

1 EINLEITUNG

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

1.1.1 Die Leber

Der Leber (**Abb. 1-1**) kommt eine zentrale Bedeutung im menschlichen Stoffwechsel zu. Sie ist mit einem Gewicht von 1,4 bis 1,8 kg das schwerste Organ des Körpers. Die Leber liegt im rechten Oberbauch unmittelbar unter dem Zwerchfell und wird durch die unteren Rippen geschützt. Sie gliedert sich in einen rechten und einen linken Leberlappen, wobei der rechte wesentlich größer ist und nahezu den gesamten rechten oberen Bauchraum ausfüllt.

Die Leber ist wesentlich an der Synthese, Speicherung, Metabolisierung und Ausscheidung körpereigener und -fremder Substanzen beteiligt. Die Aufgaben der Leber umfassen:

- die Überführung von Fremdstoffen in wasserlösliche Derivate;
- die Phagozytose von Bakterien sowie körpereigener und körperfremder Zellbestandteile;
- die Regulation des Säure-Base-Haushaltes;
- den Abbau und die Ausscheidung des Blutfarbstoffs in Form von Bilirubin;
- die Synthese der Gerinnungsfaktoren;
- die Blutbildung beim Fetus bis zum 7. Schwangerschaftsmonat;
- die Bildung eines Aminosäurepools für die Proteinbiosynthese;
- die Bildung von Harnstoff als "entgifteten Ammoniak" und wasserlösliches Endprodukt des Aminosäurestoffwechsels;
- den Aufbau des Speicherkohlenhydrats Glykogen durch Gluconeogenese aus glukoplastischen Aminosäuren oder durch Abbau von Kohlenhydraten;
- die Synthese und den Abbau der Lipoproteine des Fettstoffwechsels;
- die Synthese von Cholesterol und der hieraus abgeleiteten Gallensäuren,
- sowie die Regulation des Spurenelement- und Vitaminstoffwechsels.

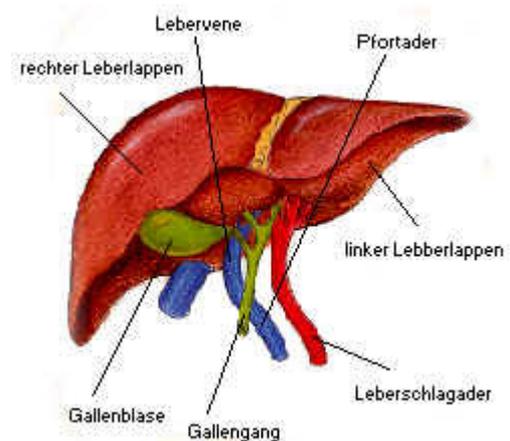


Abbildung 1-1: Die Leber des Menschen.

Die Durchblutung der Leber erfolgt über zwei Gefäßsysteme, zum einen das normale arteriovenöse Gefäßnetz, zum anderen das sogenannte Pfortadersystem. Über das Pfortadersystem muss das aus den inneren Organen stammende, nährstoffreiche Blut zunächst das Lebergewebe passieren, bevor es wieder über die Lebervene in den Kreislauf gelangt.

1.1.2 Charakteristika des hepatozellulären Karzinoms

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC, Synonym: primärer Leberkrebs) macht ungefähr 80% der primären malignen Lebertumore bei Erwachsenen aus und ist damit die häufigste Form des Leberkrebses. Das HCC ist die fünfthäufigste Tumorentität weltweit und die dritthäufigste krebssbedingte Todesursache (Parkin, 2001). Jährlich erkranken mehr als 620000 Menschen an primärem Leberkrebs, fast genauso viele (600000) sterben daran. Die Inzidenz des HCC zeigt deutliche geographische Unterschiede (**Abb. 1-2**): Das HCC ist in Entwicklungsländern, speziell in Ost- und Südostasien, im Pazifischen Becken und in Subsahara-Afrika am stärksten verbreitet. Während in Europa und Nordamerika die Erkrankungsraten bei unter 5 Fällen pro 100000 Einwohnern liegen, erkranken in manchen Regionen Chinas bis zu 100 von 100000 Einwohnern am hepatozellulären Karzinom (Ferlay *et al.*, 2004). Damit werden allein in China mehr als die Hälfte der weltweiten HCC-Erkrankungen diagnostiziert. Beunruhigenderweise hat die Inzidenz des HCC jedoch auch in Europa und in den USA in den letzten Jahren stark zugenommen.

Risikofaktoren für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms sind insbesondere virale Hepatitiden. Die chronische Hepatitis B mit HBs-Antigenpersistenz ist mit einem über 200-fach erhöhten Risiko ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln assoziiert. Untersuchungen zur chronischen Hepatitis C-Infektion weisen auf ein noch höheres HCC-Risiko hin. Weitere Risikofaktoren sind die Hämochromatose, chronische Lebererkrankungen durch Alkoholabusus, Aflatoxinexposition, Adipositas und Diabetes mellitus (Schurr *et al.*, 2005).

Mit Ausnahme des durch Aflatoxin induzierten HCC, welches in Afrika und Südostasien auftritt, entwickelt sich ein HCC nur in Ausnahmefällen in einer gesunden Leber. In westlichen Ländern ist die Leberzirrhose die wichtigste Grunderkrankung für die Entwicklung eines HCC. Patienten mit Leberzirrhose haben, abhängig von der Ätiologie der Zirrhose, ein jährliches Risiko von 0,5 - 4%, ein HCC zu entwickeln. Grundsätzlich ist unabhängig von der Ätiologie jede Leberzirrhose als Präkanzerose anzusehen (Sherman, 2005).

