

4 ERGEBNISSE

4.1 EGFR-Expression in humanen hepatozellulären Karzinomen

4.1.1 Nachweis von mRNA des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR)

Die Bildung von EGFR-mRNA wurde unter Verwendung der in **Tabelle 2-2 (Kap. 2.3)** dargestellten Primer in HCC-Zelllinien (HepG2 und Huh-7) untersucht. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate wurden Einzelbanden mit 240 Basenpaaren (bp) detektiert (**Abb. 4-1**, Spuren 1 und 4). Sowohl für Huh-7 als auch HepG2-Zellen konnten folglich Transkripte des EGFR nachgewiesen werden.

4.1.2 Untersuchung der Expression der EGFR-Mutante EGFRvIII

Analog zu **Kap. 4.1.1** erfolgte die Untersuchung der Expression der konstitutiv aktiven EGFR-Mutante EGFRvIII (Primer siehe **Kap. 2.3**). EGFRvIII besitzt zwar die gleiche mRNA-Sequenz wie der EGFR-Wildtyp, allerdings fehlen in der mRNA die Exons 2 - 7. Mit dem beschriebenen Primer bildet EGFRvIII ein Transkript von 226 Basenpaaren, während die mRNA des Wildtyprezeptors als Einzelbande von 1028 bp detektiert werden kann. In beiden Zelllinien konnte mit dem entsprechenden Primer der Wildtyp-EGFR nachgewiesen werden, während die Mutante weder von Huh-7- noch von HepG2-Zellen exprimiert wurde (**Abb. 4-1**, Spuren 2 und 5).

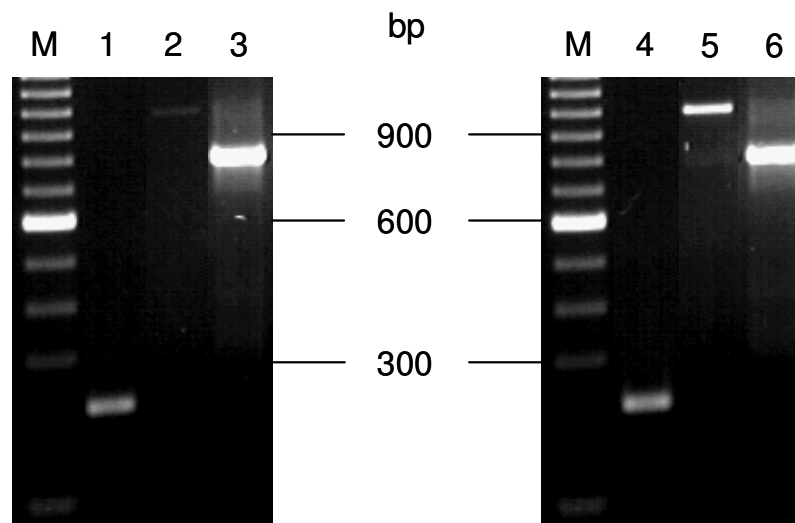


Abbildung 4-1: EGFR und EGFRvIII-Expression in humanen HCC-Zelllinien. EGFR-mRNA wurde in HepG2- (Spur 1) und Huh-7-Zellen (Spur 4) durch RT-PCR nachgewiesen. EGFR-vIII mRNA (226 bp) war für beide Zelllinien nicht nachweisbar (HepG2: Spur 2, Huh-7: Spur 5). Die in den Spuren zu erkennenden Banden sind dem Wildtyp-EGFR zuzuordnen, der mit dem verwendeten Primer Transkripte von 1028 bp bildet. Die Expression des *housekeeping*-Gens β -Aktin (822 bp; HepG2: Spur 3, Huh-7: Spur 6) diente der Standardisierung. M = 100 bp-Leiter (Gibco BRL, Eggenstein, D).

4.1.3 Nachweis des EGFR-Proteins

Zum Nachweis der Expression des EGFR-Proteins in den Zelllinien Huh-7 und HepG2 wurden diese, wie im **Kapitel 3.3.1** beschrieben, nach Permeabilisation zunächst mit einem polyklonalen anti-EGFR-Antikörper und dann mit einem FITC-gekoppelten polyklonalen anti-IgG-Sekundärantikörper angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Sowohl Huh-7 als auch HepG2 Zellen zeigten EGFR-Proteinexpression (**Abb. 4-2**).

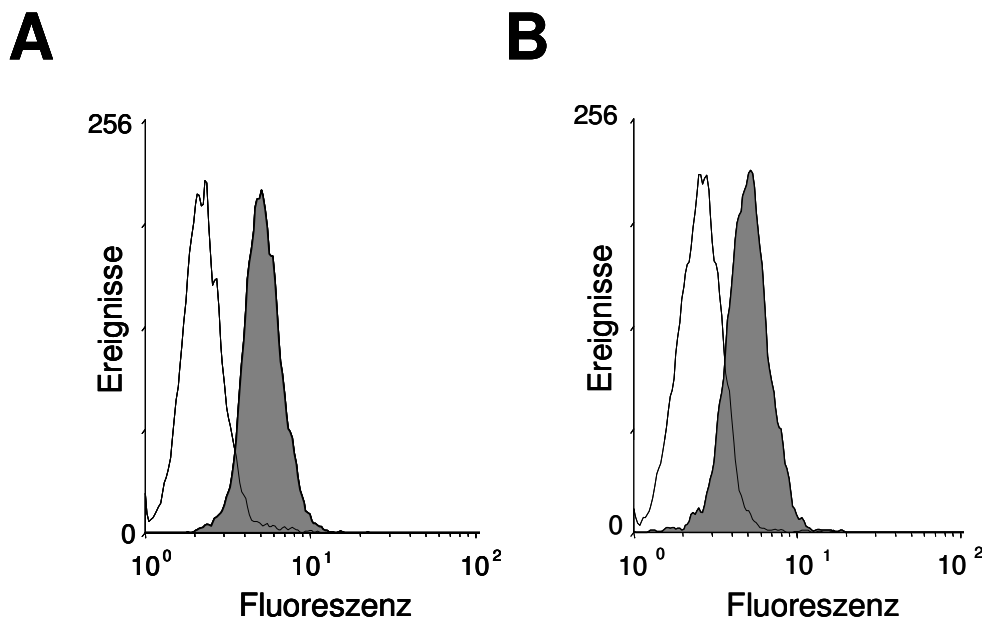


Abbildung 4-2: Nachweis des EGFR-Proteins in humanen HCC-Zellen. Das EGFR-Protein (graue Fläche) wurde in HepG2- (A) und Huh-7 Zellen (B) durchflusszytometrisch nachgewiesen. Die Zellen wurden nach Membranpermeabilisierung mit einem polyklonalen anti-EGFR-Antikörper angefärbt. Schwarze Linie: Isotypenkontrolle.

4.2 Wachstumsstudien an HCC-Zellkulturmodellen

4.2.1 Hemmung der Proliferation von HCC-Zellen durch EGFR-TK-Inhibition

Wachstumsmodulierende Effekte der EGFR-Blocker wurden mit Hilfe der Kristallviolettmethode (**Kap 3.1.4.1**) untersucht. Die EGFR-TKIs Erlotinib (1 – 50 μM) sowie Gefitinib (1 - 25 μM) hemmten zeit- und dosisabhängig die Proliferation von Huh-7- und HepG2-Zellen (**Abb. 4-3**). Die halbmaximale wachstumsinhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Erlotinib lag bei $12,7 \pm 2,1 \mu\text{M}$ für Huh-7-Zellen bzw. $13,0 \pm 1,8 \mu\text{M}$ für HepG2-Zellen (nach 72 h). Für Gefitinib wurden IC_{50} -Werte von $16,4 \pm 2,4 \mu\text{M}$ für Huh-7 und $12,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$ für HepG2-Zellen ermittelt. Während bei niedrigen Konzentrationen von bis zu 15 μM beide Arzneistoffe vergleichbar starke antiproliferative Wirkungen hatten, zeigten sich bei hohen Dosen der jeweiligen TKIs Unterschiede. Gefitinib in hoher Konzentration (20 μM)

fürte zum nahezu vollständigen Absterben der Tumorzellen, während eine Erhöhung der Erlotinibkonzentration über 25 μM hinaus keine Steigerung der antiproliferativen Effekte von Erlotinib ergab.

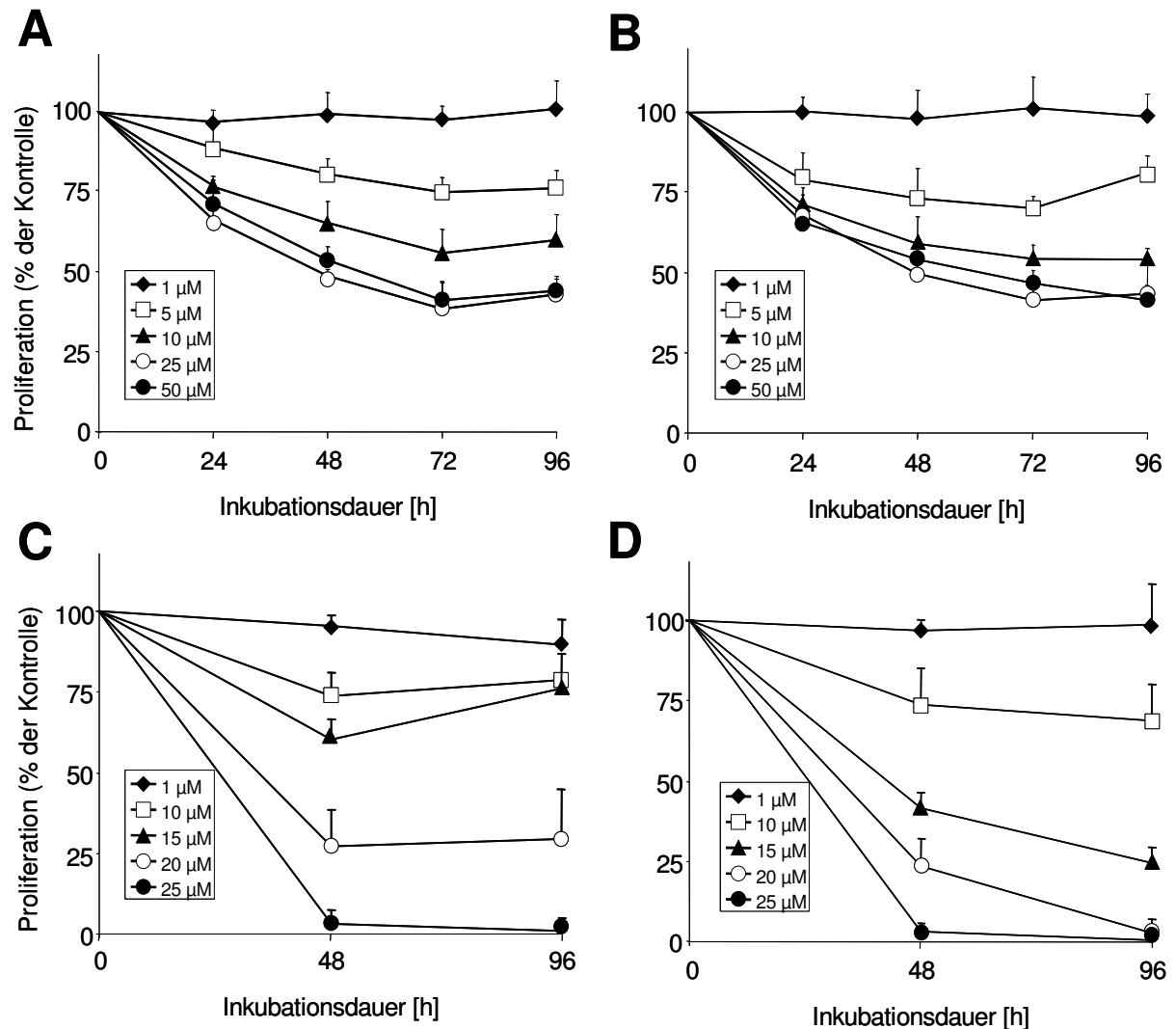


Abbildung 4-3: Antiproliferative Effekte von Erlotinib und Gefitinib. Die EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib (A, B) und Gefitinib (C, D) hemmten zeit- und dosisabhängig das Wachstum von Huh-7- (A, C) und HepG2-Zellen (B, D). Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens vier unabhängigen Versuchen \pm SD. Mit Ausnahme der jeweils niedrigsten TKI-Konzentrationen von 1 μM führten alle applizierten Konzentrationen zu einer signifikanten Wachstumshemmung ($p < 0,05$). Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben.

4.2.2 Hemmung der Proliferation von HCC-Zellen durch den monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab

Der gegen die ligandenbindende Domäne des EGFR gerichtete chimäre monoklonale IgG1-Antikörper Cetuximab hemmte das Wachstum humaner HepG2-Zellen zeit- und dosisabhängig mit einem IC_{50} -Wert von etwa 850 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bei Huh-7-Zellen hingegen

bewirkte die Behandlung mit Cetuximab eine sehr geringe Wachstumshemmung, welche nur für die höchste Arzneistoffkonzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Signifikanz zeigte (**Abb. 4-4**).

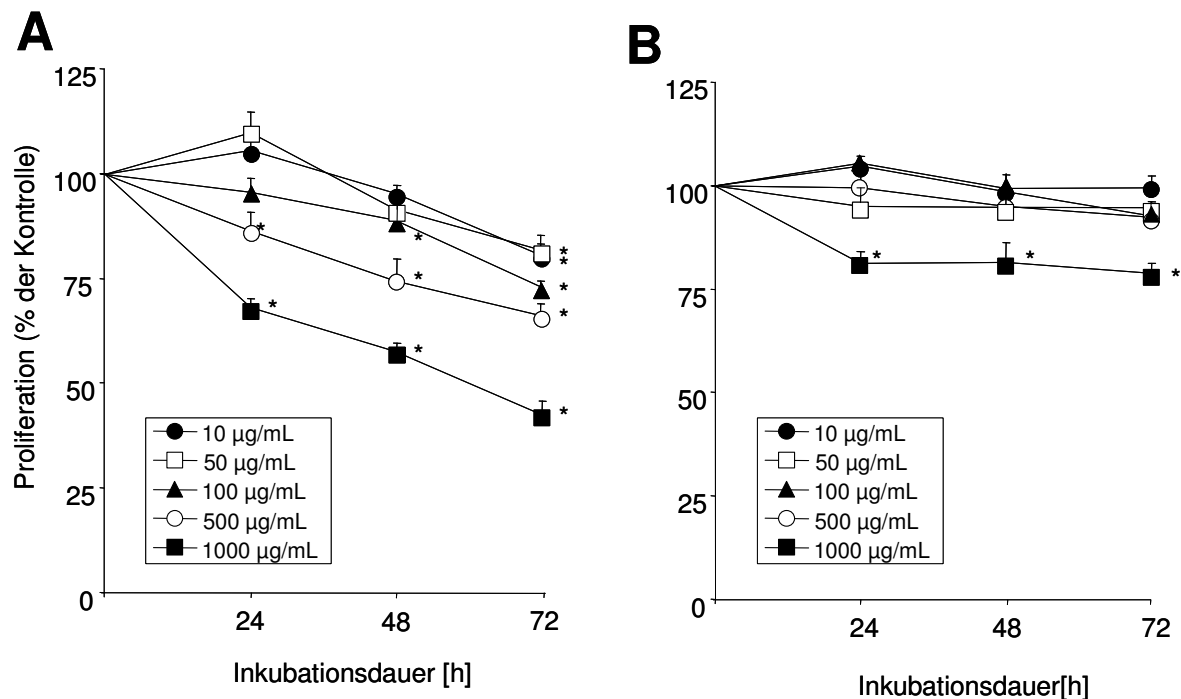


Abbildung 4-4: Antiproliferative Effekte von Cetuximab. Cetuximab hemmte zeit- und dosisabhängig das Wachstum von HepG2-Zellen (A), zeigte jedoch kaum Effekte auf die Proliferation von Huh-7-Zellen (B). Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen \pm SD. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. * $p < 0,05$

4.3 Bestimmung der Zytotoxizität von EGFR-Blockern

Eine unspezifische Zytotoxizität von Substanzen führt häufig zu Nekrose. Durch Verlust der Plasmamembranintegrität schwellen osmotisch bedingt die Zellen und Organellen an, bis sie platzen und ihren Inhalt in den Interzellularraum entleeren. Dies führt zu unerwünschten immunologischen Reaktionen. Um nekrotische/membranschädigende Effekte der verwendeten Arzneistoffe abzuschätzen, wurde die Membranintegrität von HepG2- und Huh-7-Zellen nach Inkubation mit Cetuximab und Erlotinib bestimmt. Eine 6-stündige Behandlung mit Erlotinib (**Abb. 4-5 A**) oder Cetuximab (**Abb. 4-5 B**) bewirkte im Vergleich zu den Kontrollzellen keine signifikant erhöhte Freisetzung von LDH in den Zellüberstand. Nach 24-stündiger Inkubation hingegen war bei höheren Arzneistoffkonzentrationen ($\geq 10 \mu\text{M}$ Erlotinib bzw. $\geq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ Cetuximab) ein leichter Anstieg der LDH-Freisetzung zu beobachten. Da die Zunahme der LDH-Konzentration im Medium stark mit dem durch den jeweiligen Arzneistoff ausgelösten Ausmaß an Apoptose korrelierte (siehe **Kap. 4.4**), liegt es nahe, dass das freigesetzte LDH aus spätapoptotischen Zellen stammt, die zu diesem

Zeitpunkt bereits ihre Membranintegrität verloren haben. Hierbei handelt es sich um ein *in-vitro*-Phänomen, *in-vivo* werden apoptotische Zellen durch Makrophagen eliminiert. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die EGFR-Blocker bei humanen hepatozellulären Karzinomzellen keine unspezifische Zytotoxizität induzieren.

