

5 DISKUSSION

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist als Target für neuartige, zielgerichtete Krebstherapien aus verschiedenen Gründen interessant. Erstens ist der EGF-Rezeptor in vielen Tumoren überexprimiert oder besitzt aufgrund von Mutationen eine unphysiologisch hohe Aktivität. Da die Aktivität des EGFR eine wichtige Rolle bei Tumorentstehung und -progression spielt, bietet die Hemmung der EGFR-Aktivierung und/oder –Aktivität eine interessante Behandlungsstrategie. Zweitens eröffnet der hier vorgestellte Behandlungsansatz im Gegensatz zu konventionellen Behandlungsmethoden wie Zytostatika- oder Radiotherapie die Möglichkeit einer zielgerichteten, selektiven Wachstumskontrolle von Tumoren, verbunden mit geringeren Nebenwirkungen und besserer Patientenverträglichkeit.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Effekte einer zielgerichteten Blockade des EGF-Rezeptors für das hepatozelluläre Karzinom (HCC), eine Tumorentität mit geringer 5-Jahres-Überlebensrate und unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten evaluiert. Die hier vorgestellten Untersuchungen führten über den Nachweis der *in-vitro*-Wirksamkeit des Konzepts hinaus durch die Charakterisierung beteiligter Signaltransduktionswege zu einem besseren Verständnis der Bedeutung der EGFR-Blockade bei der Wachstumsregulation, Zellzyklusarretierung sowie der Auslösung von Apoptose bei hepatozellulären Karzinomzellen.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die Blockade des EGFR von HCC- Zellen durch spezifische EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonale Antikörper das Wachstum der Tumorzellen inhibiert, und dass daran Apoptose und/oder Zellzyklusmodulation beteiligt sind. Außerdem konnte demonstriert werden, dass EGFR-Inhibitoren das Potential besitzen, die Wirkung konventioneller Chemotherapeutika zu steigern. Diese Eigenschaft könnte EGFR-Inhibitoren in besonderem Maße für kombinationstherapeutische medikamentöse Tumorthérapien qualifizieren.

Ferner wurde die Transaktivierung des EGFR durch Aktivierung des IGF-1R nachgewiesen. Der interessante Ansatz einer kombinierten Inhibition von Wachstumsfaktorrezeptoren, die miteinander interagieren, wurde weiter verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die simultane Blockade beider Rezeptoren eine deutliche Steigerung der antiproliferativen Effektivität zur Folge hatte. Auch wurde durch dualen Angriff am EGFR mittels Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) und monoklonalem Antikörper eine deutliche Zunahme der antiproliferativen Aktivität der untersuchten Arzneistoffe aufgezeigt.

Die Übertragbarkeit dieses Therapieansatzes auf das Ösophaguskarzinom, eine weitere gastrointestinale Tumorentität mit schlechter Prognose und unzureichenden

Therapiemöglichkeiten, wurde an ausgewählten Experimenten anschließend überprüft. Hierzu wurden erstmals Untersuchungen an Primärzellkulturen aus Biopsaten humaner Speiseröhrenkarzinome durchgeführt, welche im Vergleich zur ausschließlichen Verwendung humaner Zelllinien ein patientennäheres Untersuchungsmodell darstellen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse waren denen des HCC größtenteils analog.