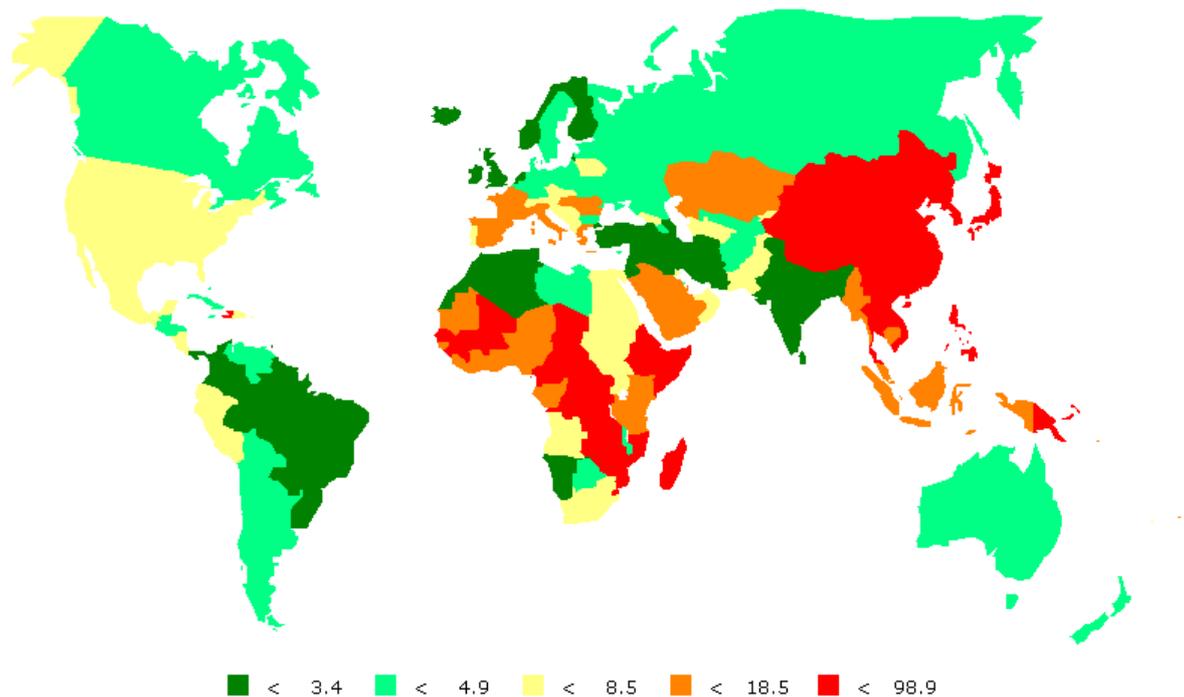


Abbildung 1-2: Geographische Unterschiede der Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms. Angegeben sind die Anzahl von Neuerkrankungen pro Jahr pro 100000 Einwohner (GLOBOCAN 2002, International Agency for Research on Cancer).

Die molekulare Pathogenese des HCC ist bisher nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass HBV/HCV-Infektionen oder alkoholtoxische Leberschädigungen als chronische Lebererkrankungen zu einer erhöhten Mitoserate und damit zu einem erhöhten Auftreten von genetischen Veränderungen führen. Diese chromosomalen Alterationen oder Mutationen können wiederum die Aktivierung zellulärer Proto-Onkogene, wie z.B. Mitglieder der myc-Genfamilie, oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie z.B. des p53-Gens, zur Folge haben und so zur malignen Transformation von Hepatozyten beitragen.

Das HCC ist klinisch sehr bösartig, unbehandelt ist die Prognose sehr schlecht. Sie wird im wesentlichen bestimmt durch die Tumorgröße, die Zahl der Tumorherde, die Gefäßinvasion oder das Vorliegen einer Pfortaderthrombose, der Menge des α -Fetoproteins (AFP) im Serum und den Schweregrad der Leberfunktionsstörung. Die durchschnittliche Überlebenszeit symptomatischer Patienten beträgt meist nur wenige Monate.

1.1.3 Therapie des HCC

Zur Therapie des HCC stehen invasive und nicht-invasive Verfahren zur Verfügung. Resektion und orthotope Lebertransplantation stellen die einzige kurative Therapieoption dar. Bei der Erstdiagnose eines HCC ist bei den meisten Patienten das Tumorstadium oder die

Leberinsuffizienz jedoch so weit fortgeschritten, dass eine Resektion oftmals nicht mehr möglich ist. Bei frühen Tumorstadien stellt die Lebertransplantation die optimale Therapieoption dar. Es werden hierbei 5-Jahres-Überlebensraten von >60% erreicht. Bei inoperablem HCC werden folgende nicht-chirurgische Therapiemöglichkeiten angewandt:

1.1.3.1 Transarterielle Chemoembolisation

Die **transarterielle Chemoembolisation (TACE)** ist ein radiologisch-interventionelles Verfahren zur palliativen Behandlung inoperabler HCC-Patienten. Grundlage der TACE ist die besondere Blutversorgung des HCC, die zu fast 80% über die *Arteria hepatica* erfolgt. Im Gegensatz dazu wird normales Lebergewebe zu ca. 75% über die Pfortader und zu nur 25% über die *A.hepatica* versorgt. In die *A.hepatica* wird eine ölige Emulsion bestehend aus Lipiodol und einem Chemotherapeutikum injiziert. Lipiodol dient hierbei als Trägersubstanz, die sich in den Tumorzellen anreichert und die Verweildauer bzw. Konzentration des Chemotherapeutikums im Tumor erhöht; daneben hat Lipiodol auch selber einen Antitumoreffekt. Nach Verabreichung der Emulsion erfolgt die passagere Embolisation der Tumorgefäße z.B. mit kleinen Gelatinepartikeln. Die portal-venöse Leberperfusion wird durch TACE nicht negativ beeinflusst (Bruix *et al.*, 2001).

