

DIE INHIBITION DES EPIDERMALEN WACHSTUMSFAKTORREZEPTORS ALS INNOVATIVER THERAPIEANSATZ BEI GASTROINTESTINALEN TUMOREN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alexander Hüther

aus Northeim

November 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinz H. Pertz
 2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig
- Disputation am 22.12.2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)	1
1.1.1	Die Leber	1
1.1.2	Charakteristika des hepatozellulären Karzinoms	2
1.1.3	Therapie des HCC	3
1.1.3.1	Transarterielle Chemoembolisation	4
1.1.3.2	Perkutane Ethanolinjektion	4
1.1.3.3	Radiofrequenz-Thermoablation	4
1.1.3.4	Systemisch-medikamentöse Therapie	4
1.1.3.5	Strahlentherapie/ Radioiod-Lipiodol-Therapie	5
1.2	Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR	6
1.2.1	Wachstumsfaktoren	6
1.2.2	Charakteristika des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR	6
1.2.3	Signaltransduktion des EGFR	8
1.2.3.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	8
1.2.3.2	Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)	8
1.2.4	Die Bedeutung des EGFR in der Onkologie	9
1.2.5	Therapeutische Beeinflussung von EGF-Rezeptoren	10
1.2.5.1	Tyrosinkinaseinhibitoren	10
1.2.5.2	Monoklonale Antikörper	11
1.3	Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktorrezeptor-1 (IGF-1R)	12
1.4	Apoptose: Der programmierte Zelltod	13
1.5	Der Zellzyklus	14
1.6	Ziel der Arbeit	16

2	MATERIAL	17
2.1	Arzneistoffe	17
2.2	Antikörper.....	17
2.3	PCR-Primer	18
2.4	Zellkulturmedien, Zusätze und Chemikalien	18
2.4.1	Zellkulturmedien.....	18
2.4.1.1	Medium für HepG2, Huh-7, Kyse-30, Kyse-70 und Kyse-140	18
2.4.1.2	Medium für Primärzellkulturen.....	18
2.4.2	Chemikalien und Lösungen	19
2.5	Kits.....	19
3	METHODEN.....	20
3.1	Zellbiologische Methoden	20
3.1.1	Zellmodelle	20
3.1.1.1	Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms.....	20
3.1.1.2	Zelllinien des Ösophaguskarzinoms	20
3.1.1.3	Biopsate von Ösophaguskarzinomen	20
3.1.2	Anzucht von Primärzellkulturen aus Biopsaten von Ösophaguskarzinomen.....	21
3.1.3	Passagieren der Zelllinien	21
3.1.4	Proliferationsstudien	21
3.1.4.1	Kristallviolettmethode.....	21
3.1.4.2	Trypanblau-Methode.....	22
3.1.5	Zytotoxizitätsuntersuchungen	23
3.1.6	Apoptoseuntersuchungen.....	24
3.1.6.1	Untersuchung mitochondrialer Veränderungen	24
3.1.6.2	Caspase-3-Aktivitätsbestimmung	24
3.1.6.3	Nachweis der DNA-Fragmentation.....	25
3.1.7	Zellzyklusanalysen.....	26

3.2	Molekularbiologische Methoden.....	26
3.2.1	Ribonuklease (RNase)-freies Arbeiten	26
3.2.2	Präparation von Gesamt-RNA	26
3.2.3	Präparation von poly-A+-RNA.....	27
3.2.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	27
3.2.5	Synthese von cDNA.....	28
3.2.6	Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription von RNA (RT-PCR)	28
3.2.7	Experimente mit Atlas Human Apoptosis cDNA-Arrays.....	29
3.2.7.1	Hybridisierung der cDNA-Arrays mit cDNA-Sonden.....	29
3.2.7.2	Auswertung der cDNA-Arrays	30
3.3	Proteinchemische Methoden	31
3.3.1	Immunzytochemischer Nachweis der Wachstumsfaktorrezeptoren.....	31
3.3.2	Gewinnung von Proteinlysaten	31
3.3.3	Proteinbestimmung	32
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	32
3.3.5	Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	33
3.3.6	Immundetektion immobilisierter Proteine	33
3.3.7	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität.....	34
3.4	Statistik.....	34

4	ERGEBNISSE	35
4.1	EGFR-Expression in humanen hepatozellulären Karzinomen	35
4.1.1	Nachweis von mRNA des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR).....	35
4.1.2	Untersuchung der Expression der EGFR-Mutante EGFRvIII.....	35
4.1.3	Nachweis des EGFR-Proteins.....	36
4.2	Wachstumsstudien an HCC-Zellkulturmodellen	36
4.2.1	Hemmung der Proliferation von HCC-Zellen durch EGFR-TK-Inhibition.....	36
4.2.2	Hemmung der Proliferation von HCC-Zellen durch den monoklonalen EGFR Antikörper Cetuximab	37
4.3	Bestimmung der Zytotoxizität von EGFR-Blockern	38
4.4	Apoptoseinduktion durch EGFR-Blockade	40
4.4.1	Mitochondriale Veränderungen	40
4.4.2	Caspase-3-Aktivierung	41
4.4.3	DNA-Fragmentation	43
4.4.4	Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie.....	44
4.5	Zellzyklusuntersuchungen	45
4.5.1	Modulation des Zellzyklus durch EGFR-Blockade.....	45
4.5.2	Veränderungen im Expressionsprofil von Zellzyklusregulatoren durch EGFR Blockade	47
4.6	Mitogene Signaltransduktion	48
4.6.1	Ras-Raf-MAP-Kinaseweg	48
4.6.1.1	EGF-induzierte ERK1/2-Aktivierung in HCC-Zellen	48
4.6.1.2	Modulation extrazellulär regulierter Kinasen durch EGFR-Blockade....	48
4.6.2	Jak-STAT-Signalweg.....	50
4.6.2.1	EGF-induzierte STAT-Aktivierung in HCC-Zellen	50
4.6.2.2	Modulation der STAT-Aktivierung durch EGFR-Blockade.....	51