5.1 EGFR-Inhibition als innovatives Therapiekonzept für hepatozelluläre Karzinome

Um den Einfluss der EGFR-Blockade auf das Tumorwachstum von HCC-Zellen zu untersuchen, wurden die Vertreter der Arzneistoffgruppen der Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren bzw. monoklonalen Antikörper ausgewählt, die bereits von den Gesundheitsbehörden verschiedener Länder zur anti-EGF-Rezeptor-basierten Therapie für andere Tumorentitäten zugelassen wurden: Zum einen die beiden EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib, zum anderen der monoklonale Antikörper Cetuximab. Die TKIs zeigten im mikromolaren Konzentrationsbereich zeit- und dosisabhängige antiproliferative Effekte mit ähnlichen IC_{50} -Werten in beiden untersuchten humanen HCC-Zelllinien (HepG2 und Huh-7) (**Kap. 4.2.1**). Hingegen waren die wachstumshemmenden Effekte von Cetuximab auf HepG2-Zellen schwächer ausgeprägt als die der TKIs (**Kap. 4.2.2**). Dies lässt sich zum einen mit den unterschiedlichen Wirkmechanismen von TKIs und Mabs (**Kap. 1.2.5**) erklären: Neben der reinen Rezeptorblockade ist für Cetuximab eine nachfolgende Internalisierung und *down*-Regulation des EGFR beschrieben worden (Kim *et al.*, 2001). Außerdem soll Cetuximab gezielt zytotoxische Effektorzellen des Immunsystems auf die EGFR-exprimierenden Tumorzellen lenken und auf diese Art und Weise eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität vermitteln (Carter, 2001) sowie die VEGF-Expression supprimieren. Die zusätzlichen Wirkprinzipien des Mab lassen sich im *in-vitro* Modell nicht nachweisen, so dass Cetuximab *in-vivo* häufig deutlich stärkere antiproliferative Effekte zeigt als in Zellkulturmodellen entsprechender Tumore (Huang und Harari, 1999; Mendelsohn, 2001). Ein weiterer Grund für die stärkeren antiproliferativen Effekte von Gefitinib und Erlotinib könnte die in **Kap. 4.9.3** gezeigte Unterdrückung der Transaktivierung des EGFR durch TKIs sein.

Die antiproliferative Wirkung von Cetuximab unterschied sich interessanterweise in den beiden Zellmodellen: Während HepG2-Zellen eine zeit- und dosisabhängige Wachstumsinhibition zeigten, konnte das Wachstum der Huh-7-Zellen durch Cetuximab kaum beeinflusst werden (**Kap. 4.2.2**). Weiterführende Untersuchungen zu Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest zeigten, dass die antineoplastischen Effekte von

Cetuximab in HCC-Zellen vorwiegend auf der Induktion eines Arrestes der Zellen in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus beruhen. Die in **Kap. 5.1.2** diskutierten Unterschiede des p53-Status zwischen HepG2- und Huh-7-Zellen mit der Konsequenz eines ausbleibenden Zellzyklusarrests in Huh-7-Zellen könnten für die beobachtete Insensitivität von Huh-7-Zellen gegenüber Cetuximabbehandlung verantwortlich sein.

Um die Spezifität der durch EGFR-Blockade induzierten Wachstumsinhibition nachzuweisen und eine unspezifische Schädigung von Zellmembranen auszuschließen, wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Arzneistoffzugabe durchgeführt (**Kap. 4.3**). Es konnte gezeigt werden, dass zytotoxische Effekte weder bei der Wirkung des spezifischen Antikörpers Cetuximab noch von Gefitinib oder Erlotinib eine Rolle spielen. Dieses Ergebnis ist von großer Bedeutung, da eine unspezifische Perforation von Zellmembranen durch zytotoxische Substanzen in der Regel zu unerwünschten Entzündungsreaktionen führt. Das Ausbleiben einer zytotoxischen Reaktion unterstreicht die Spezifität der EGFR-basierten Proliferationshemmung mit Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonalen Antikörpern.

5.1.1 Apoptoseinduktion durch EGFR-Inhibition

In der vorliegenden Arbeit konnte die apoptotische Wirkung von EGFR-Blockern erstmals für humane HCC-Zellen gezeigt werden. EGFR-Inhibition führte dosisabhängig zu einer Induktion der Caspase-3, dem Schlüsselenzym der Apoptose (**Kap. 4.4.2**), und zur Fragmentierung der DNA, dem Endpunkt des apoptotischen Prozesses (**Kap. 4.4.3**).