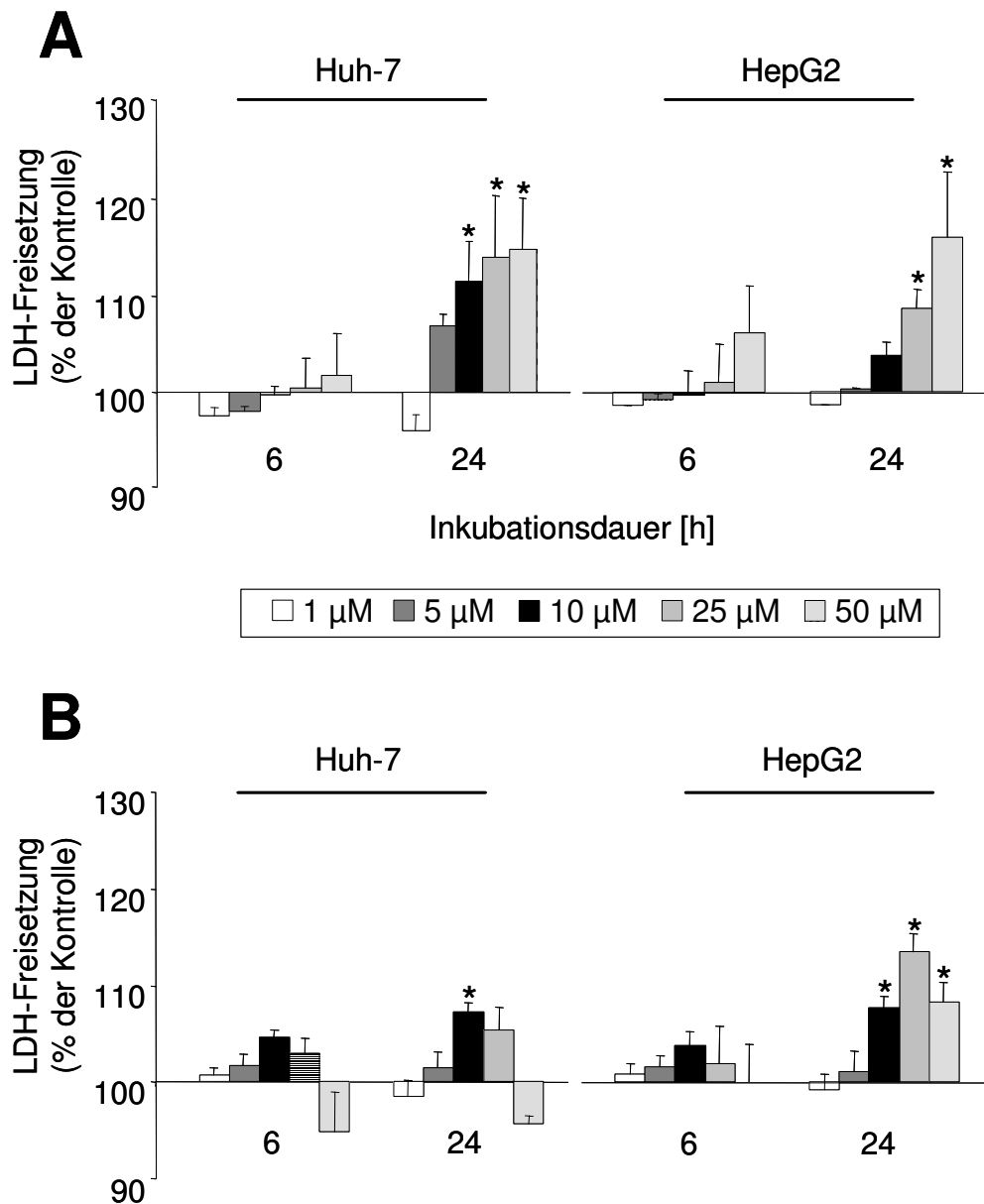


Abbildung 4-5: Zytotoxizität von EGFR-Blockern. Huh-7- bzw. HepG2-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von Erlotinib (A) oder Cetuximab (B) behandelt. Nach 6 h Inkubationszeit wurde keine signifikant erhöhte Lactatdehydrogenase-Freisetzung gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen \pm SD. Die Lactatdehydrogenase-Freisetzung der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. * $p < 0,05$

4.4 Apoptoseinduktion durch EGFR-Blockade

Während der Karzinogenese verlieren Tumorzellen zumindest teilweise ihre Fähigkeit zur Apoptose, weil die funktionelle Expression proapoptotischer Proteine supprimiert wird, wodurch es zur Dysbalance von pro- und antiapoptotischen Faktoren kommt. Dies gilt auch für das HCC (Kountouras *et al.*, 2005). Daher ist die Reinitialisierung des apoptotischen Programms von hoher Relevanz für die Therapie des HCC.

Die Apoptoseinduktion durch Blockade des EGFR wurde durch Messung mitochondrialer Veränderungen, Caspase-3-Aktivitätsbestimmung sowie Nachweis der DNA-Fragmentation bestimmt. Veränderungen der Expression apoptoseregulierender Proteine wurden mittels *Western Blot* untersucht.

4.4.1 Mitochondriale Veränderungen

Huh-7- und HepG2-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Gefitinib (5 - 20 μM) für 3 - 24 h inkubiert und die mitochondrialen Veränderungen ($\Delta\Psi_{\text{M}}$, V_{M}) durch anschließende Anfärbung mit JC-1 durchflusszytometrisch untersucht (**Kap. 3.1.6.1**). Beide Zelllinien zeigten bereits nach 3-stündiger Inkubation eine deutliche Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran ($\Delta\Psi_{\text{M}}$ -Zunahme), welche nach 6 - 12 h ein Maximum erreichte (**Abb. 4-6 A,B**). Huh-7-Zellen zeigten darüber hinaus eine zeitabhängige Zunahme des Mitochondrienvolumens (V_{M}), welche in HepG2-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (**Abb. 4-6 C,D**).

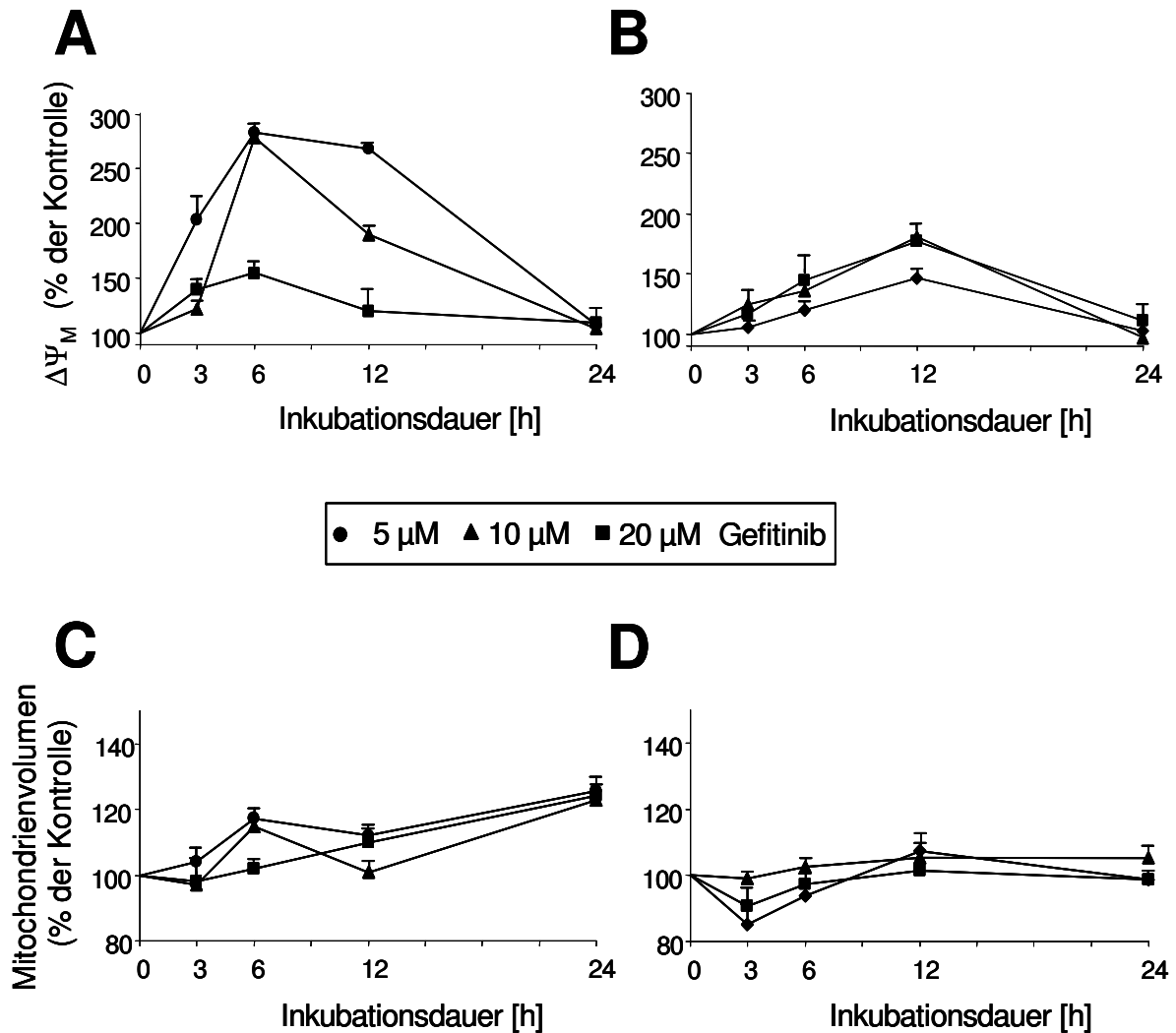


Abbildung 4-6: Mitochondriale Veränderungen durch Gefitinib-Behandlung. Inkubation von humanen HCC-Zelllinien mit Gefitinib (5, 10 und 20 µM) führte zu einer reversiblen Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran in Huh-7-(A) und HepG2-Zellen (B). Das mitochondriale Volumen in Huh-7-Zellen stieg zeitabhängig (C), während in HepG2-Zellen (D) keine Veränderung beobachtet wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen je Zelllinie \pm SEM. Die Angabe der Daten erfolgt in Prozent der unbehandelten Kontrolle.

4.4.2 Caspase-3-Aktivierung

Die EGFR-TKIs Gefitinib (Abb. 4-7 AB) und Erlotinib (Abb. 4-7 CD) induzierten eine zeit- und dosisabhängige Zunahme der Caspase-3-Aktivität in HCC-Zellen. Der anti-EGFR-Mab Cetuximab führte zu vergleichbaren Effekten in HepG2-Zellen (Abb. 4-7 E), allerdings war die relative Zunahme der Enzymaktivität weniger stark ausgeprägt als durch TK-Inhibition. Huh-7-Zellen (Abb. 4-7 F) zeigten selbst bei hohen Dosen von Cetuximab (1000 µg/mL) nur eine mäßige Zunahme der Caspase-3-Enzymaktivität.

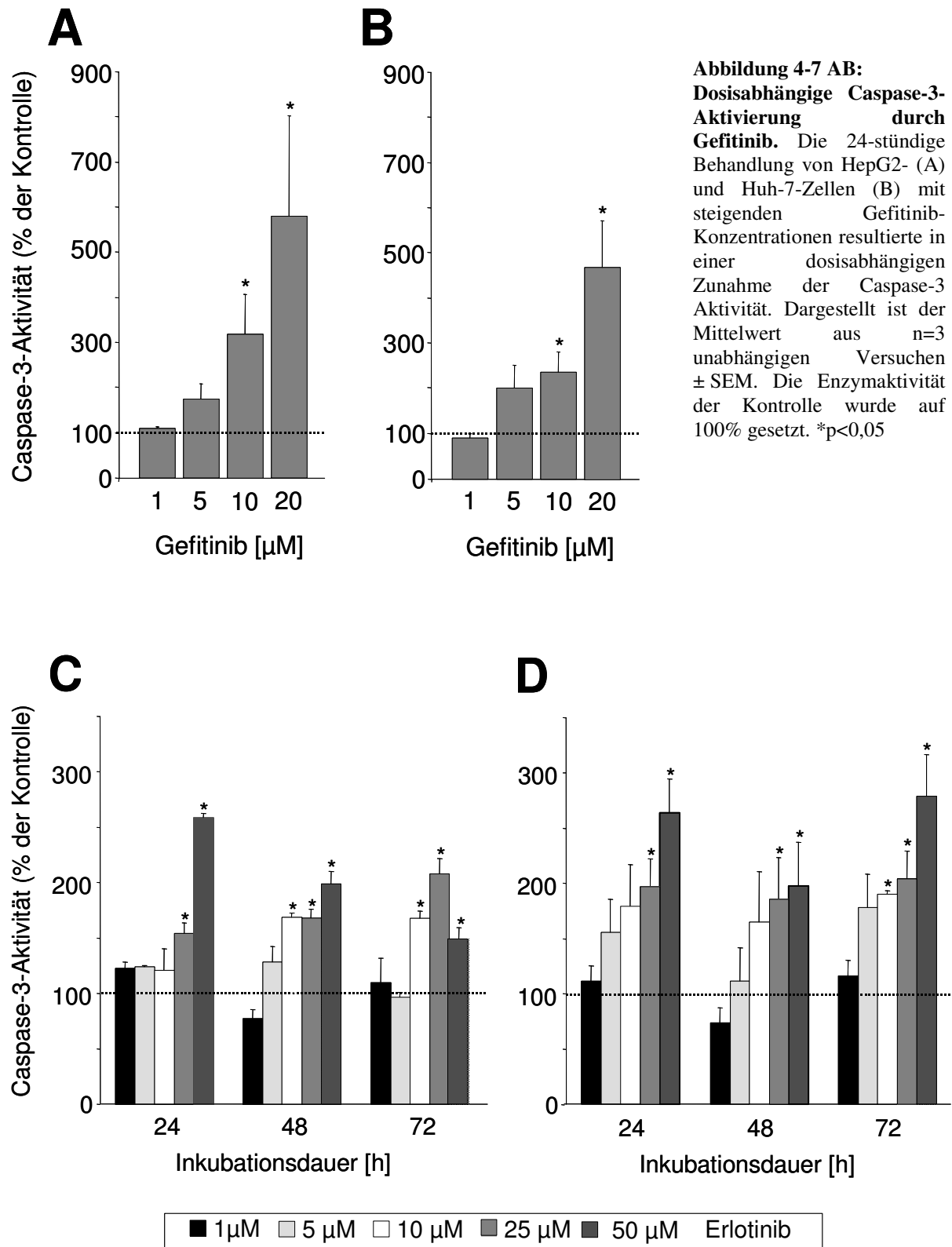


Abbildung 4-7 CD: Caspase-3-Aktivierung durch Erlotinib. Erlotinib steigerte zeit- und dosisabhängig die Aktivität der Caspase-3, dem Schlüsselenzym des apoptotischen Prozesses, in HepG2- (A) und Huh-7-Zellen (B). Unterhalb einer Konzentration von 10 μ M des EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors waren allerdings keine signifikanten Effekte messbar. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen \pm SEM. Die Enzymaktivität der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. * $p<0,05$

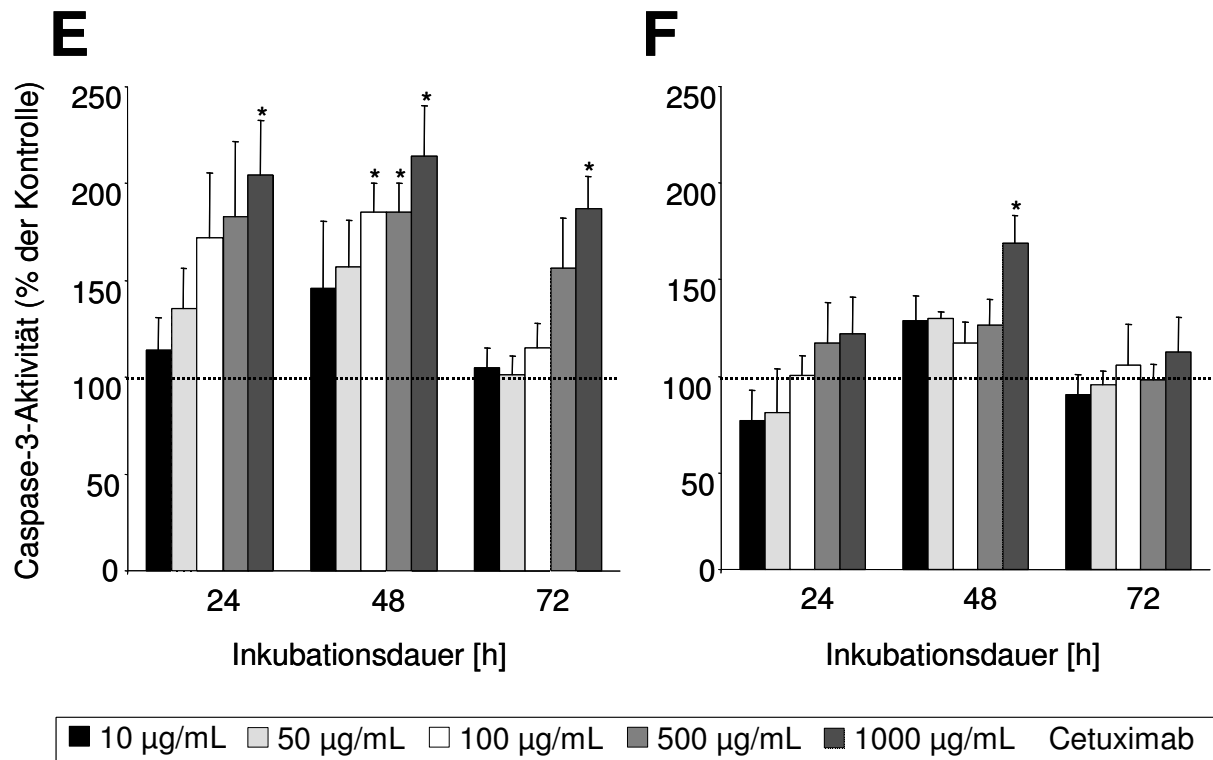


Abbildung 4-7 EF: Caspase-3-Modulation durch Cetuximab. Cetuximabbehandlung resultierte in zeit- und dosisabhängigem Anstieg der Caspase-3-Aktivität in HepG2-Zellen (A), hingegen waren kaum Effekte in Huh-7-Zellen (B) messbar. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen \pm SEM. Die Enzymaktivität der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. * $p < 0,05$

4.4.3 DNA-Fragmentation

Die Fragmentation der DNA in Oligo- und Mononukleosomen erfolgt in einem späten Stadium der Apoptose. In den Zellkernen apoptotischer, aber nicht nekrotischer Zellen, wird eine Endonuklease aktiviert, welche die DNA an den internukleosomalen Verbindungsstellen innerhalb der Chromatinstruktur spaltet und so eine Vielzahl niedermolekularer DNA-Fragmente liefert. Diese können durch Gelelektrophorese aufgespalten und nach Anfärbung sichtbar gemacht werden.