4.7	Transkriptionelle Effekte der EGFR-Blockade.....	51
4.7.1	EGFR-Blockade induziert differentielle Genexpression	51
4.8	Steigerung der Effektivität konventioneller Chemotherapeutika durch EGFR Blockade	54
4.8.1	Wachstumshemmung durch TKI in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika	54
4.8.2	Modulation der Zytostatika-induzierten Apoptose durch Erlotinib.....	55
4.8.3	Modulation der Zytostatika-induzierten Zellzyklusmodifikationen durch Erlotinib	57
4.9	Simultane Blockade von EGFR und IGF-1R als neuartiger Ansatz zur Therapie des HCC	59
4.9.1	Nachweis des IGF-1R in HepG2- und Huh-7-Zellen	59
4.9.2	IGF-1 (Insulin-like growth factor)-induzierte Modulation des MAP-Kinase-Weges und Kreuzaktivierung des EGFR.....	59
4.9.3	Modulation der EGF/ IGF-1-induzierten EGFR-Aktivierung durch Erlotinib	60
4.9.4	Wachstumshemmung durch simultane Blockade von EGFR und IGF-1R.....	61
4.10	Wachstumshemmung durch duale Blockade des EGF-Rezeptors	63
4.11	Ösophaguskarzinom.....	64
4.11.1	EGFR- und IGF-1R-Expression in humanen Ösophaguskarzinomen.....	64
4.11.2	Hemmung der Proliferation von Ösophaguskarzinomzellen durch EGFR-Inhibition	65
4.11.2.1	Hemmung der Proliferation von Ösophaguskarzinomzelllinien durch Erlotinib	65
4.11.2.2	Hemmung der Proliferation primärer Ösophaguskarzinomzellen durch Erlotinib	66

4.11.3	Keine Apoptoseinduktion in Ösophaguskarzinomzellen durch Erlotinib ...	67
4.11.4	Zellzyklusuntersuchungen an Ösophaguskarzinomzellen	69
4.11.5	Erlotinib-induzierte Hemmung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und des MAP-Kinaseweges in Ösophaguskarzinomzellen	70
4.11.6	Simultane Blockade von EGFR und IGF-1R in Ösophaguskarzinomzellen	71
4.11.7	Wachstumshemmung von Ösophaguskarzinomzellen durch duale Blockade des EGFR	72
5	DISKUSSION.....	73
5.1	EGFR-Inhibition als innovatives Therapiekonzept für hepatozelluläre Karzinome.....	74
5.1.1	Apoptoseinduktion durch EGFR-Inhibition	75
5.1.2	Zellzyklusmodulation durch EGFR-Inhibition	76
5.1.3	Regulation mitogener Signalwege durch EGFR-Inhibition.....	78
5.1.3.1	MAP-Kinase-Regulation durch EGFR-Inhibition	78
5.1.3.2	Regulation des Jak-STAT-Signalweges durch EGFR-Inhibition	79
5.1.4	Transkriptionelle Effekte der EGFR-Inhibition.....	80
5.2	Kombinationstherapeutische Ansätze	84
5.2.1	EGFR-Inhibition und konventionelle Chemotherapeutika	84
5.2.2	EGFR und IGF-1R	85
5.2.3	Dualer Angriff am EGFR.....	87
5.3	EGFR-Tyrosinkinaseinhibition als innovatives Therapieprinzip beim Ösophaguskarzinom	88

6	ZUSAMMENFASSUNG	90
7	SUMMARY	92
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	94
9	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	108
9.1	Originalarbeiten	108
9.2	Eingereicht zur Veröffentlichung	109
9.3	Vorträge	109
9.4	Kurzveröffentlichungen und Posterabstracts.....	110
10	DANKSAGUNG.....	112
11	LEBENS LAUF	113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\Delta\Psi_M$	mitochondriales Membranpotential
[A.U.]	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
°C	Grad Celcius
Ac-DEVD-AMC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-methylcumarin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AFP	α -Fetoprotein
AG1024	3-Bromo-5- <i>t</i> -butyl-4-hydroxy-benzylidenmalonitril
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2-associated killer protein</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma like protein</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CBF	Charité – Campus Benjamin Franklin
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
gadd	<i>growth arrest and DNA-damage inducible</i> , durch Wachstumsarrest und DNA-Schädigung induzierbar
HBs	Hepatitis B <i>surface</i> (Antigen)
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IGF-1R	insulinähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor-1
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IgG	Immunglobulin G

INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
JAK	Janus-Kinase
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid
JCRB	<i>Japanese Cancer Research Resources Bank</i>
kD	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
Mab	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-) Ribonukleinsäure
n	Anzahl, Zahl
Nonidet P-40	Octylphenolpolyethylenglycolether
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PTP	<i>permeability transition pore</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R ²	Bestimmtheitsmaß der linearen Regression
RFTA	Radiofrequenz-Thermoablation
RIPA	<i>radio-immunoprecipitation-assay</i> -Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error mean</i> , Standardfehler
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEN	Tris-EDTA-NaCl-Puffer
TGF- α	<i>tumor growth factor-α</i>
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan
U	<i>unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolett
V _M	mitochondriales Volumen