Die Aktivierung der Caspase-3 kann sowohl mitochondrienabhängig als auch mitochondrienunabhängig erfolgen. Gefitinib-behandelte HCC-Zellen zeigten eine ausgeprägte Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, die mit einer Zunahme des mitochondrialen Volumens einherging (**Kap. 4.4.1**). Dieses Ergebnis belegt eine Beteiligung der Mitochondrien an dem durch EGFR-Blockade ausgelösten apoptotischen Prozess. Zahlreiche Studien zeigen, dass während der mitochondrial vermittelten Apoptose entgegen der hier festgestellten Hyperpolarisation eine Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran erfolgt (Sutter *et al.*, 2003; Zamzami *et al.*, 1996). Die Depolarisation ist häufig begleitet von einem transienten Anschwellen der mitochondrialen Matrix, und dadurch bedingtem mechanischem Reißen der äußeren Mitochondrienmembran und/oder Permeabilisierung der Membran durch die Öffnung großer proteinpermeabler Poren (*permeability transition pore*, PTP) (Sutter *et al.*, 2003; Zamzami *et al.*, 1996). Andererseits konnte kürzlich erstmals demonstriert werden, dass die mitochondrial vermittelte Apoptose

auch mit einer Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran einhergehen kann (Piret *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die apoptosespezifische Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran durch den Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden kann (Vander Heiden *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Ein mechanisches Reißen der Mitochondrienmembran durch Unterbrechung der EGFR-Signaltransduktion, welches in der Regel innerhalb weniger Stunden nach Beginn der Schwellung auftritt, kann hingegen ausgeschlossen werden, da die bei Huh-7-Zellen beobachtete Zunahme des Mitochondrienvolumens selbst nach 24-stündiger Arzneistoffbehandlung anhielt, und bei HepG2-Zellen gar keine Schwellung messbar war (**Kap. 4.4.1**). Die durch EGFR-Blockade induzierte mitochondrienabhängige Apoptose beim HCC verläuft offensichtlich über bisher wenig bekannte Signalwege.

Zusätzlich konnte durch molekularbiologische Untersuchungen gezeigt werden, dass bei der mitochondrienabhängigen Apoptoseinduktion durch EGFR-Inhibition eine dosisabhängige Suppression antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bcl-2 sowie Bcl-X_L) beteiligt ist (**Kap. 4.4.4**). Sowohl für Bcl-2 (Takahashi *et al.*, 1999) als auch für Bcl-X_L (Watanabe *et al.*, 2004) ist eine häufige Überexpression in hepatozellulären Tumoren, verbunden mit schlechter Prognose, beschrieben worden. Außerdem wird Bcl-2-Überexpression mit Chemotherapeutikaresistenzen assoziiert (Pratesi *et al.*, 2001; Wang und Reed, 1998). Die Tatsache, dass eine EGFR-Blockade antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie im HCC supprimiert, qualifiziert diese neue Arzneistoffgruppe in besonderem Maße für Kombinationstherapien zur Steigerung der Effektivität konventioneller Zytostatika und zur Überwindung von Chemotherapeutikaresistenzen.

Für verschiedene Tumorentitäten ist die Induktion von Apoptose durch EGFR-Blockade mit Gefitinib, Erlotinib oder Cetuximab bereits beschrieben worden (Ciardiello *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1999; Moyer *et al.*, 1997), aber die Mechanismen der Apoptoseinduktion durch EGFR-Blockade konnten noch nicht aufgeklärt werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern somit erste Erkenntnisse zur Apoptoseinduktion durch anti-EGFR-basierte Arzneistoffe.

5.1.2 Zellzyklusmodulation durch EGFR-Inhibition

Virale Hepatiden führen zu kumulativen genetischen Alterationen, welche zur Entstehung und Progression hepatozellulärer Karzinome erheblich beitragen (Ozturk, 1999; Tannapfel und Wittekind, 2002). Von besonderer Bedeutung hierbei sind Mutationen bzw. Veränderungen

im Expressionsprofil zellzyklusregulierender Proteine, die häufig die Aufhebung des G₁/S-Kontrollpunktes des Zellzyklus bewirken (Tannapfel und Wittekind, 2002). So sind Zellzykluspromotoren wie Cyclin D1 häufig überexprimiert (Lu *et al.*, 2005), während Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) wie p27^{Kip1} und p21^{Waf1/CIP1} oft supprimiert werden (Hui *et al.*, 1998). Daher ist die Beeinflussung der Zellzyklusregulation ein vielversprechender Ansatz in der Therapie von hepatozellulären Karzinomen.