Erlotinib (10 μ M oder 25 μ M; 48 h) induzierte sowohl in Huh-7- als in HepG2-Zellen eine apoptosespezifische Degradation der DNA (**Abb. 4-8**). Das Ausmaß der DNA-Fragmentation war dabei für beide HCC-Zelllinien bei beiden Konzentrationen sehr ähnlich und korrelierte mit der in den Zellen gefundenen Caspase-3-Aktivierung (vgl. **Kap. 4.4.2**).

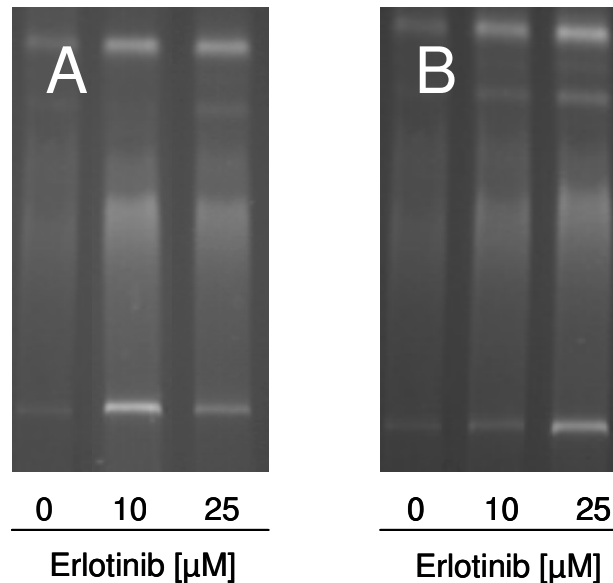


Abbildung 4-8: DNA-Fragmentation bei Erlotinib-induzierter Apoptose. 48-stündige Erlotinibbehandlung von Huh-7- (A) und HepG2-Zellen (B) resultierte jeweils in einer apoptosespezifischen DNA-Degradation. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus $n=3$ Versuchen pro Zelllinie.

4.4.4 Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie

Die Proteine der Bcl-2-Familie gelten als Schlüsselregulatoren in der Kontrolle mitochondrial vermittelter Apoptose (Kaufmann und Hengartner, 2001). Die Bcl-2-Familie umfasst sowohl antiapoptotische (z.B. Bcl-2, Bcl- X_L) als auch proapoptotische Mitglieder (Bax, Bak, Bad) (Bouillet und Strasser, 2002). Die Wirkungsweise der verschiedenen Proteine beruht nach derzeitigem Wissensstand hauptsächlich auf der Aktivierung bzw. Inhibition des mitochondrial vermittelten Zelltodprogramms (Israels und Israels, 1999). Der Einfluß einer Gefitinibbehandlung (1 – 25 μM , 24 h) auf die Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl- X_L wurde exemplarisch an HepG2-Zellen untersucht. Es konnte eine dosisabhängige Suppression der antiapoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl- X_L gezeigt werden (Abb. 4-9).

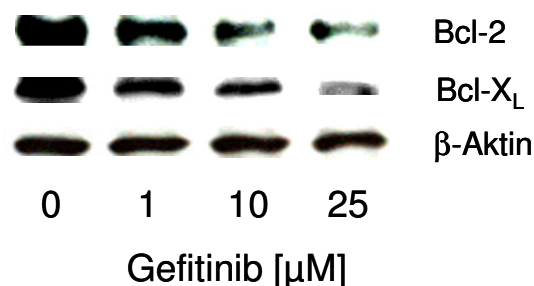


Abbildung 4-9: Suppression antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie durch Gefitinib. Die 24-stündige Behandlung von HepG2-Zellen mit Gefitinib (1 - 25 μM) hatte eine dosisabhängige Abnahme der Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl- X_L zur Folge. Exemplarisch gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von $n=3$ unabhängigen Experimenten.

4.5 Zellzyklusuntersuchungen

Im Zuge der Entstehung und Progression hepatozellulärer Karzinome kommt es vor allem aufgrund viraler Hepatiden zu kumulativen genetischen Alterationen, welche die Basis einer exzessiven und unkontrollierten Proliferation der Tumorzellen bilden (Ozturk, 1999; Tannapfel und Wittekind, 2002). Beim HCC sind Mutationen bzw. Veränderungen im Expressionsprofil von zellzyklusregulierenden Proteinen von besonderer Bedeutung. Die Aufhebung des G₁/S-Kontrollpunktes des Zellzyklus spielt dabei eine wichtige Rolle (Tannapfel und Wittekind, 2002). Arzneistoffe mit zellzyklusmodulierenden Eigenschaften sind somit interessant für die Therapie des HCC. Daher wurde der Einfluß von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die Zellzyklusregulation in hepatozellulären Karzinomen untersucht.

4.5.1 Modulation des Zellzyklus durch EGFR-Blockade

Die EGFR-TKIs Erlotinib (**Abb. 4-10 A,B**) sowie Gefitinib (**Abb. 4-10 C,D**) hatten bei hepatozellulären Karzinomzellen nach 24 h eine dosisabhängige Akkumulation der Zellen in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus zur Folge. Der Zellzyklusarrest war für beide Arzneistoffe in HepG2-Zellen stärker ausgeprägt als in Huh-7-Zellen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase nahm parallel zum G₁/G₀-Anstieg ab, während der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase leicht zunahm bzw. unverändert blieb.

Cetuximab induzierte in HepG2-Zellen ebenfalls einen ausgeprägten dosisabhängigen Arrest in der G₁/G₀-Phase (**Abb. 4-10 E**). In Huh-7-Zellen konnten dagegen mit Ausnahme der höchsten applizierten Arzneistoffkonzentration von 1000 µg/mL keine signifikanten Zellzyklusveränderungen festgestellt werden (**Abb. 4-10 F**).

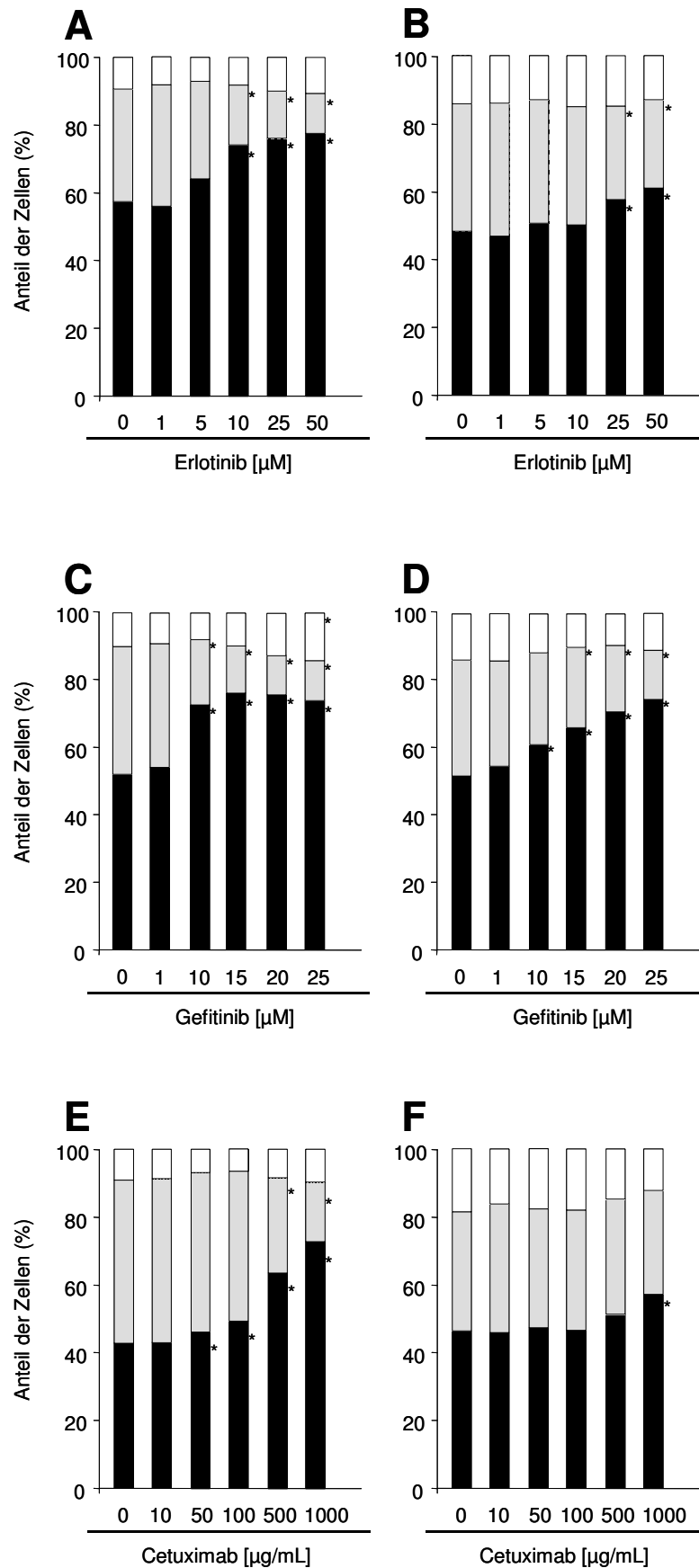


Abbildung 4-10: Zellzyklusarretierung durch EGFR-Blockade.

Nach 24 h Behandlung von HepG2- (A, C) und Huh-7-Zellen (B, D) mit Erlotinib oder Gefitinib akkumulierten die Zellen in der G₁/G₀-Phase (schwarze Balken) des Zellzyklus. Der Anteil der Zellen in der S-Phase (graue Balken) nahm parallel dazu ab, der entsprechende Anteil in der G₂/M-Phase (weiße Balken) blieb weitgehend unverändert.

24-stündige Behandlung von HepG2 (E) mit Cetuximab zeigte ein der EGFR-TKI-Behandlung vergleichbares Ergebnis. Hingegen modulierte Cetuximab den Zellzyklus von Huh-7-Zellen (F) nur geringfügig. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Versuchen. *p<0,05

4.5.2 Veränderungen im Expressionsprofil von Zellzyklusregulatoren durch EGFR-Blockade

Zur weitergehenden Charakterisierung des beobachteten Zellzyklusarrests wurden Veränderungen der Expression zellzyklusregulierender Proteine in hepatozellulären Karzinomzellen mittels *Western Blot* untersucht. HepG2-Zellen wurden bis zu 48 h mit 10 μ M Erlotinib (**Abb. 4-11 A**) oder 250 μ g/mL Cetuximab (**Abb. 4-11 B**) behandelt. Anschließend wurde die Expression des den Übergang von der G₁- zur S-Phase regulierenden Cyclin D1, sowie der Zellzyklusinhibitoren p21^{Waf1/CIP1} und p27^{Kip1} bestimmt. Für die Proteine p21^{Waf1/CIP1} und p27^{Kip1} wurde bereits nach 24-stündiger Behandlung mit Erlotinib oder Cetuximab eine Zunahme beobachtet. Die Cyclin D1-Expression wurde durch Cetuximabbehandlung nach 24 h leicht, nach 48 h deutlich supprimiert. Überraschenderweise wurde die Proteinexpression von Cyclin D1 durch Erlotinib nicht beeinflusst.

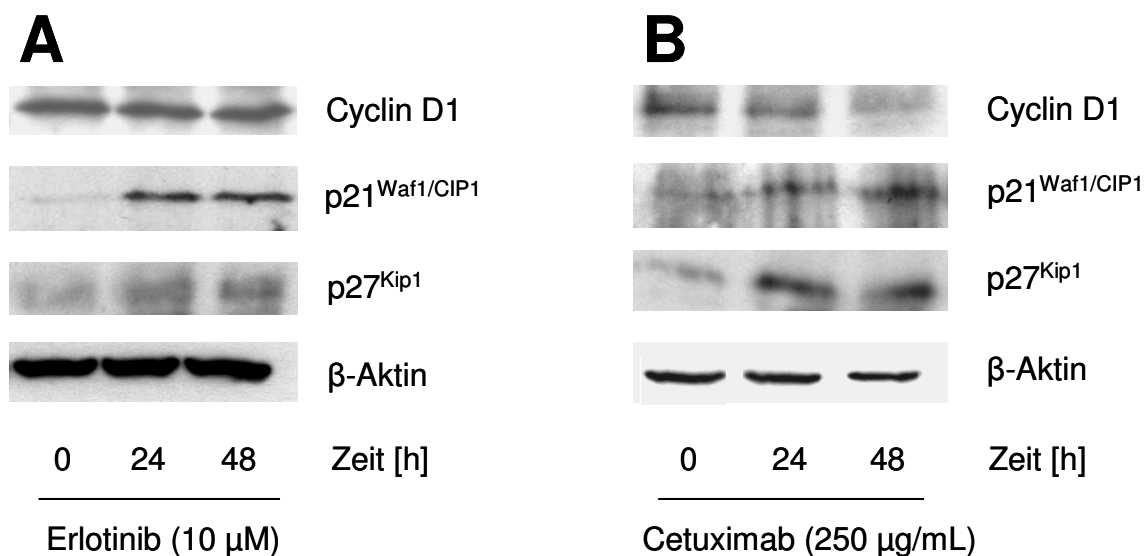


Abbildung 4-11: EGFR-Blockade verändert die Expression zellzyklusregulierender Proteine. HepG2-Zellen wurden 24 h oder 48 h mit 10 μ M Erlotinib (A) oder 250 μ g/mL Cetuximab (B) behandelt. Anschließend wurden mittels *Western Blot* Veränderungen im Expressionsprofil von zellzyklusregulierenden Proteinen bestimmt. Die Zellzyklusinhibitoren p27^{Kip1} und p21^{Waf1/CIP1} wurden jeweils verstärkt exprimiert, der Zellzykluspromoter Cyclin D1 wurde durch Cetuximabbehandlung supprimiert. Erlotinib induzierte hingegen keine Veränderung der Cyclin D1-Expression. Darstellungen aus jeweils n=3 unabhängigen Experimenten für jeden EGFR-Inhibitor.

4.6 Mitogene Signaltransduktion

Um die Effekte einer EGFR-Blockade auf nachgeschaltete (mitogene) Signalwege aufzuzeigen, wurden Veränderungen im Expressionsstatus von Schlüsselproteinen des Ras-Raf-MAP-Kinaseweges und des JAK-STAT-Signalweges untersucht.

4.6.1 Ras-Raf-MAP-Kinaseweg

4.6.1.1 EGF-induzierte ERK1/2-Aktivierung in HCC-Zellen

Um die Verknüpfung des EGF-Rezeptors mit dem MAP-Kinase-Weg (vgl. **Kap. 1.2.3.1**) und damit auch der ERK1/2 zu demonstrieren, wurden zunächst hungernde, d.h. für 24 h in serumfreien Medium gehaltene HCC-Zellen, für 15 min mit steigenden Mengen EGF stimuliert. Es zeigte sich hierbei sowohl eine dosisabhängige Zunahme der Aktivierung (Phosphorylierung) des EGFR als auch der ERK1/2 (**Abb. 4-12**). Hungernde Zellen wurden gewählt, um die Einflüsse anderer im fötalen Kälberserum vorhandener Wachstumsfaktoren auszuschließen.

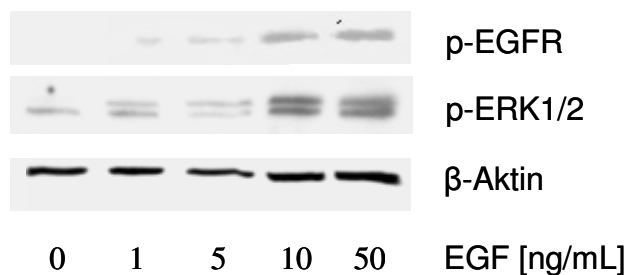


Abbildung 4-12: Effekte des Wachstumsfaktors EGF auf den EGFR und den MAP-Kinase-Weg. Der epidermale Wachstumsfaktor EGF stimuliert dosisabhängig die Phosphorylierung des EGFR und der p44/p42MAPK (ERK1/2) in HepG2-Zellen. Exemplarisch gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=3 unabhängigen Experimenten.