1.1.3.2 Perkutane Ethanolinjektion

Bei der **perkutanen Ethanolinjektion (PEI)** werden unter lokaler Betäubung und unter Ultraschallkontrolle gezielt Tumorherde in der Leber punktiert und durch Einspritzung von Ethanol verkleinert. Der Alkohol erzeugt zum einen eine lokale Koagulationsnekrose, desweiteren erfolgt eine Schädigung des Tumors auch indirekt durch Thrombose der kleinen tumorversorgenden Gefäße mit nachfolgender Ischämie (Bruix *et al.*, 2001).

1.1.3.3 Radiofrequenz-Thermoablation

Bei der **Radiofrequenz-Thermoablation (RFTA)** handelt es sich um ein perkutan-lokales Hyperthermieverfahren. Über eine spezielle Sonde wird im Tumorherd durch lokale Hyperthermie (95°C) eine Koagulationsnekrose erzeugt (Allgaier *et al.*, 2001).

1.1.3.4 Systemisch-medikamentöse Therapie

Die systemische Mono- oder Polychemotherapie des HCC mit Zytostatika alleine oder in Kombination mit Interferon- α führt zu keiner signifikanten Verbesserung der Überlebenszeit. Vor allem unter den Kombinationen treten zum Teil erhebliche toxische Nebenwirkungen auf,

insbesondere bei zirrhotischen Patienten. Aktuell existiert keine Standard-Chemotherapie. Eine Verbesserung der Überlebenszeit bei ausgedehntem HCC durch Behandlung mit dem Antiöstrogen Tamoxifen oder dem Somatostatinanalogon Octreotid werden kontrovers beurteilt (Burroughs *et al.*, 2004). Vielversprechende Ergebnisse wurden in ersten Studien mit HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren erzielt (Kawata *et al.*, 2001).

1.1.3.5 Strahlentherapie/ Radioiod-Lipiodol-Therapie

Das HCC gilt als strahlenunempfindlich. Die externe Strahlentherapie des HCC benötigt eine hohe Strahlendosis (50 – 70 Gy), welche neben der (häufig nur teilweisen) Zerstörung des Tumorgewebes vor allem eine erhebliche Atrophie des nichttumörösen Lebergewebes zur Folge hat. In den letzten Jahren wurde deshalb eine "interne" Radiotherapie durch intraarterielle Injektion von ¹³¹I-Lipiodol entwickelt. Aufgrund einer hohen selektiven Tumordosis (bis zu 200 Gy) bei akzeptablem Tumor/Nichttumor-Verhältnis wurde ein therapeutischer Einsatz möglich (Raoul *et al.*, 1994).

Insgesamt sind die Behandlungsmöglichkeiten des HCC trotz einiger Fortschritte in den letzten Jahren unbefriedigend. Daher besteht ein dringliches Ziel in der Entwicklung innovativer Therapiestrategien zur verbesserten und patientenverträglicheren Behandlung des HCC

1.2 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR

1.2.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Proteine, welche durch Bindung an spezifische Wachstumsfaktorrezeptoren die Zellproliferation und -differenzierung über eine stimulierende Wirkung auf die DNA-Synthese fördern. Wichtige humane Wachstumsfaktoren sind unter anderem:

- der EGF (*epidermal growth factor*), welcher das Wachstum epidermaler Gewebe fördert,
- IGF-1/ IGF-2 (*insulin-like growth factors*, Synonym *Somatomedine*), welche als Vermittler der Somatotropin-Wirkung fungieren und somit für das normale Längenwachstum des Menschen von Bedeutung sind,
- der Thrombozyten-Wachstumsfaktor PDGF (*platelet-derived growth factor*),
- der Nerven-Wachstumsfaktor NGF (*nerve growth factor*),
- sowie der für die Wundheilung essentielle Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF (*fibroblast growth factor*).

1.2.2 Charakteristika des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR

Die EGFR-Familie (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, *epidermal growth factor receptor*) umfasst vier transmembranäre Rezeptoren: EGFR (HER1/erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB-3), und HER4 (erbB-4) (Yarden und Sliwkowski, 2001). Der EGFR ist ein 170 kDa Protein, welches drei funktionelle Domänen umfasst: eine extrazelluläre Ligandenbindende Domäne (N-Terminus), eine hydrophobe transmembranäre Domäne und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität (C-Terminus). Bisher wurden sieben Liganden entdeckt, die an den EGFR binden, der bedeutsamste hiervon ist EGF (vgl. **Kap. 1.2.1**). Außerdem fungieren TGF- α (*tumor growth factor- α*), Amphiregulin, Betacellulin, HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*), Epiregulin und Neuregulin G2 β als Liganden (Toyoda *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1994; Wells, 1999). Bindet ein Ligand an den EGF-Rezeptor, so kommt es im ersten Schritt der Aktivierung zur Dimerisierung von Rezeptormonomeren. Dabei können entweder zwei EGFR (Homodimer) oder ein EGF-Rezeptor mit einem anderen Rezeptor aus der HER (*human epidermal growth factor receptor*)-Familie zum Heterodimer dimerisieren (Yarden und Sliwkowski, 2001). Als Folge der Dimerisierung wird die intrinsische Tyrosinkinase aktiviert, die in der intrazellulären Domäne des Rezeptormoleküls lokalisiert ist. Die Aktivierung erfolgt durch

Autophosphorylierung beider Tyrosinreste des Rezeptordimers. An die phosphorylierte Stelle binden zytoplasmatische Botenproteine und leiten so eine Reihe von komplexen Signalkaskaden ein (**Abb. 1-3**).