Zellzyklusmodulierende Effekte durch EGFR-Blockade sind bereits für verschiedene Tumorentitäten beschrieben worden (Harari, 2004; Hopfner *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit untersuchten EGFR-TK-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib führten bei hepatozellulären Karzinomzellen zu einem Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus, verbunden mit einer gleichzeitigen Abnahme des Anteils der Zellen in der S-Phase (**Kap. 4.5.1**). Cetuximabbehandlung von HepG2-Zellen ergab analoge Resultate, während bei Huh-7-Zellen nur bei einer sehr hohen Konzentration des Antikörpers ein signifikanter Arrest zu beobachten war. Der beobachtete Zellzyklusarrest durch Behandlung mit TKI oder anti-EGFR-Mab ging einher mit einer starken Überexpression der Zellzyklusinhibitoren p27^{Kip1} und p21^{Waf1/CIP1}. Cetuximabbehandlung führte zusätzlich zur Suppression des Zellzykluspromoters Cyclin D1 (**Kap. 4.5.2**).

Zusätzlich zum ausgeprägten G₁-Arrest konnte ein unveränderter bis leicht zunehmender Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase beobachtet werden. Dies lässt auf einen zusätzlichen, zumindest partiellen, G₂/M-Arrest schließen. Der G₂/M-Arrest lässt sich zum einen mit der im cDNA-Array (**Kap 4.7**) beobachteten Überexpression von gadd45 durch EGFR-Blockade erklären, für welches die zellzyklusarretierende Wirkung in HCC-Zellen schon beschrieben wurde (Sun *et al.*, 2003). Zum anderen könnte der G₂/M-Arrest durch die in den Versuchen zur differentiellen Genexpression durch EGFR-Inhibition gefundene Überexpression von Cyclin B1 bedingt sein. Die Expressionszunahme von Cyclin B1 führt zum Eintritt der Zelle in die G₂/M-Phase, anschließende Abnahme der Proteinmenge von Cyclin B1 hingegen ist essentiell für das Verlassen der Mitosephase (Rieder und Khodjakov, 1997). Dauerhafte Überexpression von Cyclin B1 resultiert folglich in einem Arrest der Zelle in der M-Phase.

Durch Blockade des EGFR kann den tumorspezifischen Veränderungen der Expression zellzyklusregulierender Proteine im HCC offensichtlich entgegengewirkt werden, was die untersuchten Arzneistoffe zum Einsatz beim HCC besonders qualifiziert.

Die beschriebenen Zellzyklusveränderungen waren bei HepG2-Zellen jeweils deutlich stärker ausgeprägt als bei Huh-7-Zellen. Besonders auffällig wurden diese Unterschiede bei der Behandlung der Tumorzellen mit Cetuximab (**Kap. 4.5.1**). Möglicherweise ist das

unterschiedliche Ansprechen der Zellen durch Unterschiede im p53-Status der Zellen bedingt: Während HepG2-Zellen das Wildtyp-Protein exprimieren, besitzen Huh-7 ein mutiertes p53 (Lee *et al.*, 2002). Da ein funktionell intaktes p53-Protein die Voraussetzung für einen G₁-Arrest darstellt (Lee *et al.*, 2002; Lowe *et al.*, 1993), könnte dies eine Erklärung für die Unterschiede zwischen beiden Zelllinien sein.

Das Tumorsuppressorprotein p53 besitzt eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle des Zellzyklus (Levine, 1997), denn in seiner aktiven Form reguliert es als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung u.a. die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind, wie z.B. p21^{Waf1/CIP1} oder gadd45 (el Deiry *et al.*, 1994; Zhan *et al.*, 1994b). Dadurch wird die unkontrollierte Vermehrung etwa aufgrund von DNA-Schäden verhindert.

Mutationen im p53-Gen treten in über 50% aller Tumore auf, sie stellen damit die häufigste gemeinsame genetische Veränderung in menschlichen Tumoren dar (Steele und Lane, 2005). Die Angaben zur Häufigkeit von p53-Mutationen beim HCC schwanken je nach Studie von 18% bis 67% (Jackson *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 1999).

Auf Basis der in vorliegender Arbeit gemachten Beobachtungen lässt sich begründet spekulieren, dass der p53-Status eines Tumors eventuell zur Vorhersage des Therapieerfolgs einer anti-EGFR-basierten Therapie geeignet sein könnte.