4.6.1.2 Modulation extrazellulär regulierter Kinasen durch EGFR-Blockade

Die EGF-induzierte Aktivierung des EGFR und der ERK1/2 konnte durch Vorbehandlung der Zellen mit Erlotinib unterdrückt werden (**Abb. 4-13**). Hungernde HepG2-Zellen wurden mit steigenden Dosen Erlotinib (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) für 30 min vorbehandelt, anschließend mit 10 ng/mL EGF für 15 min stimuliert und schließlich mittels *Western Blot* die Phosphorylierung von EGFR und ERK1/2 bestimmt. Nicht mit Erlotinib vorbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Erlotinib-unbehandelte Zellen zeigten nach EGF-Zugabe wiederum eine starke Aktivierung von EGFR und ERK1/2 (vgl. **Abb. 4-12**), während bei TKI-vorbehandelten Zellen die Phosphorylierung weitgehend unterdrückt blieb. Die EGF-Rezeptoraktivierung konnte schon mit der geringen Konzentration von 0,1 μ M Erlotinib quantitativ unterdrückt werden, die ERK1/2- Phosphorylierung nahm dosisabhängig ab (**Abb. 4-13**).

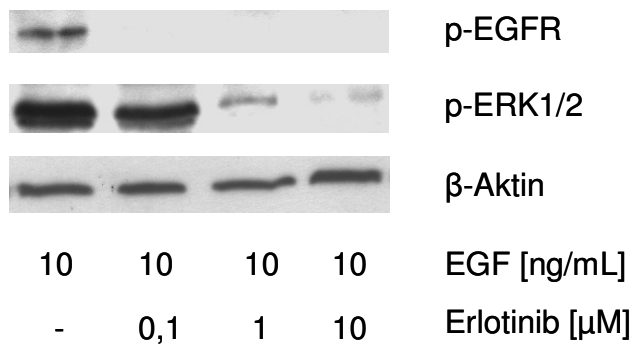


Abbildung 4-13: Erlotinib unterdrückt die Aktivierung des EGFR und der ERK1/2. HepG2-Zellen wurden 30 min mit Erlotinib steigender Konzentrationen vorbehandelt und anschließend mit EGF stimuliert. Erlotinib unterdrückte die Aktivierung des EGFR schon durch kleine Konzentrationen quantitativ. Die Phosphorylierung der ERK1/2 wurde dosisabhängig unterdrückt. Dargestellt ist ein repräsentativer *Western Blot* aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Als nächstes wurde die Kinetik der ERK1/2-Inhibition und damit des MAP-Kinaseweges im Zellkulturmodell unter dem Einfluß der Stimulation der Zellen durch Wachstumsfaktoren des im Medium enthaltenen fötalen Kälberserums untersucht. Bei HepG2-Tumorzellen führte die Behandlung mit EGFR-Inhibitoren zu einer zeit- und dosisabhängigen Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung und damit zu einer Hemmung der mitogenen Signaltransduktion. Die Expression der p44/p42MAPK wurde dagegen durch keinen der Arzneistoffe verändert (**Abb. 4-14**).

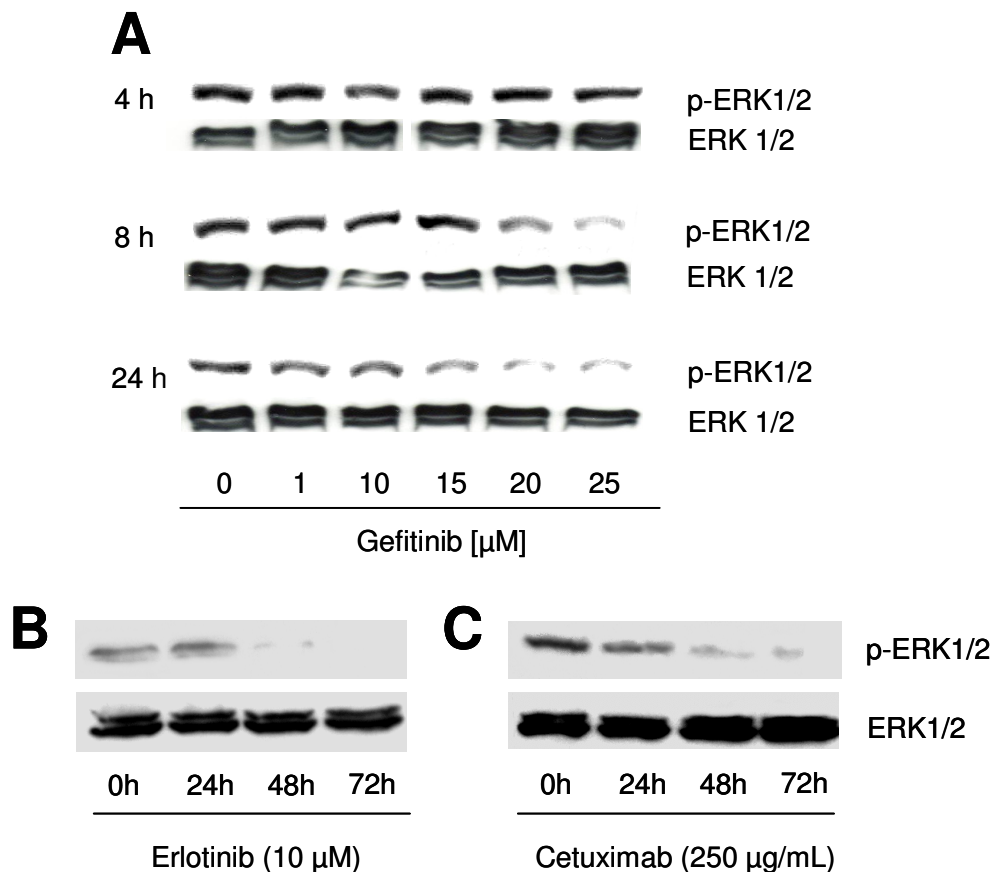


Abbildung 4-14: Unterbrechung des MAP-Kinase-Weges durch Gefitinib, Erlotinib und Cetuximab. Dargestellt ist die zeit- und dosisabhängige Abnahme der ERK1/2-Aktivierung durch Gefitinib (A) bzw. die zeitabhängige Abnahme nach Behandlung mit Erlotinib (10 μM; B) oder Cetuximab (250 μg/mL; C). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer *Western Blot* aus HepG2-Zelllysaten von n=3 unabhängigen Experimenten pro Arzneistoff.

4.6.2 Jak-STAT-Signalweg

Eine Aktivierung des EGFR kann die Autophosphorylierung von **Janus-Kinasen** (Jaks) zur Folge haben, welche wiederum in einer Aktivierung von STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) resultieren kann (siehe **Kap. 1.2.3.2**). Der Einfluß einer EGFR-Blockade auf den Jak-STAT-Signalweg wurde in vorliegender Arbeit erstmals untersucht.

4.6.2.1 EGF-induzierte STAT-Aktivierung in HCC-Zellen

Um zunächst die Expression der STATs 1, 3 und 5 in HCC-Zellen sowie die Funktionalität der EGFR-vermittelten STAT-Aktivierung durch EGF für das untersuchte Zellmodell zu zeigen, wurden serumfrei gehaltene Huh-7-Zellen kurzzeitig (15 min) mit verschiedenen EGF-Konzentrationen inkubiert und der Einfluß der Stimulation auf die Aktivität von STAT1, STAT3 und STAT5 mittels Immunoblot untersucht. Alle drei untersuchten STATs wurden in Huh-7-Zellen exprimiert (**Abb. 4-15**). STAT1 und STAT3 wurden durch Stimulation mittels EGF aktiviert, jedoch konnte im untersuchten Konzentrationsbereich (10 ng/mL, 50 ng/mL) keine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden. Dagegen wurde STAT5 im Zellkulturmodell auch durch die höchste untersuchte EGF-Konzentration nicht aktiviert (**Abb. 4-15 C**).

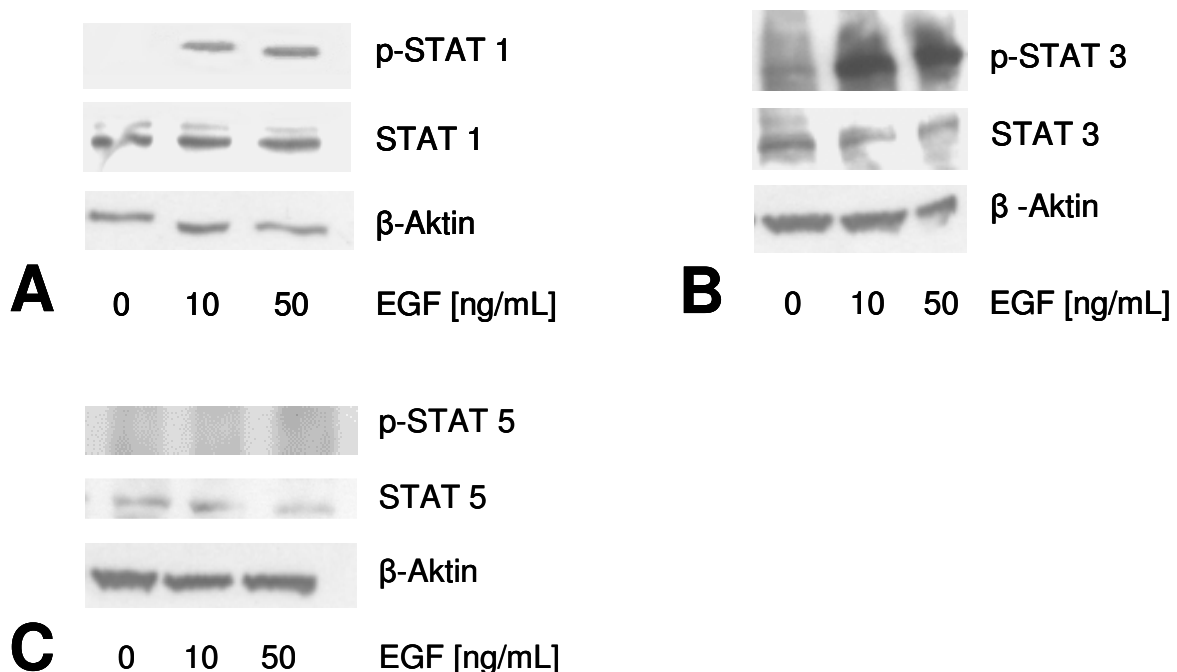


Abbildung 4-15: STAT-Expression und STAT-Aktivierung in HCC Zellen. Mittels *Western Blot* konnte die Expression der drei wichtigsten mit Tumorentstehung und –progression assoziierten *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STATs) gezeigt werden: STAT1 (A), STAT3 (B) und STAT5 (C). Behandlung von Huh-7-Zellen mit EGF resultierte in einer Phosphorylierung von STAT1 und STAT3. STAT5 wurde hingegen nicht aktiviert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer *Western Blot* aus n=3 unabhängigen Experimenten.

4.6.2.2 Modulation der STAT-Aktivierung durch EGFR-Blockade

Effekte einer EGFR-Blockade auf die Expression und Aktivierung von STATs wurden exemplarisch an Huh-7-Zellen untersucht. Da STAT5 durch EGF nicht aktiviert werden konnte, wurden ausschließlich Änderungen der EGF-induzierten STAT1- und STAT3-Aktivierung untersucht. EGF-unstimulierte Zellen und nicht mit Erlotinib vorbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Unstimulierte Zellen zeigten jeweils nur einen geringen Anteil an aktiviertem STAT-Protein, welcher durch Zugabe von 10 ng/mL EGF (15 min) deutlich anstieg. Wurde die EGFR-vermittelte Signaltransduktion durch Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Erlotinib (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M; 30 min) unterbrochen, so war auch die Aktivierung der STATs ab einer Konzentration von 1 μ M Erlotinib deutlich reduziert (**Abb. 4-16**). Die Gesamtmenge von STAT3 und STAT5 blieb hingegen unverändert.

Eine Hemmung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors hat somit verminderte STAT-Aktivität und dadurch verminderte Transkription der durch die STATs regulierten Gene für Zellproliferation und Apoptose zur Folge. Die mitogene Signaltransduktion in hepatozellulären Karzinomzellen über den Jak-STAT-Signalweg wird folglich durch EGFR-Inhibition unterbrochen.

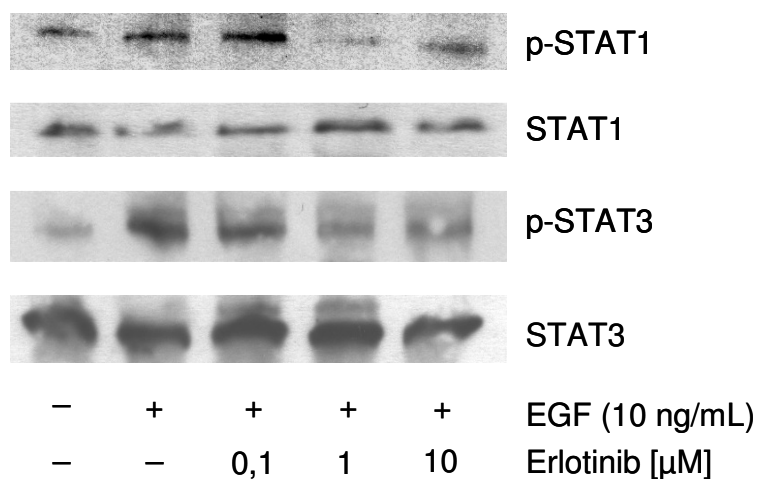


Abbildung 4-16: Hemmung der STAT-Aktivierung durch EGFR-Blockade. Stimulation von Huh-7-Zellen mit 10 ng/mL EGF führt zur Aktivierung von STAT1 und STAT3. Wird die Autophosphorylierung des EGFR durch Vorinkubation mit Erlotinib inhibiert, so wird die Aktivierung der STATs vermindert/unterdrückt. Exemplarisch gezeigt ist jeweils ein repräsentativer *Western Blot* aus n=3 unabhängigen Experimenten.

4.7 Transkriptionelle Effekte der EGFR-Blockade

4.7.1 EGFR-Blockade induziert differentielle Genexpression

Zur Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest ist Protein-*de-novo*-Synthese notwendig. Daher wurde die transkriptionelle Regulation apoptose- und zellzyklusrelevanter Gene mit Hilfe eines *Atlas Human Apoptosis cDNA Expression Arrays* der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA) untersucht.

HepG2-Zellen wurden mit 10 μ M Erlotinib für 48 h behandelt, da unter diesen Bedingungen sowohl eine deutliche Induktion von Apoptose als auch von Zellzyklusarrest festgestellt wurden (vgl. **Kap. 4.4** und **Kap. 4.5**).

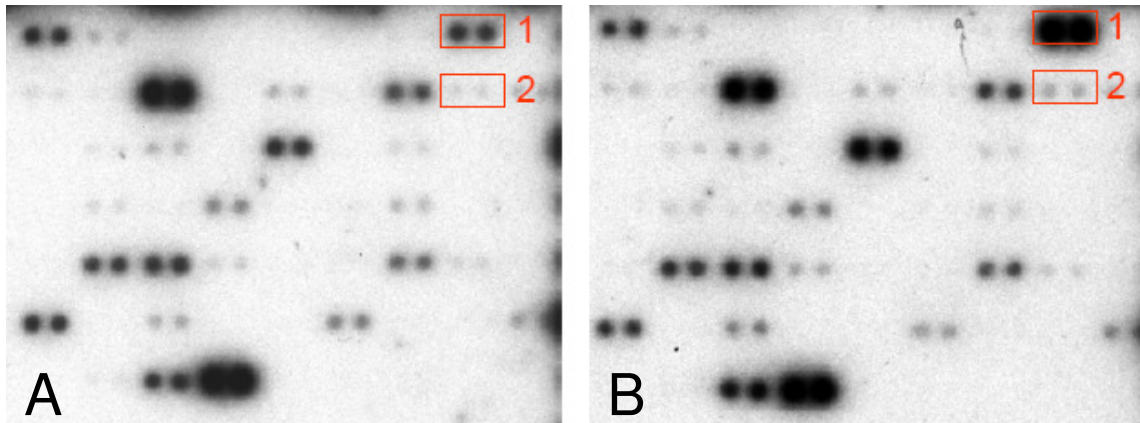


Abbildung 4-17: Beispielhafter Ausschnitt eines cDNA-Expressions-Arrays zur Untersuchung der transkriptinellen Veränderungen in Erlotinib-behandelten HCC-Zellen. Gezeigt ist ein Ausschnitt von 58 Genen, die mit Zellproliferation, Stress und Apoptose assoziiert sind. (A) unbehandelte HepG2-Zellen, (B) Erlotinib-behandelte Zellen. 1=gadd153, 2=gadd45. Die Abbildung gibt ein Einzelergebnis aus n=3 unabhängigen Experimenten an HepG2-Zellen wieder.