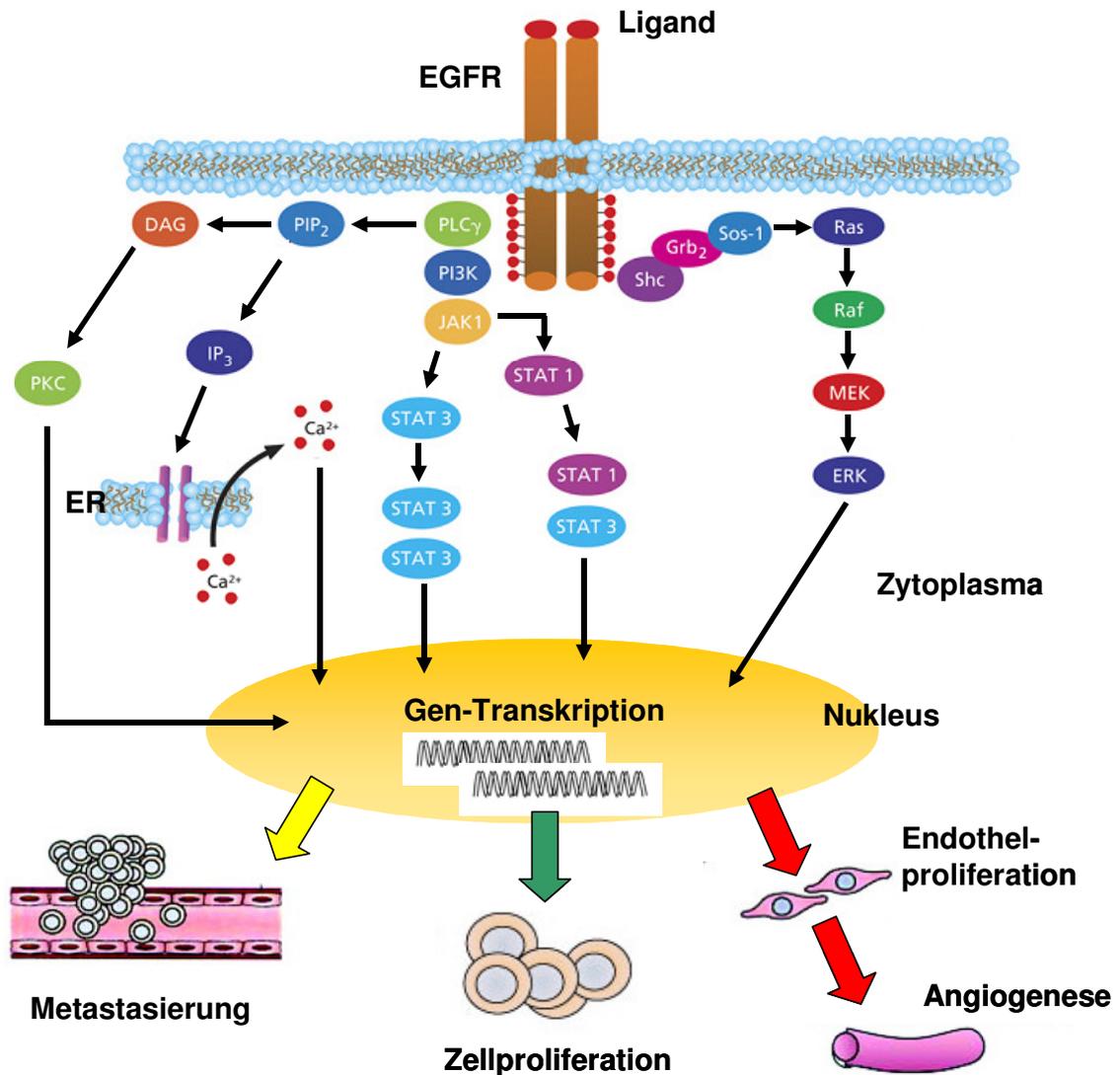


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der EGFR-Signalwege. Bindung eines Liganden an den EGF-Rezeptor bewirkt Rezeptordimerisierung und anschließende Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase des Rezeptors. Die dadurch aktivierten Signalkaskaden resultieren in Veränderungen der Transkription. Steigerung der Zellproliferation und der Angiogenese sowie Tumormetastasierung sind die Folge (modifiziert nach Harari, 2004).

Dies können z.B. durch Ras-Raf-Mitogen-Aktivierte-Proteinkinasen (MAPK, vgl. **Kap. 1.2.3.1**), STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*, vgl. **Kap. 1.2.3.2**), aber auch durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und AKT (Proteinkinase B) vermittelte Signalwege sein.

Endpunkte dieser Kaskaden sind Änderungen im Expressionsmuster von Genen, die z.B. die Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, aber auch Metastasierung und Angiogenese steuern. Nach erfolgter Aktivierung werden die Rezeptor-Liganden-Komplexe internalisiert und anschließend entweder recycelt oder abgebaut (Yarden und Sliwkowski, 2001).