5.1.3 Regulation mitogener Signalwege durch EGFR-Inhibition

5.1.3.1 MAP-Kinase-Regulation durch EGFR-Inhibition

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind wichtige Regulatoren von Apoptose, Proliferation und Differenzierung (Rubinfeld und Seger, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung der ERK1/2 (p44/p42MAPK), einem Schlüsselprotein des Ras-Raf-MAP-Kinaseweges, in Abhängigkeit von der Aktivierung des EGFR untersucht. ERK1/2 transloziert nach seiner Aktivierung in den Zellkern und ist dort an der Regulation der Genexpression beteiligt. So wird durch den aktivierten MAP-Kinase-Weg unter anderem die Expression des Zellzykluspromoters Cyclin D1 gefördert (Lavoie *et al.*, 1996), während die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Waf1/CIP1} (McMillan *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004) und p27^{Kip1} (Cheng *et al.*, 1998) supprimiert wird. Ferner führt Inhibition der ERK1/2 zur Expressionszunahme von gadd45 (Kultz *et al.*, 1998), was in vorliegender Arbeit durch cDNA-Expressionsstudien gezeigt werden konnte (**Kap. 4.7**). Gadd45 interagiert mit p21^{Waf1/CIP1} bei der Induktion eines Zellzyklusarrests in der G₁/G₀-Phase (Vairapandi *et al.*, 1996). Die Aktivierung verschiedener zytosolischer Caspasen wird durch den ERK1/2-

Signalweg supprimiert (Erhardt *et al.*, 1999), die Expression verschiedener antiapoptotischer Faktoren gesteigert (Rubinfeld und Seger, 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von HCC-Zellen mit EGF zur Phosphorylierung von EGFR mit nachgeschalteter Phosphorylierung der ERK1/2 führt (**Kap. 4.6.1.1**). Umgekehrt konnte der mitogene MAP-Kinaseweg durch Blockade des EGFR durch Gefitinib, Erlotinib und Cetuximab unterbrochen werden (**Kap. 4.6.1.2**), was die Effekte der EGFR-Blockade auf Apoptoseinduktion und Zellzyklus erklären kann.

Die zur vollständigen Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung notwendige Arzneistoffkonzentration lag dabei ca. 100-fach über der zur vollständigen Hemmung der EGFR-Aktivierung erforderlichen Konzentration. Diese Beobachtung macht deutlich, dass die Ras-Raf-MAPK-Sinalkaskade in HCC-Zellen nicht nur vom EGFR, sondern auch von anderen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren aktiviert wird. So konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass auch IGF-1 den MAPK-Weg aktiviert (**Kap. 4.9.2**). Aufgrund der Komplexität der zellulären Signalwege erscheint folglich ein simultaner Angriff an mehreren Punkten dieses Netzwerks sinnvoll.

5.1.3.2 Regulation des Jak-STAT-Signalweges durch EGFR-Inhibition

Der Jak-STAT-Signalweg ist ebenso wie der Ras-Raf-MAPK-Weg mit Zellproliferation und Zellzyklusprogression assoziiert (Bromberg und Darnell, 2000). Insbesondere für STAT3 und STAT5 sind pro-proliferative Effekte und Apoptoseinhibition beschrieben (Bowman *et al.*, 2000). Die Rolle von STAT1 bei Tumorentstehung und -progression ist dagegen umstritten (Bowman *et al.*, 2000; Bromberg *et al.*, 1996). Die Effekte einer EGFR-Inhibition auf den Jak-STAT-Signalweg wurden bisher für keine Tumorentität untersucht. Für das in dieser Arbeit untersuchte hepatozelluläre Karzinom konnte die Expression von STAT1, STAT3 und STAT5 gezeigt werden (**Kap. 4.6.2.1**). Durch gezielte Aktivierung des EGFR mittels EGF wurde eine Aktivierung von STAT1 und STAT3 induziert, jedoch nicht von STAT5 (**Kap. 4.6.2.1**). Umgekehrt konnte durch EGFR-Blockade die EGF-vermittelte STAT-Aktivierung dosisabhängig unterdrückt werden (**Kap. 4.6.2.2**). Der mitogene Jak-STAT-Signalweg in HCC-Zellen wird folglich durch EGFR-Inhibition unterbrochen. Allerdings waren analog zur Inhibition des Ras-Raf-MAP-Kinasewegs durch EGFR-Blockade (**Kap. 4.6.1.2**) hierzu höhere Erlotinibkonzentrationen notwendig als zur vollständigen Hemmung der EGFR-Aktivierung, was wiederum auf Aktivierung des Signalweges durch weitere Rezeptoren bzw. Transaktivierungsvorgänge schließen lässt. Ähnlich wie der MAP-Kinaseweg fördert aktiviertes STAT3 die Apoptoseinhibition durch Überexpression von