In den behandelten HepG2-Zellen wurden 25 Gene gefunden, die im Vergleich zu den Kontrollen differentiell exprimiert wurden (**Tab. 4-1**). Überexprimiert wurden unter anderem Gene, welche für die für den Apoptoseablauf wichtigen Caspasen 3 und 7 kodieren, und die sogenannten gadd-Gene (*growth arrest and DNA damage-inducible*-Gene) gadd153 und gadd45, welche ebenfalls mit Apoptose und Wachstumsarrest assoziiert werden (Liebermann und Hoffman, 2002; Maytin *et al.*, 2001). Desweiteren waren das IGF-2-Bindungsprotein IGFBP-6 überexprimiert sowie Cyclin B1, dessen Regulation für die molekulare Steuerung des Ein- und Austritts in/aus der Mitosephase eine wichtige Rolle spielt (Rieder und Khodjakov, 1997). Supprimiert waren überwiegend Gene, die für Proteine kodieren, welche Zellzyklusprogression fördern (insbesondere den Übergang von der G₁- zur S-Phase des Zellzyklus, z.B. CDK4 oder Cyclin A2). Außerdem waren apoptoseinhibierende Gene wie etwa Bcl-2 oder das JUN-D-Proto-Onkogen supprimiert und das für die DNA-Replikation wichtige *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA).

GenBank ID	Genbezeichnung	Mittelwert [#]	SD
M62402	insulin-like growth factor binding protein 6	5,85	0,73
S66431	retinoblastoma-binding protein 2	3,22	0,39
U13737	caspace 3, apoptosis-related cysteine protease	3,18	0,52
Y09392	TNF-receptor superfamily, member 12	3,04	0,61
M60974	gadd45	2,37	0,34
S40706	gadd153	2,31	0,09
M25753	cyclin B1	2,21	0,47
U37448	caspace 7, apoptosis-related cysteine protease	2,10	0,34
L16785	non-metastatic cells 2, protein (NM23B)	2,03	0,22
U23765	BCL2-antagonist/killer 1	0,53	0,13
X51688	cyclin A2	0,50	0,32
M34065	cell division cycle 25C	0,49	0,06
L22005	cell division cycle 34	0,48	0,17
X85134	retinoblastoma-binding protein 5	0,38	0,12
L25676	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	0,38	0,05
U66879	BCL2-antagonist of cell death	0,36	0,05
D25216	KIAA0014 gene product	0,35	0,14
X86779	Fas-activated serine/threonine kinase	0,30	0,06
L29220	CDC-like kinase 3	0,28	0,03
X74262	retinoblastoma-binding protein 4	0,27	0,09
M14505	cyclin-dependent kinase 4	0,25	0,07
AF010312	LPS-induced TNF-alpha factor	0,24	0,06
U25265	mitogen-activated protein kinase kinase 5	0,22	0,03
M15796	proliferating cell nuclear antigen	0,17	0,03
X56681	jun D proto-oncogene	0,13	0,06

Tabelle 4-1: Differentielle Genexpression von HepG2-Zellen nach Erlotinibbehandlung (grün= überexprimiert, rot= supprimiert).

[#]arithmetisches Mittel der Quotienten (behandelt : unbehandelt) aus n=3 unabhängigen Experimenten.

4.8 Steigerung der Effektivität konventioneller Chemotherapeutika durch EGFR-Blockade

4.8.1 Wachstumshemmung durch TKI in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika

Für eine Reihe von Tumoren ist eine Potenzierung der antineoplastischen Wirkung von konventionellen Zytostatika durch TKIs beschrieben (Forero *et al.*, 2002; Forouzesht *et al.*, 2002; Ratain *et al.*, 2002). Für das HCC wurden bislang keine Untersuchungen zur Wirksamkeit von Zytostatika-TKI-Kombinationen vorgenommen. Vier Zytostatika mit verschiedenen Wirkungsmechanismen, die bei der transarteriellen Chemoembolisation des HCC häufig zum Einsatz kommen (**Kap. 1.1.3.1**), wurden für Kombinationsexperimente mit Erlotinib ausgewählt: Cisplatin, Docetaxel, Doxorubicin (Adriamycin) und der aktive Irinotecanmetabolit SN-38.

In beiden Zelllinien hatte eine Behandlung mit Docetaxel, Doxorubicin bzw. SN-38 bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich eine dosisabhängige Reduktion der Zellproliferation zur Folge (**Abb. 4-18**). Hingegen zeigte Cisplatin bei Huh-7-Zellen erst in relativ hohen Konzentrationen (50 μM) antiproliferative Wirkung (**Abb. 4-18 D**), HepG2-Zellen waren im gesamten Konzentrationsbereich insensitiv gegenüber Cisplatin (**Abb. 4-18 B**).

Die Kombination von Erlotinib mit den zytostatisch wirksamen Arzneistoffen führte bei Huh-7- und HepG2-Zellen zu einer additiven Verstärkung der Zytostatika-induzierten Wachstumsinhibition. Im Falle der Kombination aus Doxorubicin und Erlotinib konnte in Huh-7-Zellen sogar eine deutliche synergistische Wirkung beobachtet werden, welche die errechnete additive Wachstumsinhibition um ungefähr 20% überstieg (**Abb. 4-18 D**). Lediglich die antiproliferative Wirkung von SN-38 in Huh-7-Zellen konnte durch Erlotinib nicht gesteigert werden (**Abb. 4-18 C**).

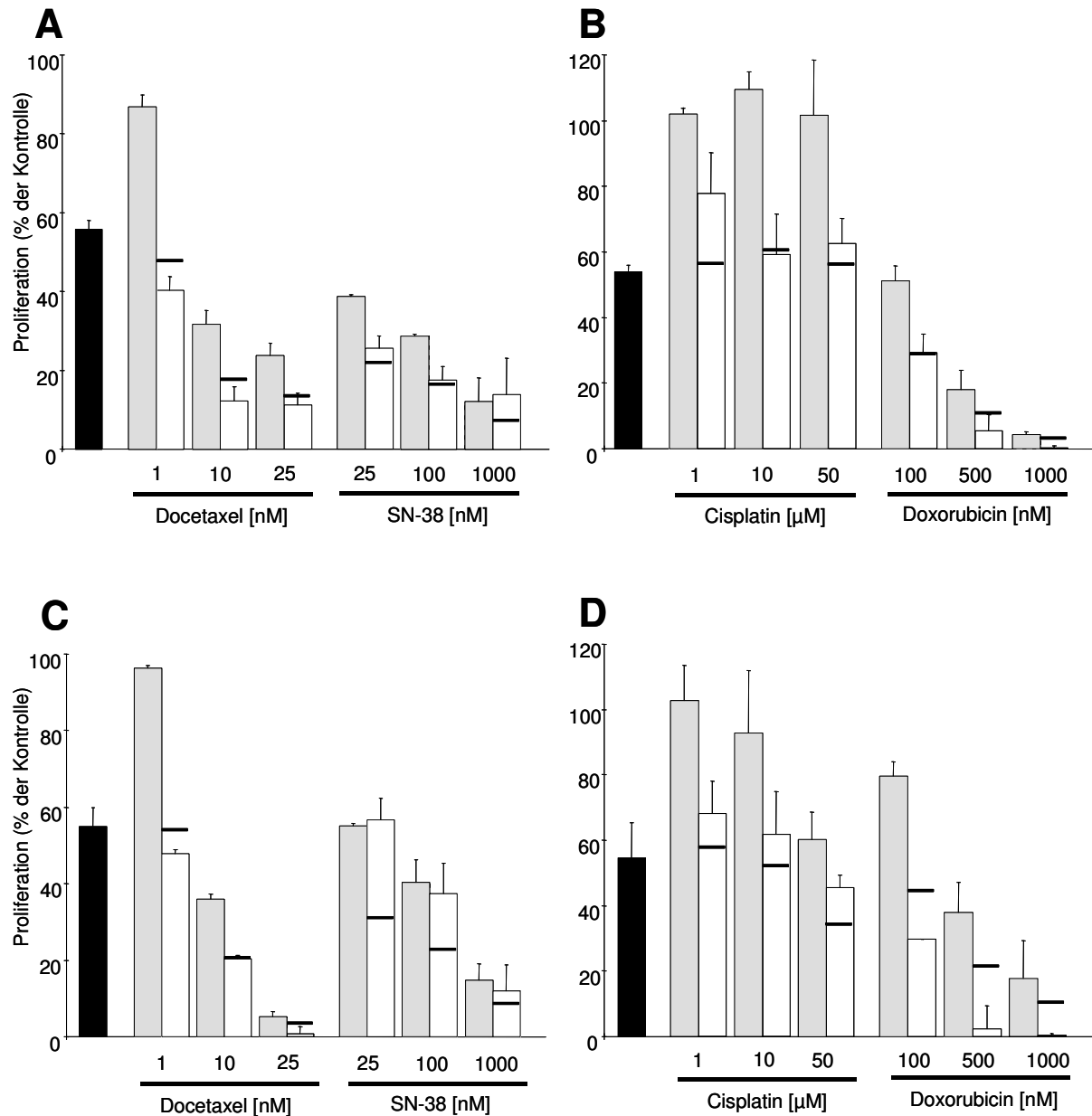


Abbildung 4-18: Erlotinib in Kombination mit konventionellen Zytostatika. HepG2- (A,B) und Huh-7-Zellen (C,D) wurden für 72 h mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin, Docetaxel, Doxorubicin oder SN-38 alleine (graue Balken) oder in Kombination mit jeweils 10 µM Erlotinib behandelt (weiße Balken). Schwarze Balken zeigen die Wirkung von 10 µM Erlotinib alleine, schwarze Querbalken die rechnerische additive Wachstumsinhibition der entsprechenden Kombination. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Versuchen ± SD.

4.8.2 Modulation der Zytostatika-induzierten Apoptose durch Erlotinib

Zur genaueren Charakterisierung der in den Wachstumsversuchen beobachteten Wirkungsverstärkung von Zytostatika durch Erlotinib wurden Apoptoseuntersuchungen durchgeführt. HepG2- und Huh-7-Zellen wurden 24 h mit steigenden Konzentrationen der Zytostatika alleine und unter Zusatz von 10 µM Erlotinib behandelt und anschließend die Enzymaktivität der Caspase-3 bestimmt (vgl. **Kap. 3.1.6.2**).

Die Apoptoseinduktion durch Docetaxel und Doxorubicin wurde in beiden Zelllinien durch Erlotinib signifikant gesteigert. Insbesondere die Kombination aus 1 μM Doxorubicin und 10 μM Erlotinib resultierte jeweils in einer Vervielfachung der Caspase-3-Aktivität verglichen mit der Apoptoseinduktion durch Doxorubicin alleine (**Abb. 4-19 C,F**). Die Kombination von SN-38 und Erlotinib resultierte bei HepG2-Zellen in einer signifikanten Erhöhung der Enzymaktivität (**Abb.4-19 B**) im Vergleich zur SN-38-Monobehandlung. In Huh-7-Zellen hingegen konnte die SN-38-induzierte Caspase-3-Aktivität durch Erlotinib nicht gesteigert werden (**Abb. 4-19 C**). Dieses Ergebnis korrelierte mit den entsprechenden Wachstumsstudien (vgl. **Kap. 4.8.1**).

Cisplatin wirkte weder als Monosubstanz apoptoseinduzierend, noch wurde die Erlotinib-induzierte Caspase-3-Enzymaktivität durch Cisplatin moduliert (nicht gezeigt).

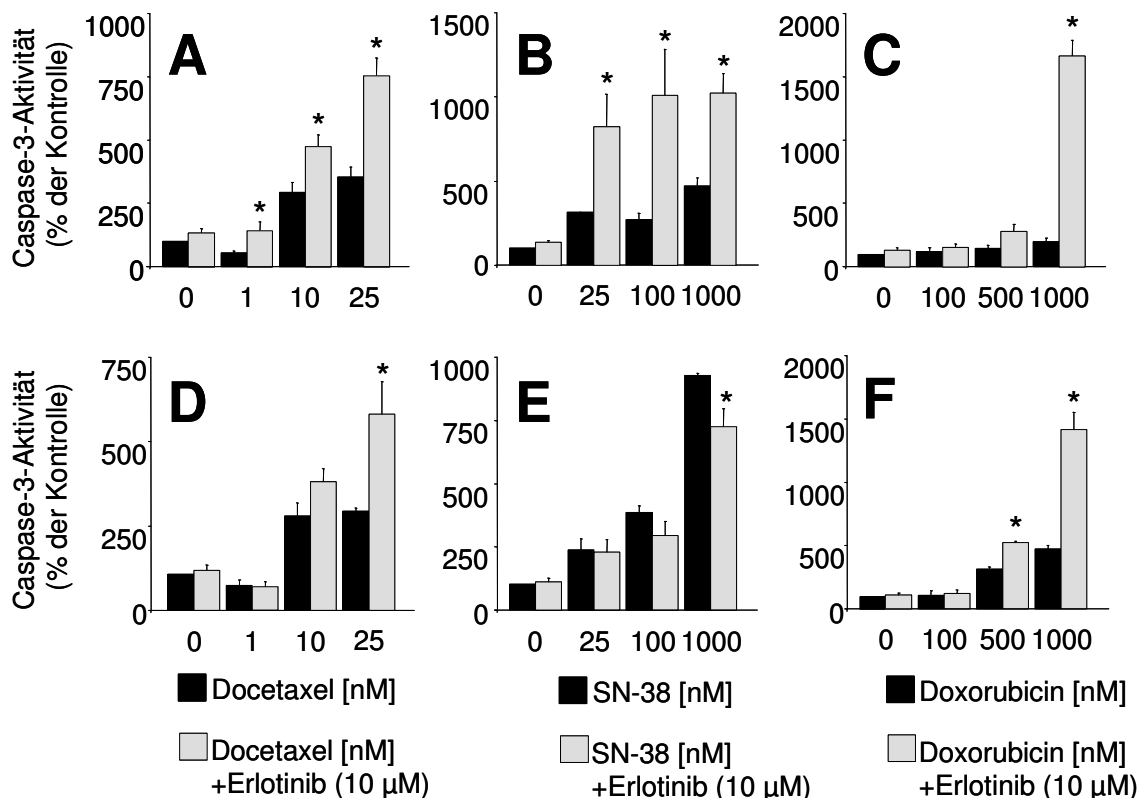


Abbildung 4-19: Modulation der zytostatikainduzierten Apoptose durch Erlotinib. Die Fähigkeit des EGFR-TKI-Erlotinib, die Zytostatika-induzierte Apoptose zu steigern, wurde über fluorometrische Bestimmung der Caspase-3-Enzymaktivität an den hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 (A-C) und Huh-7 (D-F) untersucht. Nach 24 h war mit Ausnahme der Kombination SN-38/Erlotinib bei Huh-7-Zellen (E) bei allen dargestellten Kombinationen eine Verstärkung der Apoptoseinduktion zu beobachten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils vier unabhängigen Versuchen \pm SEM. Die Caspase-3-Aktivität der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. * $p < 0,05$ (Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Zytostatikum-Monobehandlung).

4.8.3 Modulation der Zytostatika-induzierten Zellzyklusmodifikationen durch Erlotinib

Neben Effekten auf die Apoptoseinduktion durch Kombination von Zytostatika und Erlotinib wurde auch der Einfluss entsprechender Kombinationen auf den Zellzyklus untersucht. Hierzu wurden die Tumorzellen mit den unter **Kap. 4.8.1** beschriebenen Arzneistoffkombinationen für 24 h behandelt und anschließend nach Anfärbung mit Propidiumiodid durchflusszytometrisch vermessen (vgl. **Kap. 3.1.7**). Im Folgenden sind Ergebnisse, die an Huh-7-Zellen erhoben wurden, exemplarisch gezeigt (**Abb. 4-20**). Alle Zytostatika hatten modulierende Wirkung auf den Zellzyklus von HCC-Zellen. Entsprechend ihrer Wirkungsweise griffen sie in unterschiedliche Phasen des Zellzyklus ein: Docetaxel und Cisplatin reduzierten den Anteil der Zellen in der G₁/G₀-Phase durch Arrest in der G₂/M-Phase des Zellzyklus, schon geringe nanomolare Konzentrationen von SN-38 (25 nM) führten zum fast vollständigen Arrest der Zellen in der S-Phase (bei gleichzeitiger Verminderung der Zellen der G₁/G₀-Phase). Ähnliche Veränderungen des Zellzyklus wurden durch Doxorubicinbehandlung beobachtet. Wurden die jeweiligen Zytostatika mit 10 µM Erlotinib kombiniert, so wurden für die Kombinationen Cisplatin/Erlotinib, SN-38/Erlotinib sowie Doxorubicin/Erlotinib keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Zytostatika-Monobehandlung beobachtet. Der G₂/M-Arrest durch Docetaxel wurde in Kombination mit Erlotinib hingegen gesteigert. Die Untersuchungen an HepG2-Zellen ergaben ähnliche Ergebnisse und sind hier nicht dargestellt. Auch bei HepG2-Zellen wurden nur die zellzyklusmodulierenden Effekte des Docetaxel gesteigert. Wie aufgrund der Proliferationsstudien (**Kap. 4.8.1**) zu erwarten, führten sowohl Cisplatin als auch die Kombination von Cisplatin und Erlotinib in HepG2-Zellen zu keinen signifikanten Veränderungen des Zellzyklus.

