapoptotische Faktoren wie Caspasen oder gadd45 verstärkt exprimiert bzw. aktiviert werden.

Aber auch Modifikationen des Zellzyklus als Ursache für die synergistische Wirkung von Kombinationsansätzen konnten wie im Falle von Docetaxel und Erlotinib festgestellt werden. Möglicherweise spielt hier die Überexpression des für den S-G<sub>2</sub>/M-Übergang wichtigen Cyclin B1 eine Rolle, wodurch es zu einem partiellen Arrest des Zellzyklus in der Mitosephase kommt. Da Docetaxel seine Wirkung selektiv in dieser Phase entfaltet, könnte dies eine plausible Erklärung für die überadditive Wirkung der Kombination sein.

Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend fand sich auch bei Kombinationen aus dem IGF-1R-TK-Inhibitor NVP-AEW541 mit Doxorubicin eine additive Wirkungsverstärkung bei HCC- und GEPNET-Zellen sowie zusätzlich für NVP-AEW541 und Docetaxel bei HCC-Zellen. Da

in Bezug auf die Regulation der apoptose- und zellzyklusrelevanten Proteine eine breite Übereinstimmung zwischen IGF-1R- und EGFR-TK-Blockaden festgestellt wurde, ist es wahrscheinlich, dass angestellten Interpretationen auch für die IGF-1R-basierten Kombinationen Gültigkeit besitzen.

Passend zu den hier vorgestellten Kombinationsversuchen konnte bereits an anderen *in-vitro*-Tumormodellen eine Erhöhung der Effektivität konventioneller Zytostatika durch Kombination mit EGFR- bzw. IGF-1R-Blockern gezeigt werden (Grunwald und Hidalgo, 2003; Harari, 2004; Warshamana-Greene *et al.*, 2005). Die *in-vitro*-Ergebnisse konnten in klinischen Studien auch schon bestätigt werden: Für Cetuximab liegen z.B. Phase-III-Studien zum Einsatz des monoklonalen Antikörpers in Kombination mit Cisplatin bei Hals- und Kopftumoren (Burtneß, 2005) oder mit Irinotecan beim Kolonkarzinom (Cunningham *et al.*, 2004) vor, in denen die Überlebenszeit der Patienten durch die Kombination im Vergleich zur alleinigen Zytostatikabehandlung signifikant erhöht werden konnte. Erlotinib zeigte in Phase-III-Studien in Kombination mit Gemcitabin beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom (Moore *et al.*, 2005) einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur Zytostatika-Monotherapie. Allerdings zeigen die Ergebnisse der groß angelegten Phase-III-INTACT-Studien, dass Kombinationen aus Gefitinib/Gemcitabin/Cisplatin (INTACT-1; <sup>a</sup>Giaccone *et al.*, 2004; <sup>b</sup>Giaccone *et al.*, 2004) bzw. Gefitinib/Paclitaxel/Carboplatin (INTACT-2; (Herbst *et al.*, 2004) zu keinem Überlebensvorteil im Vergleich zur jeweiligen Zytostatikakombination ohne Gefitinib führten. Ähnliches wurde in den TALENT bzw. TRIBUTE-Studien hinsichtlich Erlotinib-basierter Ansätze festgestellt (Herbst *et al.*, 2005).

Nicht zuletzt wegen der positiv verlaufenen Studien hält man jedoch an dem vielversprechenden Ansatz zur Kombination von EGFR-Blockade mit konventionellen Zytostatika fest. Verschiedene Untersuchungen haben auch gezeigt, dass sich die Toxizitäten von Zytostatika und anti-EGFR-Therapie nicht verstärken oder überlappen (Kim *et al.*, 2001). Daraus ergeben sich zusätzliche Möglichkeiten einer Steigerung der Effektivität einer