Bcl-X_L und die Zellzyklusprogression über die Induktion der Cyclin D1-Expression (Calo *et al.*, 2003). Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass STAT3 die verstärkte Expression des EGFR induzieren kann und über erhöhte Expression der Liganden des EGF-Rezeptors die Aktivität des Rezeptors steigert (Garcia *et al.*, 2001). Über die Unterbrechung der STAT3-induzierten Signalwege durch EGFR-Blockade sollten somit nicht nur Apoptose und Zellzyklusarrest induziert werden, sondern zusätzlich die Aktivität des Rezeptors vermindert werden.

5.1.4 Transkriptionelle Effekte der EGFR-Inhibition

Mit Hilfe eines Genexpressionsscreenings (cDNA-Array) wurden die transkriptionellen Effekte einer EGFR-Blockade exemplarisch für Erlotinib untersucht (**Kap. 4.7**). Stark überexprimiert waren z.B. die Caspase-3, deren Aktivitätszunahme nach EGFR-Blockade in **Kapitel 4.4.2** gezeigt werden konnte, und die durch sie aktivierte Caspase-7. Bei beiden Caspasen handelt es sich um Effektorcaspasen, die z.B. Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) spalten und somit die DNA-Fragmentation einleiten. Die PARP ist ein Reparaturenzym, das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, wie sie unter anderem durch die Einwirkung der Nukleasen während der Apoptose entstehen (Lawen, 2003). Gleichzeitig wurde die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 supprimiert, wodurch auch die Bcl-2-Proteinmenge abnahm (vgl. **Kap. 4.4.4**). Auch eine Reihe von Proteinen, die an verschiedensten Stellen in das komplexe Netzwerk der Zellzyklusregulation eingreifen, wurden supprimiert. Unter ihnen befanden sich beispielsweise die den Übergang von der G₁ zur S-Phase fördernden Proteine CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*) oder Cyclin A2. Letzteres ist in hepatozellulären Karzinomen häufig überexprimiert und wird mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Haddad *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003). Die Überexpression von Cyclin B1 spielt, wie bereits in **Kap. 5.1.2** erwähnt, eine Rolle für den beobachteten Arrest des Zellzyklus in der G₂/M-Phase.

Ferner konnte eine Überexpression von *growth arrest and DNA-damage-inducible* (gadd)-Genen gezeigt werden (gadd45 und gadd153), welche positiv durch die SAPK (Stress-aktivierte Proteinkinase) p38 und negativ durch die ERK1/2 reguliert werden (Kultz *et al.*, 1998; Oh-Hashi *et al.*, 2001). Die Expression der gadds korreliert mit der Induktion von Zellzyklusarrest und/oder Apoptose (Zhan *et al.*, 1994a). Eine kombinierte Überexpression verschiedener gadds führt sogar zu einer synergistischen Suppression des Zellwachstums (Zhan *et al.*, 1994b).