1.2.3 Signaltransduktion des EGFR

1.2.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen gehören zu den wichtigsten durch extrazelluläre Signale aktivierten Signalkaskaden (Chan-Hui und Weaver, 1998). Eine Subgruppe der MAPK bilden die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK). Es handelt sich hierbei um zytoplasmatische Proteinkinasen, die ihren Namen aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen wirkende Liganden tragen. Die p44/p42MAPK (ERK1/2) wird vor allem durch Wachstumsfaktoren wie EGF oder TGF- α aktiviert, aber auch durch Zytokine oder Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Johnson und Lapadat, 2002). Über die Aktivierung der ERK1/2 werden Zellzyklusprogression und eine Hemmung der Apoptose vermittelt (Cross *et al.*, 2000; Rubinfeld und Seger, 2005; Wilkinson und Millar, 2000).

1.2.3.2 Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)

Bei den Proteinen der STAT-Familie handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, welche eine zentrale Rolle in der Wachstumsfaktor-induzierten Signaltransduktion spielen. Inzwischen sind sieben verschiedene STAT-Proteine bekannt, jedes dieser Proteine liegt in inaktiver Form im Zytoplasma einer Zelle vor. Aktivierung der STATs erfolgt durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes und anschließende Homo- oder Heterodimerisierung, welche eine DNA-Bindung im Zellkern ermöglicht. Dort wird durch die STAT-Dimere die Transkription verschiedener Gene reguliert, welche unter anderem Zellzyklus, Zellproliferation und Apoptose regulieren (Bromberg und Darnell, Jr., 2000).

Erhöhte STAT-Aktivität, hauptsächlich durch konstitutive Aktivierung der Proteine, spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren. In diesem Zusammenhang wird vor allem für STAT3 sowie STAT5-Proteine Apoptoseinhibition sowie eine Förderung der Zellproliferation beschrieben (Bowman *et al.*, 2000). Die Funktion von STAT1 bei der Tumorentstehung und -progression wird kontrovers diskutiert: Zum einen gibt es Anhaltspunkte, dass STAT1 als Tumorsuppressor fungiert (Bromberg *et al.*, 1996), zum

anderen aber wurde konstitutiv aktiviertes STAT1 neben STAT3 und STAT5 in einer Reihe von Tumorzelllinien nachgewiesen (Bowman *et al.*, 2000).

1.2.4 Die Bedeutung des EGFR in der Onkologie

Pathologische Veränderungen in der Expressionskontrolle oder in der Aktivierung des EGFR begünstigen die maligne Transformation gesunder Zellen. So kann eine durch Genamplifikation verursachte Überexpression des EGFR den Zellzyklus oder die Zelldifferenzierung empfindlich stören und zum Entstehen eines Tumors beitragen. Im Fall eines bestehenden Tumors bedeutet die Überexpression des Rezeptors, vor allem wenn sie mit einer erhöhten Co-Expression der Liganden assoziiert ist, eine besonders ungünstige Prognose. Die Stimulation des EGFR führt in diesem Falle zu verstärktem Tumorwachstum, Stimulation von Metastasierung, Angiogenese und Gefäßinvasion sowie Apoptoseinhibition (Salomon *et al.*, 1995; Wells, 1999; Woodburn, 1999). Eine Behandlung der Tumoren ist schwierig, denn die EGFR-exprimierenden Karzinome sind resistenter gegenüber Chemotherapien. Tumore verschiedensten Ursprungs weisen oft eine Überexpression des EGFR auf (**Tab. 1-1**). Eine (Über-) Expression des EGFR ist häufig auch im hepatozellulären Karzinom zu finden (Daveau *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2001), assoziiert mit hohen Rezidivraten (Kira *et al.*, 1997) und verstärkter intra- sowie extrahepatischer Metastasierung (Daveau *et al.*, 2003).

Tumortyp	Anteil der Tumoren mit EGFR-Überexpression (%)
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	40-80
Prostata	40-80
Mamma	14-91
Kolorektum	25-77
Pankreas	30-89
Ovar	35-70
Hals- und Kopf	80-100

Tabelle 1-1: Tumoren mit EGFR-Überexpression (Harari, 2004).

Neben einer EGFR-Überexpression kann die EGFR-Aktivität durch Heterodimerisierung des EGF-Rezeptors mit anderen Mitgliedern der HER-Familie, z.B. HER2, unphysiologisch erhöht werden. Desweiteren sind verschiedene Mutationen im EGF-Rezeptorgen bekannt, welche eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors zur Folge haben. Ein Beispiel hierfür ist die häufig in Tumoren auftretende EGFRvIII-Mutante, die eine trunkierte extrazelluläre Rezeptordomäne besitzt. Zusätzlich zu ihrer dysregulierten Aktivität sind die meisten Mutanten nicht mehr internalisierbar und verbleiben somit nach ihrer Aktivierung an der Zelloberfläche. Dadurch steigt die Anzahl der EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche, und das Zellwachstum wird weiter gefördert.

1.2.5 Therapeutische Beeinflussung von EGF-Rezeptoren

Aufgrund seiner Bedeutung für Tumorentstehung und -progression stellt die therapeutische Beeinflussung des EGFR einen interessanten Ansatzpunkt in der Tumorthherapie dar. Die Funktionalität und Aktivität des EGFR ist auf verschiedenen Wegen beeinflussbar. In den letzten Jahren haben zwei Klassen von Arzneistoffen Eingang in die Therapie gefunden:

- Inhibitoren der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne des EGFR (Tyrosinkinaseinhibitoren, TKI) sowie
- Monoklonale Antikörper (Mab), die gegen die extrazelluläre Liganden-bindende Domäne des EGFR gerichtet sind (Ciardiello und Tortora, 2001; Grunwald und Hidalgo, 2003).