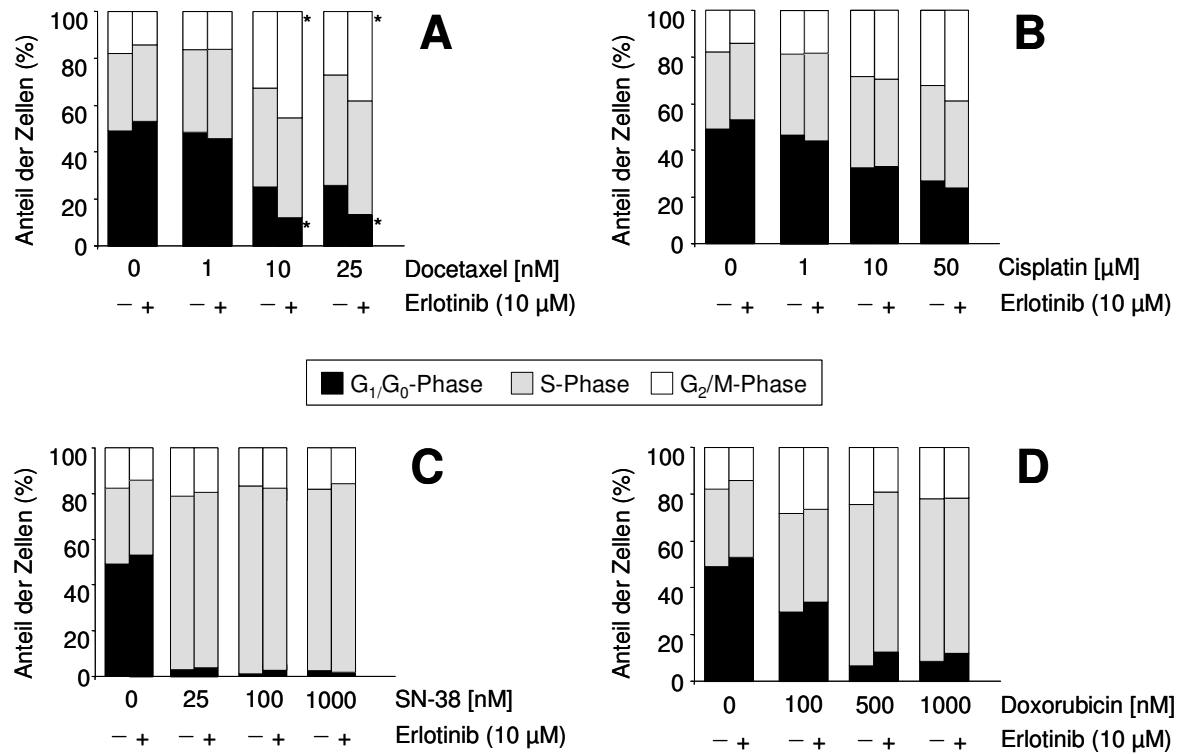


Abbildung 4-20: Modulation des zytostatikainduzierten Zellzyklusarrests durch Kombination mit Erlotinib. Alle untersuchten Zytostatika hatten nach 24-stündiger Behandlung einen modulierenden Effekt auf den Zellzyklus von Huh-7-Zellen zur Folge. Eine signifikante Verstärkung der zellzyklusmodulierenden Effekte der Chemotherapeutika durch Erlotinib konnte nur für Docetaxel gezeigt werden. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei unabhängigen Versuchen \pm SD. * $p < 0,05$ (Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Zytostatikum-Monobehandlung).

4.9 Simultane Blockade von EGFR und IGF-1R als neuartiger Ansatz zur Therapie des HCC

Durch eine Überexpression des IGF-1-Rezeptors und Aktivierung seiner (mitogenen) nachgeschalteten Signalwege sind Tumorzellen offenbar in der Lage, die Blockade des EGFR auszugleichen. Eine simultane Blockade von EGFR und IGF-1R sollte somit zum einen zu einer Wirkungsverstärkung einer anti-EGFR-basierten Therapie führen und zum anderen verminderte Resistenzentstehung unter der Therapie zur Folge haben.

4.9.1 Nachweis des IGF-1R in HepG2- und Huh-7-Zellen

Zunächst wurde die Expression von IGF-1R bei den verwendeten hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 und Huh-7 untersucht. Sowohl auf mRNA-Ebene (RT-PCR) (Abb. 4-21 A) als auch auf Proteinebene (FACS) (Abb. 4-21 B,C) konnte der IGF-1-Rezeptor in beiden Zelllinien nachgewiesen werden.

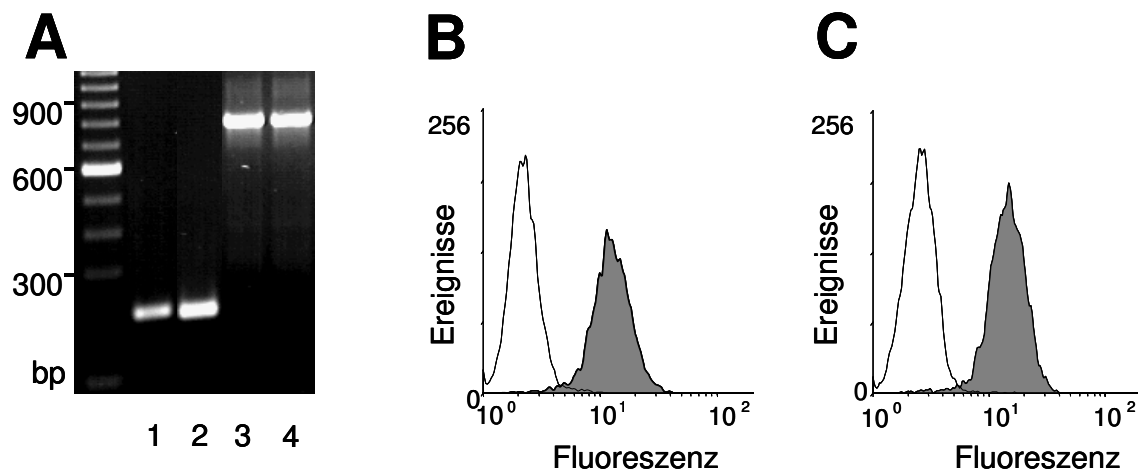


Abbildung 4-21: Nachweis von IGF-1R in HCC-Zelllinien. (A): IGF-1R-mRNA (241 bp) wurde in HepG2- (Spur 1) und Huh-7-Zellen (Spur 2) durch RT-PCR nachgewiesen. Die Expression des *housekeeping*-Gens β -Actin (822 bp; HepG2: Spur 3, Huh-7: Spur 4) diente der Standardisierung. M= 100 bp-Leiter. (B,C): Das IGF-1R-Protein wurde in HepG2- (B) und Huh-7-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen (graue Fläche). Schwarze Linie: Isotypenkontrolle.

4.9.2 IGF-1 (*Insulin-like growth factor*)-induzierte Modulation des MAP-Kinase-Weges und Kreuzaktivierung des EGFR

Zum Nachweis mitogener Effekte von IGF-1 bei HCC-Zellen wurde die Aktivierung der p42/p44MAPK (ERK1/2) als wichtiges Signalprotein des MAP-Kinasewegs (**Kap. 1.2.3.1**) untersucht. Zusätzlich wurde evaluiert, ob über Kreuzaktivierungsmechanismen eine IGF-1R-vermittelte Aktivierung des EGFR stattfinden kann. Für die Untersuchungen wurden hungernde HepG2-Zellen für 15 min mit IGF-1 in steigender Konzentration (50 – 250 ng/mL)

stimuliert und anschließend mittels *Western Blot* die Phosphorylierung von ERK1/2 und EGFR bestimmt. Durch Stimulation mit IGF-1-Konzentrationen von >50 ng/mL konnte eine dosisabhängige Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 gefunden werden. Darüber hinaus wurde durch IGF-1 auch der EGFR aktiviert (**Abb. 4-22**).

Der IGF-1R kann folglich den EGFR kreuzaktivieren. Die mitogene Stimulation durch IGF-1R-Aktivierung wird wie diejenige durch EGFR-Aktivierung ebenfalls über den Ras-Raf-MAP-Kinaseweg vermittelt.

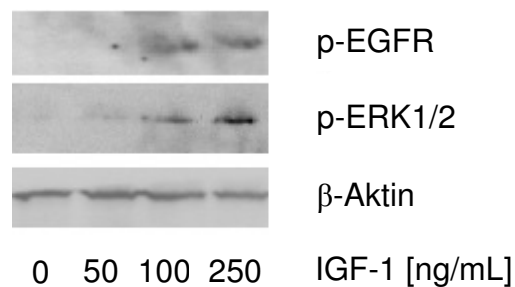


Abbildung 4-22: IGF-1 aktiviert ERK1/2 und kreuzaktiviert den EGF-Rezeptor von HCC-Zellen. Hungernde HepG2-Zellen wurden 15 min lang mit steigenden IGF-1-Konzentrationen behandelt. Die Zelllysate wurden mittels Immunoblot untersucht. ERK1/2 wurde durch IGF-1 phosphoryliert, außerdem erfolgte eine Kreuzaktivierung des EGFR. Exemplarisch gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus n=3 unabhängigen Experimenten.

4.9.3 Modulation der EGF/ IGF-1-induzierten EGFR-Aktivierung durch Erlotinib

In weiteren Experimenten wurden die Effekte von Erlotinib auf die EGF- bzw. IGF-1-induzierte EGFR- und ERK1/2-Aktivierung untersucht.

Erlotinib-vorbehandelte (30 min, 10 μ M) HepG2-Zellen wurden jeweils mit EGF (10 ng/mL) und/oder IGF-1 (100 ng/mL) für jeweils 15 min stimuliert. Unstimulierte hungernde Zellen dienten als Kontrolle. Wie schon in vorhergehenden Experimenten (vgl. **Kap. 4.6.1.1.**) konnte durch EGF sowohl der EGFR als auch die ERK1/2 aktiviert werden. IGF-1-Stimulation führte wiederum zur Transaktivierung des EGFR und der ERK1/2 (**Kap. 4.9.2**). Erwartungsgemäß wurden auch durch die Kombination der Wachstumsfaktoren beide Proteine aktiviert. Vorbehandlung von HepG2-Zellen mit Erlotinib (10 μ M) unterdrückte die Phosphorylierung des EGFR durch Stimulation mit EGF, IGF-1 bzw. EGF/IGF-1 komplett. Auch die Aktivierung von ERK1/2 blieb unter dem Basalwert der Kontrolle (**Abb. 4-23**). Der EGFR-TKI Erlotinib unterdrückt somit nicht nur die durch EGF vermittelten, sondern über eine Hemmung des Rezeptor „*cross-talks*“ auch die IGF-1 vermittelten mitogenen Stimuli.

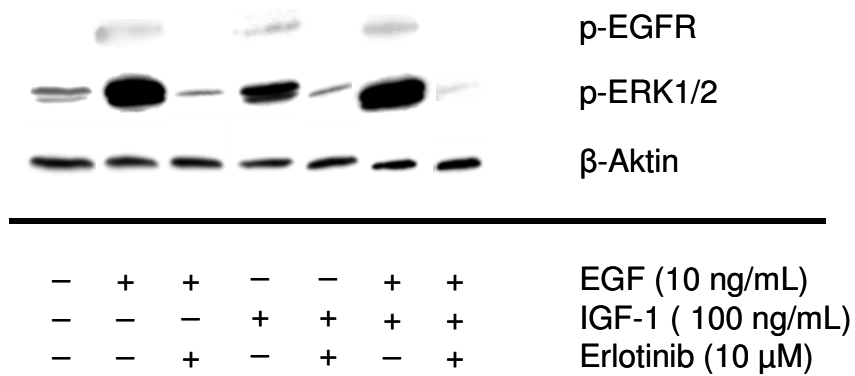


Abbildung 4-23: Erlotinib unterdrückt die EGF- und IGF-1-vermittelte Aktivierung des EGFR und der ERK1/2. Die EGF- bzw. IGF-1-vermittelte Aktivierung des EGFR und der ERK1/2 wird durch Vorbehandlung mit Erlotinib unterdrückt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer *Western Blot* aus n=3 unabhängigen Experimenten.

4.9.4 Wachstumshemmung durch simultane Blockade von EGFR und IGF-1R

Aufbauend auf den erzielten Ergebnissen wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob eine simultane Blockade von EGFR und IGF-1R zu einer antiproliferativen Wirkungsverstärkung bzw. zur Resistenzüberwindung des anti-EGFR-basierten Therapieansatzes führt. Als Modellsubstanz zur Blockade der Tyrosinkinase des IGF-1R diente das Tyrphostin AG1024, welches zur TK des IGF-1 Rezeptors eine deutlich höhere Affinität als zur TK des Insulinrezeptors besitzt. HepG2- und Huh-7-Zellen wurden mit dem anti-EGFR-Mab Cetuximab (500 oder 1000 μg/mL) unter Zusatz von 5 μM AG1024 behandelt (**Abb. 4-24 AB**). Als weitere Kombination wurde die simultane Behandlung der Zellen mit Erlotinib (10 μM) und 5 oder 10 μM AG1024 untersucht (**Abb. 4-24 CD**). Alle Kombinationen resultierten in einer gegenüber der Behandlung mit einer Substanz gesteigerten Hemmung der Proliferation. Huh-7-Zellen reagierten sensitiver gegenüber AG1024 als HepG2-Zellen. Besonders interessant war die Wirkung der Cetuximab/AG1024-Kombination auf Huh-7-Zellen (**Abb. 4-24 B**). Obwohl das Wachstum von Huh-7-Zellen nur schwach durch Cetuximab gehemmt wurde, konnte durch die gleichzeitige IGF-1R-Blockade eine ausgeprägte synergistische Hemmung des Tumorzellwachstums erzielt werden.

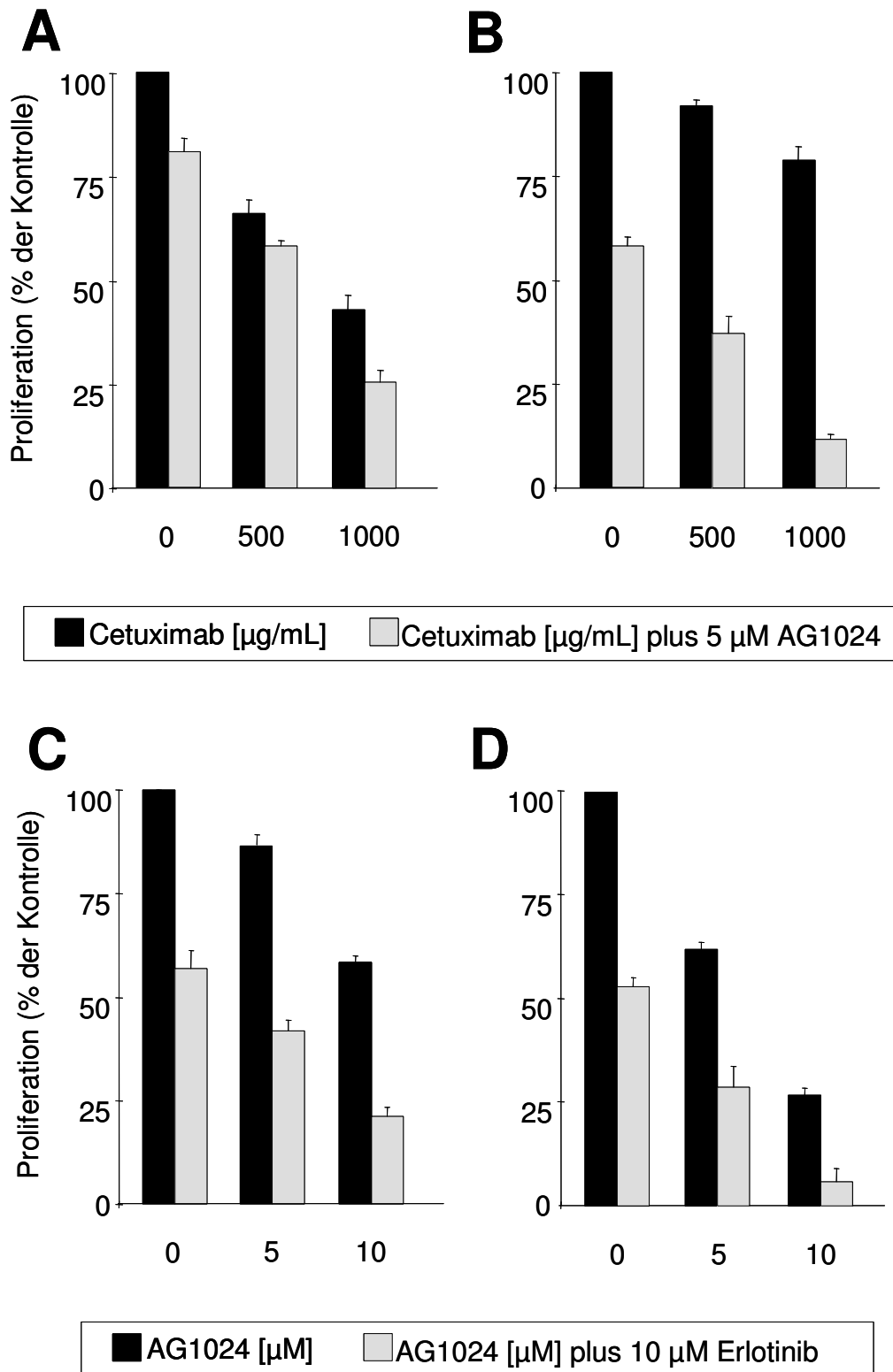


Abbildung 4-24: Simultane Blockade von EGF- und IGF-1-Rezeptor. Die hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 (A,C) und Huh-7 (B,D) wurden mit Cetuximab (A,B) oder Erlotinib (C,D) und dem IGF-1R-TKI AG1024 72 h lang behandelt. Die simultane Blockade beider Wachstumsfaktorrezeptoren war der Hemmung nur eines Rezeptors überlegen und resultierte teilweise sogar in deutlich überadditiven Effekten. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Mittelwerte aus jeweils n=3 unabhängigen Versuchen \pm SEM.