Zytostatikatherapie ohne Erhöhung der Dosis und der damit verbundenen (häufig dosislimitierenden) unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Immunsuppression, Anämie, Diarrhoe und Emesis. Zur Zeit laufen für Cetuximab, Gefitinib und Erlotinib mehr als 100 klinische Studien, in denen unterschiedliche Behandlungsschemata mit Kombinationen aus Zytostatika und EGFR-Blockade an den verschiedensten Tumorentitäten überprüft werden (vgl. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Kombinationstherapien bieten sich auch unter dem Gesichtspunkt der Überwindung von Resistenzerscheinungen an, die bei Monotherapien häufig zu beobachten sind. Zu den potenziellen Mechanismen, die an Ausbildung von Resistenzen beteiligt sind, gehören die Aktivierung der mitogenen Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskaden sowie eine dauerhafte Erhöhung von Cholesterinspiegeln in Tumorzellen (Banker *et al.*, 2004). Beide Mechanismen stehen unter der Kontrolle durch Isoprenoide, deren Produktion durch das Enzym HMG-CoAR (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A Reduktase) katalysiert wird (Jakobisiak und Golab, 2003). HMG-CoAR könnte daher ein interessantes Zielprotein für neuartige Antitumorthérapien sowie für Kombinationsansätze sein. Es wurden daher zusätzlich auch Kombinationen aus EGFR- oder IGF-1R-Inhibitoren mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Fluvastatin an kolorektalen, neuroendokrinen, ösophagealen und hepatozellulären Karzinomzellen getestet. Die antiproliferative Potenz von Fluvastatin, das in der Therapie von Hypercholesterolämie bereits seit langem etabliert ist, konnte bereits in einer vorausgegangenen Arbeit für das hepatozelluläre Karzinom gezeigt werden (Sutter *et al.*, 2004). Für die anderen gastrointestinalen Tumorentitäten wurde die dosisabhängige, antiproliferative Wirkung von Fluvastatin in den hier vorgestellten Arbeiten ebenfalls belegt (vgl. 2.3.2, 2.5.1 und 2.5.2). Kombinationsansätze aus EGFR- bzw. IGF-1R-Inhibitoren und Fluvastatin führten bei allen vier gastrointestinalen Tumormodellen zu (über-)additiven Proliferationshemmungen. Die zugrunde liegenden Mechanismen der beobachteten Wirkungsverstärkung wurden allerdings bislang noch nicht detailliert untersucht und werden Teil künftiger

Untersuchungen sein. Aufgrund der langjährigen Erfahrungen mit Fluvastatin und dem damit verbundenen Wissen um seine klinische Sicherheit ist der Ansatz, Statine auch für innovative Antitumorthérapien bzw. neuartige kombinationstherapeutische Ansätze ins Kalkül zu ziehen, sehr vielversprechend und sollte weiter verfolgt werden.

Insgesamt stellen die in dieser Arbeit vorgestellten *in-vitro*-Ergebnisse zur Kombination von EGFR- bzw. IGF-1R-Blockaden mit konventionellen Zytostatika oder mit dem HMG-CoA Reduktase-Inhibitor Fluvastatin interessante Ansatzpunkte für neue Arzneistoffkombinationen zur Behandlung gastrointestinaler Karzinome dar und sollten in klinischen Studien überprüft werden.

### 3.3.2 Dualer Angriff am EGFR

Am Beispiel des hepatozellulären Karzinoms wurde untersucht, ob die simultane Blockade der extrazellulären, Liganden-bindenden Domäne und der intrazellulären Tyrosinkinase des EGFR eine geeignete Methode darstellt, die Effekte einer anti-EGFR-Monotherapie zu erhöhen. Die gleichzeitige Behandlung von HCC-Zellen mit Cetuximab und Erlotinib resultierte dabei in einer Addition der wachstumshemmenden Eigenschaften der Einzelsubstanzen und war ihr ihrer antiproliferativen Potenz den Effekten der jeweiligen Monoapplikationen überlegen. Die Ergebnisse bestätigen Untersuchungen, die an anderen Tumormodellen mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt wurden (Huang *et al.*, 2004; Matar *et al.*, 2004).

Die Verstärkung der antiproliferativen Effekte durch Kombinationen aus monoklonalen Antikörpern und TK-Inhibitoren könnte verschiedene Gründe haben: Die Arzneistoffe inhibieren ihr *Target* nicht vollständig. Bei Gefitinib, Erlotinib und Cetuximab handelt es sich um reversible kompetitive (Rezeptor-)Antagonisten. Gefitinib und Erlotinib konkurrieren mit ATP um die ATP-Bindungsstelle an der intrazellulären EGFR-Tyrosinkinase, während Cetuximab mit den endogenen Liganden (EGF, TGF- $\alpha$ , etc.) um die extrazelluläre

Ligandenbindungsstelle konkurriert. Bei gleichbleibender Konzentration der jeweiligen Konkurrenten steigt somit durch den dualen Angriff am Rezeptor der relative Anteil an inhibiertem Rezeptor und somit die Effektivität der dadurch vermittelten Wachstumsinhibition.