In der Entwicklung befinden sich außerdem:

- Methoden zur Inhibierung des EGFR durch Antisense-Oligonukleotide sowie
- Antikörperbasierte Immunokonjugate, wie Immunotoxine, Immunoradionukleotide und Immunoliposomen (Ciardiello und Tortora, 2001; Grunwald und Hidalgo, 2003).

1.2.5.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

Bei den Tyrosinkinaseinhibitoren handelt es sich um oral bioverfügbare Chinazolinderivate, welche mit der intrazellulären Tyrosinkinase des EGFR interagieren und dadurch die Signaltransduktion nach Ligandenbindung unterbrechen. TKIs verhindern die Autophosphorylierung des Tyrosinrestes durch kompetitive Bindung an die intrazelluläre Mg^{2+} -ATP-Bindungsstelle des EGFR. Obwohl in den letzten 20 Jahren hunderte von EGFR-TKIs entwickelt und getestet wurden, haben bisher nur zwei Eingang in die Klinik

gefunden (Ciardiello, 2000). Gefitinib (Iressa™) und Erlotinib (Tarceva™) sind die beiden Substanzen, welche aktuell in der Klinik im Rahmen von klinischen Studien am besten charakterisiert und etabliert wurden. In klinischen Phase-I-Studien konnte für beide Substanzen demonstriert werden, dass sie als tägliche orale Gabe sicher verabreicht werden können. Die Bioverfügbarkeit von Gefitinib und Erlotinib liegt bei ungefähr 60% (Fachinformation Iressa, 2004; Fachinformation Tarceva, 2004). Hauptnebenwirkungen beider Arzneistoffe sind akneartige Hautveränderungen sowie eine teilweise dosislimitierende Diarrhoe (Albanell *et al.*, 2001). Die Hautveränderungen sind für gewöhnlich schwach ausgeprägt und stabilisieren sich bzw. verschwinden im weiteren Therapieverlauf (Busam *et al.*, 2001). Zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien belegen die Wirksamkeit der TKIs bei verschiedenen Tumorentitäten (Harari, 2004). Gefitinib (**Abb. 1-4 A**) wurde 2003 von der FDA (*Food and Drug Administration*) für die Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms in der Drittlinientherapie zugelassen, Erlotinib (**Abb. 1-4 B**) im Herbst 2004 zur Zweit- und Drittlinientherapie bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem nichtkleinzelligem Lungenkrebs.

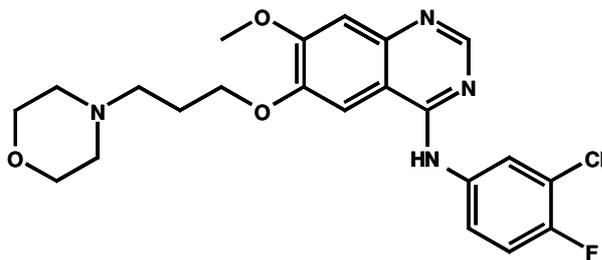


Abbildung 1-4 A. Strukturformel von Gefitinib.
N-(3-Chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-[3-(4-morpholinyl)propoxy]-4-chinazolinamin

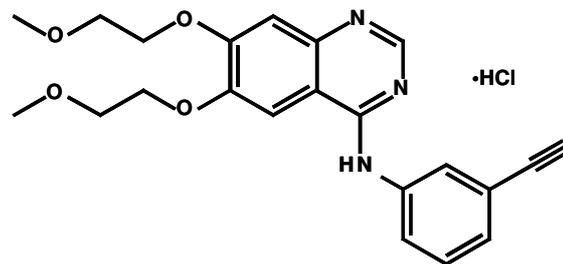


Abbildung 1-4 B. Strukturformel von Erlotinib-Hydrochlorid.
N-(3-Ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)-4-chinazolinamin)-Hydrochlorid

1.2.5.2 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper binden an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors und verhindern dadurch kompetitiv die Bindung der natürlichen Liganden. Zum einen wird somit die Aktivierung des Rezeptors und damit auch der nachgeschalteten mitogenen Signalkaskaden verhindert, zum anderen wird eine Internalisierung des EGFR-Antikörper-Komplexes sowie teilweise auch die Suppression der EGFR-Expression ausgelöst (Prewett *et al.*, 1996). Als zusätzliche Wirkmechanismen werden eine Stimulation von immunologischen Reaktionen gegen die EGFR-exprimierenden Tumorzellen (Carter, 2001) sowie die

Suppression der Expression von VEGF-(*vascular endothelial growth factor*), verbunden mit verstärkten antiangiogenetischen Effekten diskutiert. Cetuximab (ErbixTM), ein chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper gegen den EGFR, hat als bisher einziger Vertreter dieser Gruppe Einzug in die Therapie gehalten. Cetuximab bindet an den EGFR mit einer 5 bis 10-fach höheren Affinität als die endogenen Liganden. Cetuximab wurde kürzlich sowohl in den USA als auch in Europa für die Behandlung von EGFR-positiven kolorektalen Karzinomen in der Zweit- bzw. Drittlinientherapie zugelassen.

Cetuximab als proteinischer Arzneistoff muss den Patienten i.V. verabreicht werden; dank seiner langen Halbwertszeit von 114 h reicht allerdings eine Infusion pro Woche aus (Baselga, 2001). Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen entsprechen denen der TKIs, zusätzlich birgt Cetuximab-Infusion allerdings das Risiko allergischer Reaktionen gegen den Antikörper (Fachinformation Erbitux, 2004).