4.10 Wachstumshemmung durch duale Blockade des EGF-Rezeptors

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Effektivität von anti-EGFR-basierten Therapieansätzen besteht in der dualen Blockade des EGFR. Darunter versteht man die gleichzeitige Hemmung der extrazellulären ligandenbindenden Domäne des EGFR mittels anti-EGFR-Antikörpern (z.B. Cetuximab) und der intrazellulären autophosphorylierenden EGFR-Tyrosinkinase mittels TKI (z.B. Erlotinib) (Huang *et al.*, 2004; Matar *et al.*, 2004). Für hepatozelluläre Tumoren wurde dieser Ansatz bisher noch nicht verfolgt. Die gleichzeitige Inkubation von HCC-Zellen mit Cetuximab (10 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Erlotinib (10 μM) resultierte in einer additiven Wachstumshemmung von HepG2- und Huh-7-Tumorzellen (**Abb. 4-25**).

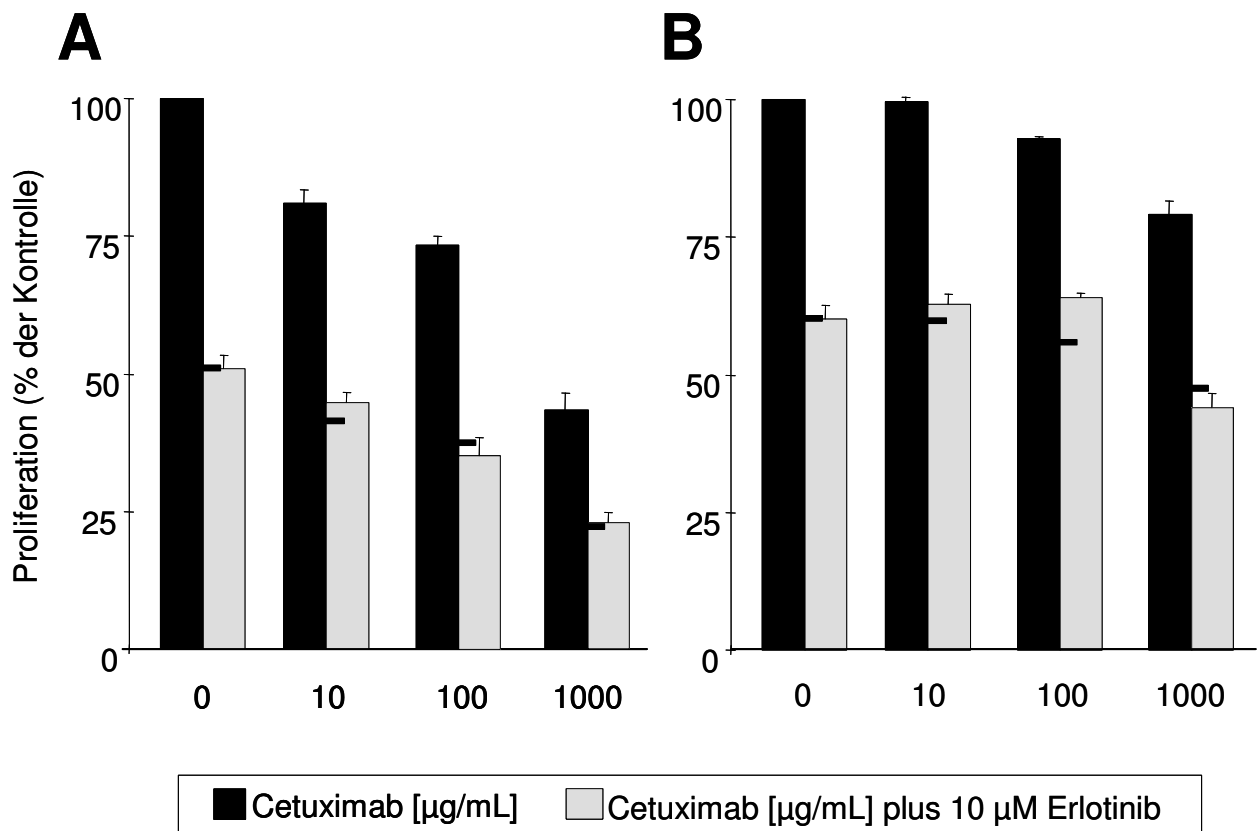


Abbildung 4-25: Duale Blockade von ligandenbindender Domäne und intrazellulärer Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors. HepG2- (A) und Huh-7-Zellen (B) wurden mit Cetuximab (10 - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Erlotinib (10 μM) für 72 h behandelt. Die duale EGFR-Blockade resultierte in einer Addition der Effekte der beiden Verbindungen. Der rechnerische additive Wert ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Mittelwerte aus $n=3$ unabhängigen Versuchen \pm SEM.

4.11 Ösophaguskarzinom

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf weitere Tumoren des Gastrointestinaltraktes zu überprüfen, wurden ausgewählte Untersuchungen exemplarisch an humanen ösophagealen Zelllinien sowie Biopsien von humanen Ösophaguskarzinomen untersucht. Das Ösophaguskarzinom umfasst alle malignen epithelialen Tumore im Bereich der Speiseröhre. Es existieren zwei histologische Typen: Das weltweit am häufigsten auftretende Plattenepithel- und das in westlichen Ländern rasch zunehmende Adenokarzinom (Koshy *et al.*, 2004). Die Prognose ist mit einer 5-Jahre-Überlebensrate von <10% ungünstig.

4.11.1 EGFR- und IGF-1R-Expression in humanen Ösophaguskarzinomen

Für die humanen Ösophaguskarzinomzelllinien Kyse-30 (Spuren 1, 4 und 7), Kyse-70 (Spuren 2, 5 und 8) und Kyse-140 (Spuren 3, 6 und 9) konnten mittels RT-PCR Transkripte von IGF-1R (Spuren 1 - 3) und EGFR (Spuren 4 - 6) nachgewiesen werden (**Abb. 4-26**). Die Mutante EGFRvIII wurde nicht detektiert (Spuren 10 – 12; vgl **Kap. 4.1.2**).

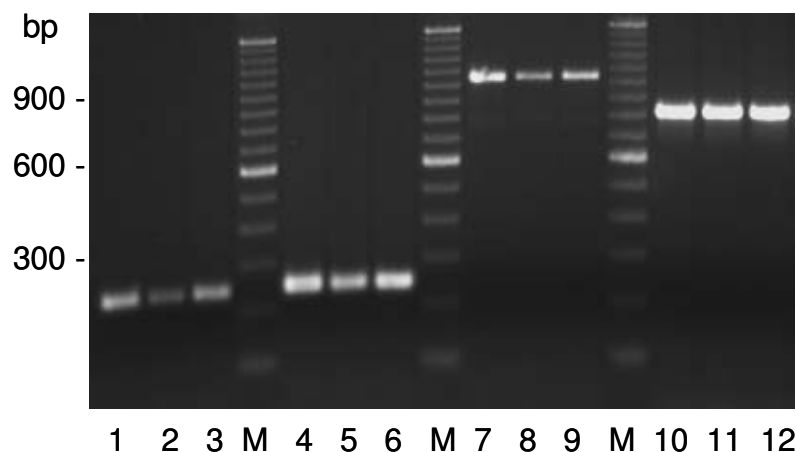


Abbildung 4-26: Nachweis von EGFR und IGF-1R-Transkripten in humanen Ösophaguskarzinomzelllinien. IGF-1R (1 – 3; 241 bp) und EGFR (4 – 6; 240 bp) wurden in Kyse-30 (1, 4, 7, 10), Kyse-70 (2, 5, 8, 11) und Kyse-140-Zellen (3, 6, 9, 12) durch RT-PCR nachgewiesen. EGFR-vIII mRNA (7 – 9; 226 bp) war für alle Zelllinien nicht nachweisbar. Die in den Spuren zu erkennenden Banden sind dem Wildtyp-EGFR zuzuordnen, der mit dem verwendeten Primer Transkripte von 1028 bp bildet. Die Expression des *housekeeping*-Gens β -Aktin (10 – 12; 822 bp) diente der Standardisierung. M= 100 bp-Leiter.

Analog zu **Kap. 4.1.3** und **Kap. 4.9.1** wurde die Proteinexpression des EGFR und des IGF-1R in allen Ösophaguskarzinom-Zelllinien durchflusszytometrisch nachgewiesen (**Abb. 4-27**).

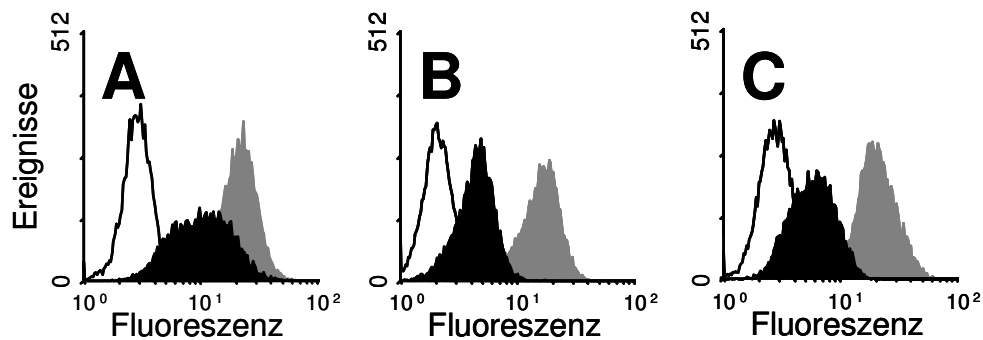


Abbildung 4-27: Nachweis der EGFR- und IGF-1R-Proteine in humanen Ösophaguskarzinomzellen. Das EGFR- (schwarze Fläche) und das IGF-1R-Protein (graue Fläche) wurde in Kyse-30 (A), Kyse-70 (B) und Kyse-140-Zellen (C) durchflusszytometrisch nachgewiesen. Schwarze Linie: Isotypenkontrolle.

4.11.2 Hemmung der Proliferation von Ösophaguskarzinomzellen durch EGFR-Inhibition

4.11.2.1 Hemmung der Proliferation von Ösophaguskarzinomzelllinien durch Erlotinib

Ähnlich wie bei HCC-Zellen (**Kap. 4.2**) bewirkte die Behandlung von Ösophaguskarzinomzellen mit Erlotinib eine zeit- und dosisabhängige Wachstumsinhibition (**Abb. 4-28**). Die Sensitivität der verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien zeigte dabei aber erhebliche Unterschiede: So lagen die IC_{50} -Werte nach 96 h bei $13,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (Kyse-30), $19,2 \pm 01,1 \mu\text{M}$ (Kyse-70) und $0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Kyse-140).

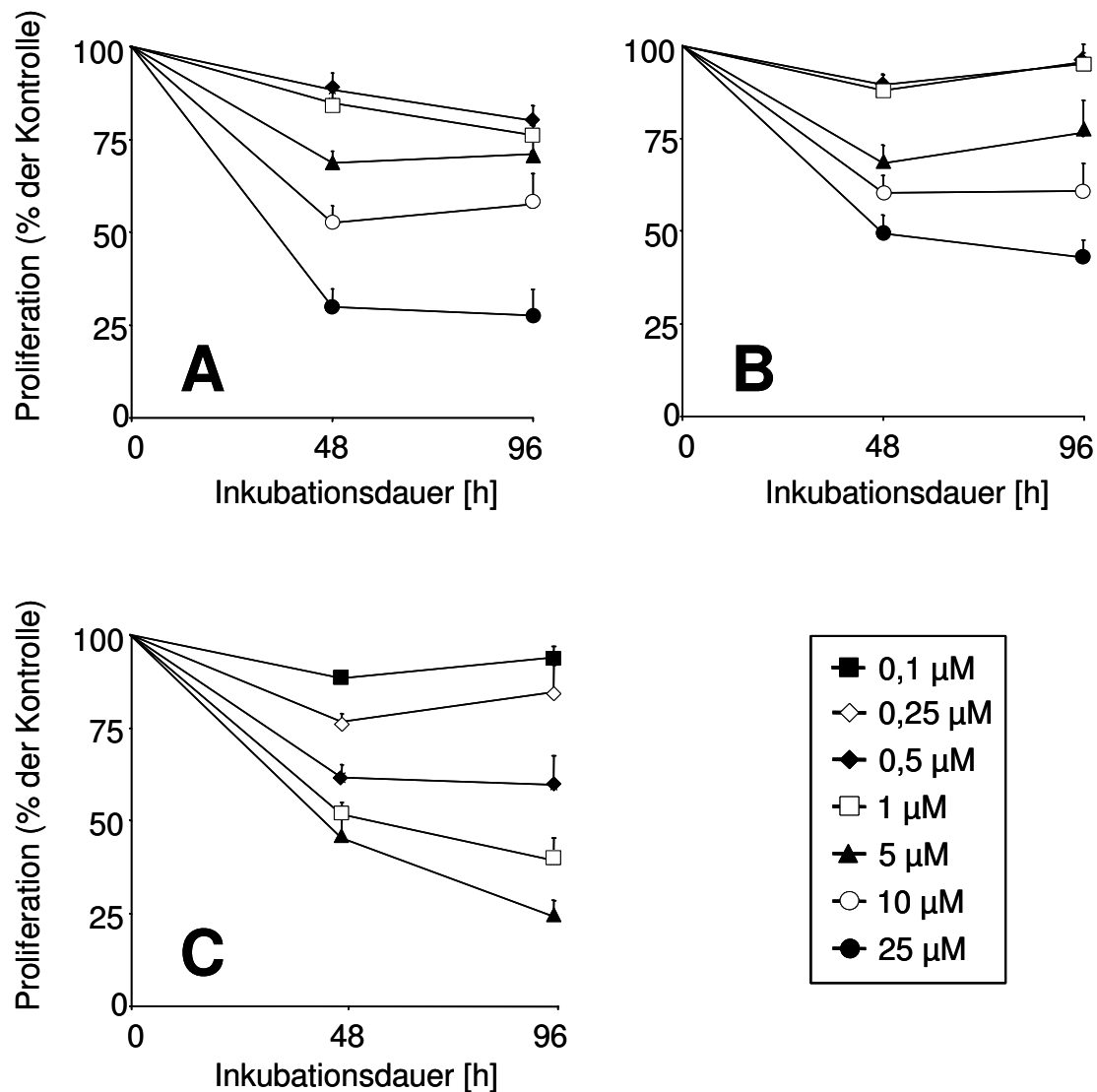


Abbildung 4-28: Erlotinib-induzierte Wachstumsinhibition bei Ösophaguskarzinomzellen. Erlotinib hemmte zeit- und dosisabhängig das Wachstum von Kyse-30- (A), Kyse-70- (B) und Kyse-140-Zellen (C). Nach viertägiger Inkubation mit Erlotinib sanken die Zellzahlen um 72% (Kyse-30, 25 µM), 57% (Kyse-70, 25 µM) bzw. 76% (Kyse-140, 5 µM) im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen \pm SEM. Signifikante Wachstumshemmung ($p < 0,05$) gegenüber den Kontrollen konnte für Konzentrationen $> 5 \mu\text{M}$ (Kyse-30, Kyse-70) bzw. $> 0,5 \mu\text{M}$ (Kyse-140) gezeigt werden.

4.11.2.2 Hemmung der Proliferation primärer Ösophaguskarzinomzellen durch Erlotinib

Um besonders patientennahe Modelle zu untersuchen, wurden aus endoskopischen Tumorbiopsaten von 5 Patienten (vier Männer, eine Frau; mittleres Alter 61 ± 12 Jahre) Ösophaguskarzinom-Primärzellkulturen angelegt (2 Adenokarzinome und 3 Plattenepithelkarzinome). Die Primärzellkulturen wurden einer Erlotinib-Behandlung ($5 \mu\text{M}$, 72 h) unterzogen. Proliferationseffekte wurden durch direkte Zellzählung (Neubauer Zählkammer/Trypanblau, **Kap. 3.1.4.2**) bestimmt und ergaben im Vergleich zur jeweils

unbehandelten Primärkultur eine Abnahme der Zellzahl um $63,7\% \pm 12,7\%$. Eines der drei Plattenepithelkarzinom zeigte sich im *ex-vivo*-Versuch allerdings mit $<5\%$ Wachstumsinhibition insensitiv gegenüber Erlotinib.

Der antineoplastische Effekt von Erlotinib auf die untersuchten Primärkulturzellen zeigte sich nicht nur in einer Abnahme der Zellzahl, sondern auch in einer Zunahme des Anteils toter Zellen. Diese wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Mit der in **Kap. 3.3.7** beschriebenen Methode können lebende Zellen hierbei über Grünfluoreszenz (Kontrolle: **Abb. 4-29 C**), tote Zellen über Rotfluoreszenz (Erlotinib-behandelte Zellen: **Abb. 4-29 D**) detektiert werden. Außerdem konnten durchlichtmikroskopisch deutliche morphologische Änderungen der Zellen infolge der Inkubation mit Erlotinib gezeigt werden (**Abb. 4-29 A,B**).