Die dem EGFR nachgeschalteten Signalwege zeigen eine große Komplexität (Yarden und Sliwkowski, 2001). Aufgrund unterschiedlicher Angriffspunkte beeinflussen TK-Inhibitoren und monoklonale Antikörper diese Wege nicht exakt gleich. Bei simultaner Behandlung sollten sich somit die Effekte der Einzelsubstanzen wie z.B. Apoptoseinduktion, Zellzyklusarrest oder Hemmung der Transaktivierung der EGFR-Tyrosinkinase durch andere (Wachstums-)Rezeptoren überlagern und verstärken. Die beobachtete nahezu additive Wachstumsinhibition bestätigt diese Überlegungen.

### **3.3.3 Simultane Inhibition von EGFR und IGF-1R**

Der IGF-1R wird ähnlich wie der EGFR mit der Karzinogenese, dem Wachstum und dem Überleben von Tumoren in Verbindung gebracht (Baserga, 1999; Rubin und Baserga, 1995). So zeigen auch gastrointestinale Karzinome häufig eine starke und für das zelluläre Wachstumsverhalten bedeutsame Expression des IGF-1R (Scharf *et al.*, 1998; von Wichert *et al.*, 2000). Aufgrund ähnlicher mitogener Effekte, die teilweise über die gleichen Signalwegketten vermittelt werden, liegt die Vermutung nahe, dass EGFR und IGF-1R miteinander im Sinne eines „*cross-talks*“ interagieren können. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation von HCC-Zellen mit IGF-1 den MAP-Kinaseweg aktiviert, aber auch zur Phosphorylierung des EGFR führt. Über bislang nicht vollständig identifizierte Signalwege kann die Tyrosinkinase des EGFR folglich durch den IGF-1R transaktiviert werden (Gilmore *et al.*, 2002). Desweiteren konnte die IGF-1-vermittelte ERK1/2-Aktivierung durch EGFR-TK-Inhibition teilweise unterdrückt werden. Dieses Ergebnis kann die in den Wachstumsversuchen beobachtete stärkere antiproliferative

Aktivität der TKIs im Vergleich zur EGFR-Blockade mittels monoklonalem Antikörper erklären: Cetuximab kann als Inhibitor der Ligandenbindung keinen Einfluss auf Transaktivierungsvorgänge nehmen, während Gefitinib und Erlotinib durch direkten Angriff an der intrazellulären Domäne des EGFR sowohl die intrinsische TK-Aktivität als auch die durch den „*cross-talk*“ vermittelte Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase unterdrücken.

Die enge Verknüpfung der EGFR- und IGF-1R-vermittelten Signaltransduktion wird auch als die mögliche Ursache für Resistenzen gegenüber anti-EGFR-basierten Therapieansätzen diskutiert. So beschreiben Chakravarti und Mitarbeiter, dass Glioblastomzellen durch die Überexpression des IGF-1R und der damit verbundenen Aktivitätserhöhung der nachgeschalteten mitogenen Signalwege in der Lage sind, Inhibitionen des EGFR zu kompensieren (Chakravarti *et al.*, 2002).

Die simultane Blockade von EGFR und IGF-1R könnte demnach zu einer antiproliferativen Wirkungsverstärkung führen. Dazu wurden in dieser Arbeit entsprechende Untersuchungen zur simultanen Inhibition von IGF-1R und EGFR am Beispiel hepatozellulärer Karzinomzellen durchgeführt. In den untersuchten Zellmodellen waren die Kombinationen dabei deutlich wirksamer als die Monobehandlung mit den jeweiligen Arzneistoffen. Vermutlich ist der beobachtete antiproliferative Synergismus das Ergebnis der simultanen Unterdrückung des MAP-Kinase-Wegs sowie der kompensatorischen Mechanismen, die im Zuge des „*Rezeptor-cross-talks*“ von EGFR- und IGF-1R auftreten. Insofern bestätigen die Ergebnisse aus dieser Arbeit die Beobachtungen, die von Chakravarti *et al.* für das Glioblastom gemacht wurden. Insgesamt stellt die simultane Blockade von EGFR und IGF-1R einen höchst interessanten Ansatzpunkt für die künftige Entwicklung innovativer Therapieschemata für gastrointestinale Karzinome dar.

#### 4. Zusammenfassung und Fazit

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