1.3 Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktorrezeptor-1 (IGF-1R)

Genau wie der EGFR wird auch der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktorrezeptor-1 (*insulin-like growth factor 1 receptor*; IGF-1R) mit der Karzinogenese einer Reihe von Tumoren in Verbindung gebracht (Baserga, 1999; Rubin und Baserga, 1995), unter anderem auch der Karzinogenese des HCC (Scharf und Braulke, 2003). Beim IGF-1R handelt es sich um einen tetrameren Tyrosinkinase-Rezeptor, der eine starke Strukturhomologie zum Insulinrezeptor besitzt (O'Connor, 2003). Der IGF-1-Rezeptor bindet mit größter Affinität IGF-1, aber auch IGF-2 (ca. 10-fach geringere Affinität) und Insulin (100- bis 1000-fach geringere Affinität). Die Wirkung von IGF-1 wird durch IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) moduliert, wovon derzeit 6 verschiedene bekannt sind, deren biologische Aufgaben aber bisher nur teilweise erforscht sind (Baxter, 2000; Mohan und Baylink, 2002).

Der IGF-1R wird für Resistenzen gegenüber anti-EGFR-basierten Therapieansätzen verantwortlich gemacht. Über eine Hochregulation des IGF-1-Rezeptors und Aktivierung seiner (mitogenen) nachgeschalteten Signalwege sind Tumorzellen offenbar in der Lage, die Blockade des EGFR auszugleichen (Chakravarti *et al.*, 2002). Diese Tatsache kann besonders bei hepatozellulären Karzinomzellen von Bedeutung sein, da diese den IGF-1R sehr stark exprimieren (Scharf *et al.*, 1998).

1.4 Apoptose: Der programmierte Zelltod

Die Form des genetisch festgelegten Programms zur entzündungsfreien Eliminierung von Zellen wird als Apoptose bezeichnet. Die Apoptose stellt für den Organismus einen lebenswichtigen Regulator hinsichtlich der Entwicklung und Funktionsfähigkeit von Organen und Geweben dar.

Beim HCC treten mutationsbedingt sowohl der Verlust der funktionellen Expression von Proteinen auf, die für die Initialisierung oder Aufrechterhaltung des apoptotischen Programms verantwortlich sind, als auch eine Störung des Gleichgewichts von pro- und antiapoptotischen Proteinen (Eichhorst, 2005; Neuman, 2001). Die Re-Initialisierung des apoptotischen Programms ist somit für die Therapie des HCC von besonderem Interesse.

1972 beschrieben Kerr und Mitarbeiter elektronenmikroskopische Beobachtungen einer morphologisch definierten Form des Zelltods (Kerr *et al.*, 1972). Die Apoptose ist durch Abrundung der Zellen und Chromatinkondensation entlang der nukleären Membran charakterisiert, die von einer Schrumpfung der Zelle begleitet wird. Kennzeichnend für den weiteren Verlauf der Apoptose sind die spezifische internukleosomale DNA-Fragmentation, die Auflösung der Zelle in membranumhüllte Fragmente (*apoptotic bodies*) sowie Phagozytose durch Makrophagen und andere umliegende Zellen. Die Zellmembran wie auch die Membranen der Organellen bleiben während des gesamten Prozesses intakt; eine funktionsfähige Permeabilitätsschranke ist somit gewährleistet. Die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, welches normalerweise nur auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran vorhanden ist, führt zur Erkennung und Eliminierung apoptotischer Zellen durch Makrophagen und benachbarte Zellen (Savill, 1996).

Die Balance zwischen Überleben und Tod einer Zelle steht unter genetischer Kontrolle und beinhaltet zahlreiche extrazelluläre Signale und intrazelluläre Mediatoren. Seit einigen Jahren wird zunehmend deutlicher, dass den Mitochondrien eine zentrale Position in der Apoptose-Signalkaskade zukommt (Zamzami *et al.*, 1996). Infolge des Zusammenbruchs des inneren Mitochondrienmembranpotentials ($\Delta\Psi_M$) kann die mitochondriale Matrix transient anschwellen, wodurch es sowohl zum mechanischen Reißen der äußeren Mitochondrienmembran und/oder zur Permeabilisierung der Membran durch die Öffnung großer proteinpermeabler Poren (*permeability transition pore*, PTP) kommt. Pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Proteinfamilie regulieren die Öffnung der mitochondrialen *permeability transition pore* (Kroemer, 1997; Porter, 1999). Durch Öffnung der PTP gelangen lösliche Proteine des intramembranären Spaltes wie beispielsweise Cytochrom C in das Zytoplasma. Das in das Zytoplasma freigesetzte Cytochrom C bildet

zusammen mit ATP, Procaspase-9 und dem Adapterprotein APAF-1 das sogenannte Apoptosom, welches für die Aktivierung der Caspase-9, einer Initiatorcaspase, notwendig ist. Caspase-9 aktiviert proteolytisch sogenannte Effektorcaspasen, beispielsweise Caspase-3. Caspasen sind Cysteinproteasen die für die Apoptoseinduktion und -exekution von hoher Bedeutung sind. Das „C“ im Namen steht für Cystein-Protease und „aspase“ für die Fähigkeit, spezifisch hinter einem Aspartatrest zu spalten (Chang und Yang, 2000). Zielproteine sind beispielsweise DNA-Reparaturenzyme (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), DNase-Inhibitoren, Aktin und Filamentproteine. Als Folge der Proteolyse von DNase-Inhibitoren kommt es zur Aktivierung von Endonukleasen, die eine Fragmentierung der DNA in Nukleosomen bewirken (Schutte und Ramaekers, 2000).