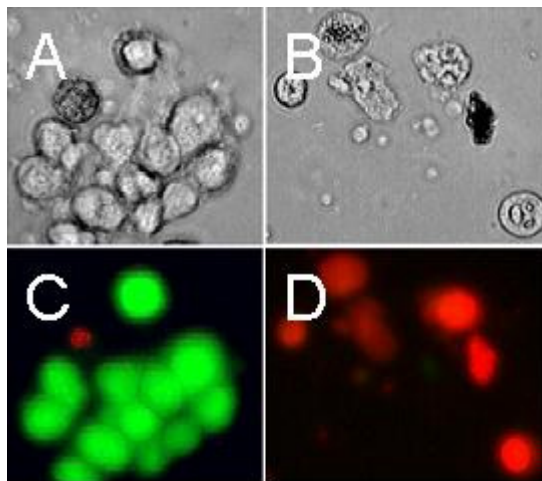


Abbildung 4-29: Zunahme des Anteils toter Zellen von Ösophaguskarzinom-Primärzellkulturen durch Behandlung mit Erlotinib. Zellen aus Primärkulturen ösophagealer Biopsien wurden 72 h mit $5 \mu\text{M}$ Erlotinib behandelt und anschließend mittels *Live/Dead*-Assay untersucht. Lebende Zellen werden hierbei über Grünfluoreszenz, tote über Rotfluoreszenz detektiert. Oben: Unbehandelte (A) und Erlotinib-behandelte Primärkulturzellen (B) im Durchlicht. Unten: Unbehandelte (C) und behandelte Zellen (D) im Fluoreszenzlicht. Dargestellt ist eine repräsentative Abbildung aus $n=4$ Erlotinib-sensitiven Präparaten.

4.11.3 Keine Apoptoseinduktion in Ösophaguskarzinomzellen durch Erlotinib

Im Gegensatz zu den bei HCC-Zellen detektierten proapoptotischen Effekten von Erlotinib (vgl. **Kap. 4.4.2** und **4.4.3**) konnte bei den untersuchten Ösophaguskarzinomzellen keine Erlotinib-induzierte Apoptose detektiert werden. Nach 24 - 96-stündiger Behandlung von Kyse-Ösophaguskarzinomzellen mit Erlotinib (Kyse-30 und Kyse-70: $1 - 25 \mu\text{M}$; Kyse-140: $0,1 - 5 \mu\text{M}$) konnten in keiner Zelllinie Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials oder -volumens, sowie keine Änderungen der Caspase-3-Aktivität oder DNA-Fragmentierungen festgestellt werden (ohne Abbildung). Auch konnten durch Färbung der Zellen mit Propidiumiodid und anschließende durchflusszytometrische Messung keine für apoptotische Zellen typische *Sub-G₁-Peaks* detektiert werden (**Abb. 4-32**).

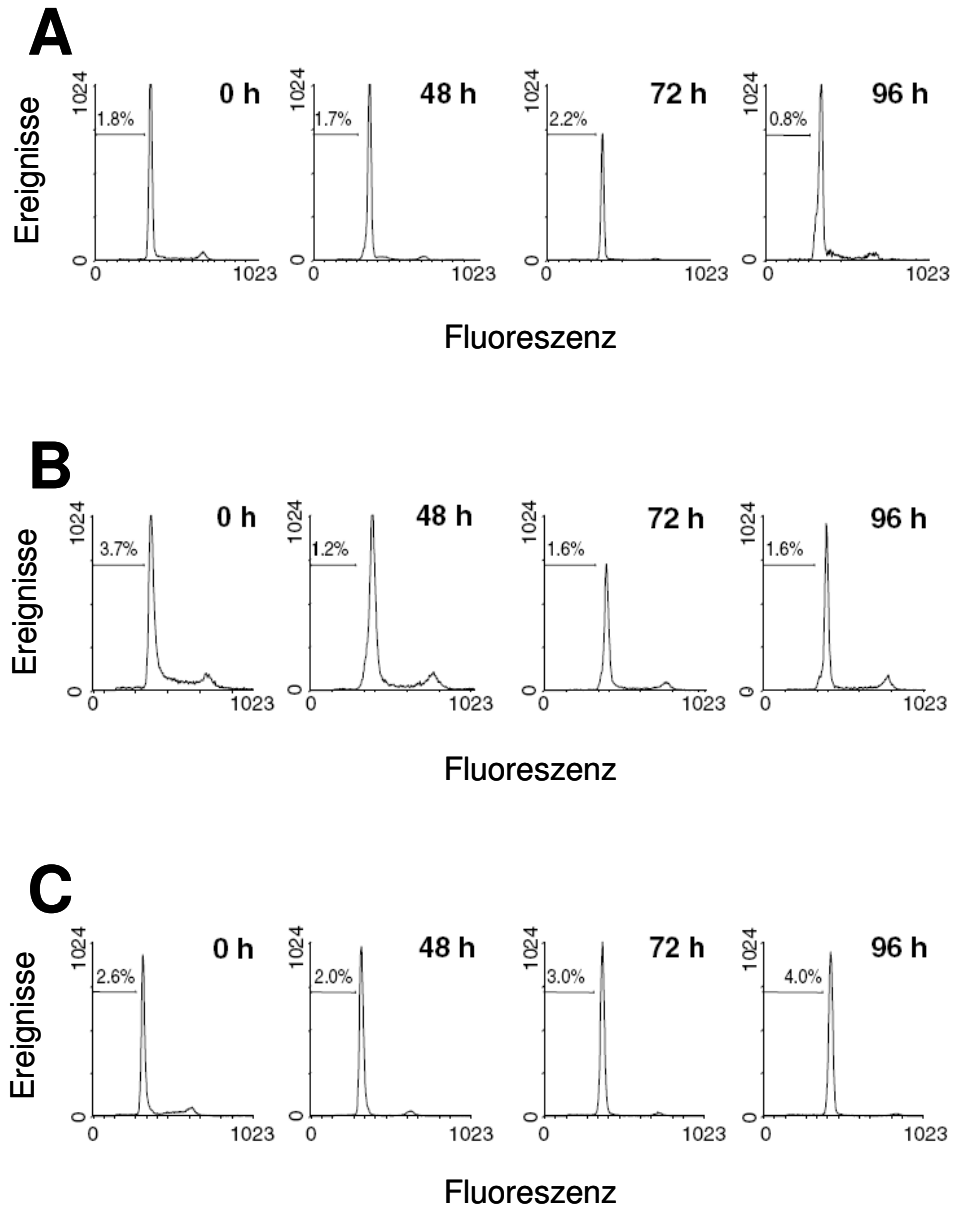


Abbildung 4-32. Erlotinib induziert keine Apoptose in Ösophaguskarzinomzellen. Kyse-30- (A), Kyse-70- (B) und Kyse-140-Zellen (C) wurden 48 – 96 h mit Erlotinib (A,B: 25 μ M; C: 5 μ M) behandelt. In keiner Zelllinie konnte eine Zunahme des apoptosespezifischen *Sub-G₁-Anteils* detektiert werden (siehe prozentuale Angaben im jeweiligen Histogramm). Repräsentative Histogramme aus jeweils drei unabhängigen Experimenten.

4.11.4 Zellzyklusuntersuchungen an Ösophaguskarzinomzellen

Nach 24-stündiger Inkubation von Kyse-Ösophaguskarzinomzelllinien war eine dosisabhängige Akkumulation der Zellen in der G₁/G₀-Phase zu beobachten, welche bei Kyse-140 am stärksten ausgeprägt war. Gleichzeitig sank der Anteil der Zellen in der S-Phase. Der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase blieb weitgehend unverändert (**Abb. 4-30**).

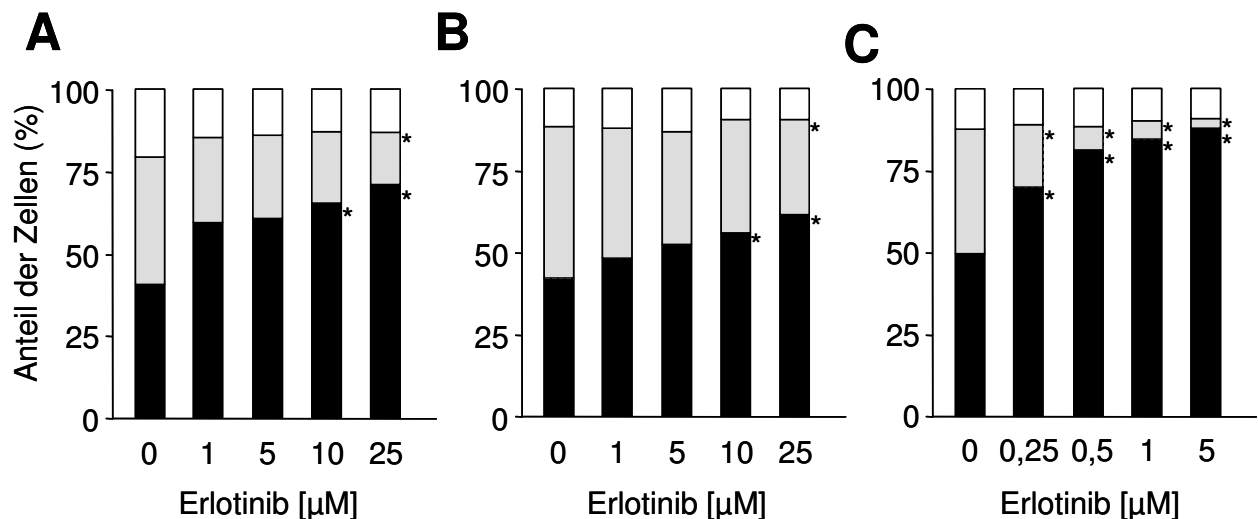


Abbildung 4-30: Zellzyklusarretierung von Ösophaguskarzinomzellen durch Erlotinib. Nach 24-stündiger Behandlung von Kyse-30- (A), Kyse-70- (B) und Kyse-140-Zellen (C) mit Erlotinib akkumulierten die Zellen in der G₁/G₀-Phase (schwarze Balken) des Zellzyklus. Der Anteil der Zellen in der S-Phase (graue Balken) nahm parallel dazu ab, der entsprechende Anteil in der G₂/M-Phase (weiße Balken) blieb fast unverändert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils n=4 unabhängigen Versuchen. *p<0,05

Zur molekularbiologischen Charakterisierung der beobachteten Zellzyklusalterationen wurden Veränderungen der Expression von Zellzyklusregulatoren an Kyse-140-Zellen durch *Western Blots* untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 0,5 – 5 µM Erlotinib zeigte sich eine Abnahme der Expression des Zellzykluspromoters Cyclin D1, während die Zellzyklusinhibitoren p21^{Waf1/CIP1} und p27^{Kip1} verstärkt exprimiert wurden (**Abb. 4-31**).

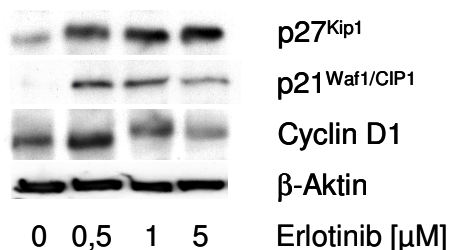


Abbildung 4-31: Erlotinib-induzierte Expression zellzyklusregulierender Proteine in Ösophaguskarzinomzellen. Kyse-140-Zellen wurden 24 h mit steigenden Konzentrationen Erlotinib behandelt. Die Expression des Zellzykluspromoters Cyclin D1 wurde supprimiert, während die Expression der Zellzyklusinhibitoren p27^{Kip1} und p21^{Waf1/CIP1} gesteigert war. Repräsentatives Ergebnis aus n=3 unabhängigen Experimenten.

4.11.5 Erlotinib-induzierte Hemmung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und des MAP-Kinaseweges in Ösophaguskarzinomzellen

In Analogie zu den in **Kap. 4.6.1** beschriebenen Versuchen wurde der Einfluß der EGFR-Blockade auf die Autophosphorylierung des EGFR sowie auf den mitogenen MAP-Kinaseweg untersucht. Hierfür wurden die besonders Erlotinib-sensitiven Kyse-140-Zellen für 24 h mit 0,5 – 5 μ M Erlotinib behandelt. **Abbildung 4-33** zeigt die dosisabhängige Abnahme der phosphorylierten Form von EGFR und ERK1/2.

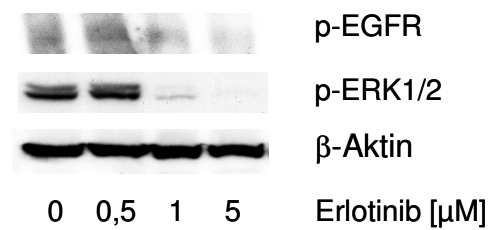


Abbildung 4-33: Erlotinib unterdrückt die Aktivierung des EGFR und der ERK1/2. Kyse-140-Zellen wurden 24 h mit Erlotinib behandelt. Der EGFR-TK-Inhibitor hemmt in Ösophaguskarzinomzellen dosisabhängig die Phosphorylierung des EGFR und des ihm nachgeschalteten mitogenen MAPK-Weges. Repräsentatives Ergebnis aus n=3 unabhängigen Experimenten.

4.11.6 Simultane Blockade von EGFR und IGF-1R in Ösophaguskarzinomzellen

Kyse-Zellen exprimieren genau wie HCC-Tumorzellen den IGF-1R (vgl. **Kap. 4.9.1** und **Kap. 4.11.1**): Auf Basis der beobachteten Sensitivitätssteigerung durch simultane Blockade von EGFR und IGF-1R bei hepatozellulären Karzinomzellen wurden analoge Kombinationen von Erlotinib und dem Tyrphostin AG1024 an Kyse-70-Zellen getestet. IGF-1R-Blockade durch AG1024 (10 μ M) allein zeigte nach drei Tagen nur eine schwache Wachstumshemmung in Kyse-70-Zellen. Die Kombination von AG1024 (10 μ M) und sub- IC_{50} -Konzentrationen Erlotinib (5 μ M oder 10 μ M) ergab hingegen ausgeprägte antiproliferative Effekte, die sogar leicht überadditiv waren (**Abb. 4-34**).

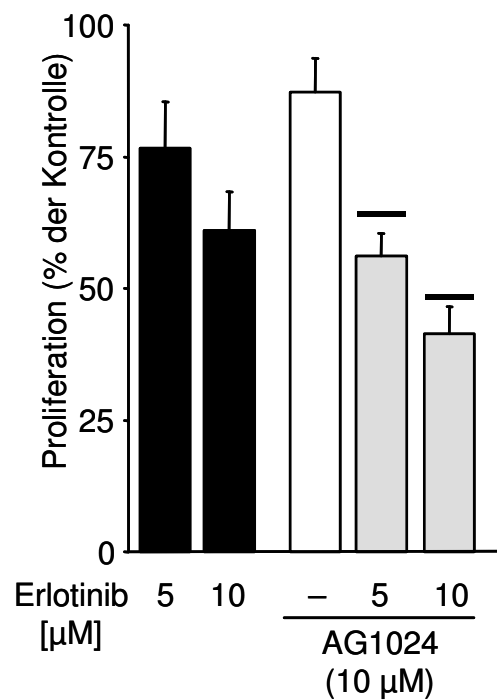


Abbildung 4-34: Simultane Blockade von EGF- und IGF-1-Rezeptor bei Ösophaguskarzinomzellen. Gleichzeitige EGF- und IGF-1-Rezeptorblockade von Kyse-70-Zellen resultiert in leicht überadditiver Proliferationshemmung. Schwarze Balken markieren die rechnerische additive Wachstumshemmung. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Mittelwerte aus jeweils n=3 - 5 unabhängigen Versuchen \pm SEM.

4.11.7 Wachstumshemmung von Ösophaguskarzinomzellen durch duale Blockade des EGFR

Ähnlich wie bereits für hepatozelluläre Karzinomzellen gezeigt (**Kap. 4.10**), wurde das Wachstum von Ösophaguskarzinomzellen durch die duale EGFR-Blockade mit anti-EGFR-Antikörper und EGFR-TKI synergistisch gehemmt. Kyse-70-Zellen wurden exemplarisch mit einer Kombination aus sub-IC₅₀-Konzentrationen von Erlotinib (5 μ M bzw. 10 μ M) und Cetuximab (1000 μ g/mL) inkubiert (**Abb. 4-35**).

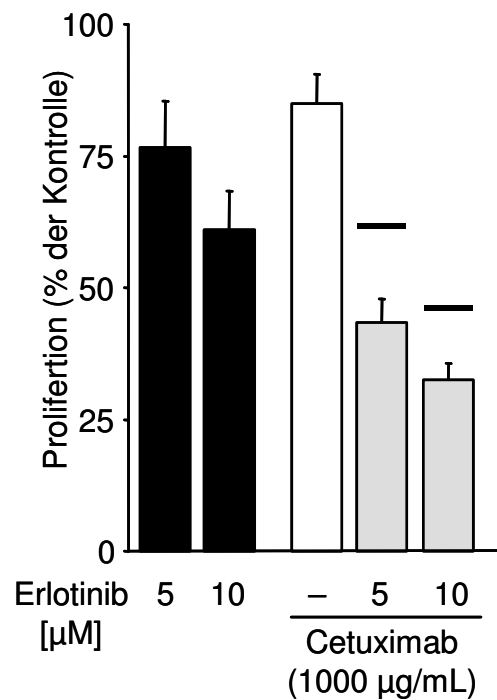


Abbildung 4-35: Duale Blockade des EGFR bei Ösophaguskarzinomzellen. Gleichzeitige Blockade der ligandenbindenden Domäne des EGFR durch Cetuximab und der intrinsischen Tyrosinkinase des Rezeptors durch Erlotinib führte in Kyse-70-Zellen zu synergistischer Proliferationshemmung. Schwarze Balken markieren die rechnerische additive Wachstumshemmung. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Mittelwerte aus jeweils n=3-5 unabhängigen Versuchen \pm SEM.