1.5 Der Zellzyklus

Die exakte Verdoppelung der chromosomalen DNA einer Eukaryotenzelle wird durch den Zellzyklus geregelt. Der Zellzyklus beschreibt den Zeitraum zwischen der Entstehung einer Zelle aus einer Mutterzelle, und ihrer erneuten Teilung in zwei weitere Tochterzellen. Dieser Zeitraum unterteilt sich in die Mitose (M)- Phase und die Interphase, die ihrerseits wiederum in G₁-, Synthese (S)- und G₂- Phase unterteilt ist. Die beiden G-Phasen haben ihre Bezeichnung auf Grund ihrer Lage (vom englischen *gap* für Lücke) erhalten. Die G₁-Phase ist das erste Stadium der Interphase und dient hauptsächlich dazu, der Zelle Zeit zum Wachstum zu geben. In der G₁-Phase befindet sich auch ein wichtiger Kontrollpunkt des Zyklus (Restriktionspunkt), an dem entschieden wird, ob die Zelle den Zellzyklus ein weiteres Mal durchläuft oder der Zyklus arretiert wird und/oder Mechanismen zur Auslösung von Apoptose aktiviert werden. Dies ist der Fall, wenn die DNA nicht intakt ist oder nicht alle für den Ablauf der S-Phase notwendigen Faktoren in ausreichendem Maße vorhanden sind. Die S-Phase ist der zweite Abschnitt der Interphase. Die Zelle wächst durch die Bildung von Proteinen, zusätzlich verdoppelt sie durch DNA-Synthese ihren DNA-Gehalt, so dass die Zelle am Ende der S-Phase tetraploid ist. In der G₂-Phase (Postsynthesephase) wächst die Zelle ungefähr auf das Doppelte weiter an. Am Übergang von der G₂-Phase zur M-Phase findet sich ähnlich dem Restriktionspunkt in der G₁-Phase ein weiterer Kontrollpunkt an dem die Entscheidung über den Eintritt in die Mitose (M-Phase) stattfindet. In der M-Phase teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen, die dann entweder erneut den Zellzyklus durchlaufen oder aber in einen Differenzierungsprozess eintreten (G₀-Phase). Auch hier gibt es einen Kontrollpunkt, an dem die Entscheidung über die Ausdifferenzierung oder einen erneuten Eintritt in den Zellzyklus stattfindet.

Die Kontrolle des Zellzyklus lässt sich als die Kontrolle makromolekularer Vorgänge durch eine begrenzte Anzahl "heterodimerer Proteinkinasen" beschreiben (Lodisch *et al.*, 2001). Diese heterodimeren Proteinkinasen setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen, den Cyclinen und den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs). Cycline sind kurzlebige Proteine, deren relative Konzentration phasenspezifischen zyklischen Schwankungen unterworfen ist. Die Konzentration der Cycline steuert die Aktivität der langlebigeren CDKs. Die CDKs können nach erfolgter Aktivierung durch Cycline die Aktivität anderer Enzyme durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung modulieren. CDKs können aber auch inhibiert werden. Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase werden als CDKIs (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) bezeichnet.

Neben einer gestörten Apoptoseregulation ist eine unkontrollierte Zellteilung ein weiteres Charakteristikum von Tumorzellen. Für die Karzinogenese des HCC ist hierbei insbesondere die Aufhebung der Integrität des G₁/S-Kontrollpunktes von großer Bedeutung (Hui *et al.*, 1998).

1.6 Ziel der Arbeit

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt eine Tumorentität mit schlechter Prognose und unbefriedigenden Behandlungsmöglichkeiten dar. Daher sind neue Therapieansätze dringend erforderlich.

In den letzten Jahren hat der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) als interessante neue Zielstruktur in der Tumorthherapie immer mehr Beachtung gefunden.

Zur Blockade des EGFR bzw. der ihm nachgeschalteten mitogenen Signalwege stehen seit kurzem ein anti-EGFR-Antikörper sowie zwei Inhibitoren der intrazellulären EGFR-Tyrosinkinase zur Verfügung. Der Ansatz einer EGFR-basierten Therapie zur Wachstumskontrolle des HCC ist jedoch bislang noch nicht verfolgt worden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die neuartigen EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren (Gefitinib (IressaTM) bzw. Erlotinib (TarcevaTM) sowie den monoklonalen anti-EGFR-Antikörper Cetuximab (ErbixTM) auf ihre Eignung für innovative Therapiemöglichkeiten des HCC zu evaluieren. Die den antineoplastischen Wirkungen der Arzneistoffe zugrunde liegenden Mechanismen sollen darauf aufbauend mit Hilfe zellbiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden charakterisiert werden.

Zusätzlich sollen folgende kombinationstherapeutische Ansätze im *in-vitro*-Modell evaluiert werden:

- die Modulation der antiproliferativen Effekte konventioneller Chemotherapeutika durch simultane EGFR-Inhibition,
- die simultane Blockade des EGFR und des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktorrezeptors-1 (IGF-1R)
- sowie die duale Blockade des EGFR durch anti-EGFR-Mab und EGFR-TKI.

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auch auf andere Tumoren des Gastrointestinaltraktes sollen zusätzlich die wichtigsten Untersuchungen an Ösophaguskarzinomzelllinien sowie Biopsaten von Ösophaguskarzinomen durchgeführt werden.