Das am stärksten überexprimierte Gen kodiert für das *insulin-like growth factor binding protein 6* (IGFBPs). Hierbei handelt es sich um ein erst vor wenigen Jahren entdecktes und bisher wenig erforschtes Mitglied der Familie der IGFBPs. IGFBPs binden mit hoher Affinität IGF-1 und IGF-2, die endogenen Liganden der IGF-Rezeptoren, und regulieren so die Menge der jeweils biologisch aktiven IGFs (Baxter, 2000). Desweiteren werden für einige IGFBPs auch rezeptorunabhängige (wachstumsstimulatorische und –inhibitorische) Effekte diskutiert (Mohan und Baylink, 2002). Die Besonderheit von IGFBP-6 ist die relative Selektivität für IGF-2 (Baxter, 2000). IGF-2 und sein Rezeptor IGF-2R sind im Gegensatz zum IGF-1/IGF-1R-System (vgl. **Kap. 1.3**) bisher wenig erforscht. In verschiedenen Tumor-Xenotransplantatmodellen und auch in humanen HCCs konnte eine IGF-2-Überexpression nachgewiesen werden (Scharf und Braulke, 2003). Außerdem konnte der Zusammenhang zwischen IGF-2-Überexpression und erhöhter Zellproliferation für HepG2- und Huh-7-Zellen gezeigt werden (Lin *et al.*, 1997). Kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen EGFR-vermittelten Signalwegen und einer Modulation der IGFBP-Expression beschrieben (Takaoka *et al.*, 2004). Somit lässt sich spekulieren, dass EGFR-Blockade durch die Überexpression des IGFBP-6 und damit reduzierter Verfügbarkeit von IGF-2 eine zusätzliche Wachstumshemmung der hepatozellulären Tumorzellen zur Folge haben könnte. Eine exakte Interpretation der Bedeutung der IGFBP-6-Überexpression erfordert allerdings weitere funktionelle Überprüfungen der Versuchsergebnisse sowie weitere Untersuchungen zu den physiologischen bzw. pathophysiologischen Funktionen des IGFBP-6.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit über die anti-EGFR-induzierten Änderungen der Genexpression könnten zukünftig, neben einem besseren Verständnis der Signaltransduktion, auch einen wichtigen Beitrag zur Abschätzung eines möglichen Therapieerfolgs aufgrund der Vorhersage des Ansprechverhaltens von Tumoren gegenüber anti-EGFR-basierten Therapien leisten. Dies ist von großer Bedeutung, da die Selektion von Patienten, die von der Therapie profitieren, ein bisher ungeklärtes Problem des anti-EGFR-basierten Therapieansatzes darstellt. Während bei dem Ende der 90er Jahre für die Therapie des erbB-2-positiven Mammakarzinoms zugelassenen monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (HerceptinTM) der Therapieerfolg direkt mit dem Status der erbB-2-(Über-) Expression korreliert, so zeigte sich im Lauf der Zeit immer deutlicher, dass diese Beziehung nicht für anti-EGFR-basierte Therapien zutrifft (Bishop *et al.*, 2002; Magne *et al.*, 2002). Auch in vorliegender Arbeit war das Ansprechen der jeweiligen Tumormodelle *in-vitro* unterschiedlich, obwohl eine ähnlich starke EGFR-Expression in allen Zellen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (**Kap. 4.1** und **Kap. 4.11.1**).

Die Ergebnisse des cDNA-Arrays könnten neue Ansatzpunkte zur Lösung der dargestellten Problematik liefern: Die Expressionsänderungen der gadd-Gene wurden bereits als Marker zur Vorhersage des klinischen Ansprechens auf eine chemotherapeutische Behandlung evaluiert (las Alas *et al.*, 2000; Los *et al.*, 1999). Weitere *ex-vivo* Untersuchungen zur Korrelation ausgewählter durch EGFR-Inhibition stark differentiell exprimierter Gene (wie z.B. des IGFBP-6 oder der Zellzyklusregulatoren) mit dem Ansprechverhalten unter der Therapie könnten wertvolle neue Erkenntnisse zur Auswahl geeigneter Patientenkollektive leisten. Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt ist die weitergehende Untersuchung der Korrelation des p53-Status des Tumors mit der Effektivität der Therapie.

Zusätzliche Forschung auf diesem Gebiet ist dringend notwendig, denn letztendlich stellt die Suche nach der Ursache des Ansprechens oder Versagens der Therapie und die Identifizierung geeigneter Biomarker eine wichtige Voraussetzung für einen Erfolg der neuartigen molekularbasierten Therapien dar.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu der den Effekten der Zellzyklusarretierung und der Apoptose durch EGFR-Inhibition zugrunde liegenden Signaltransduktion ist zusammenfassend in **Abbildung 5-1** dargestellt.

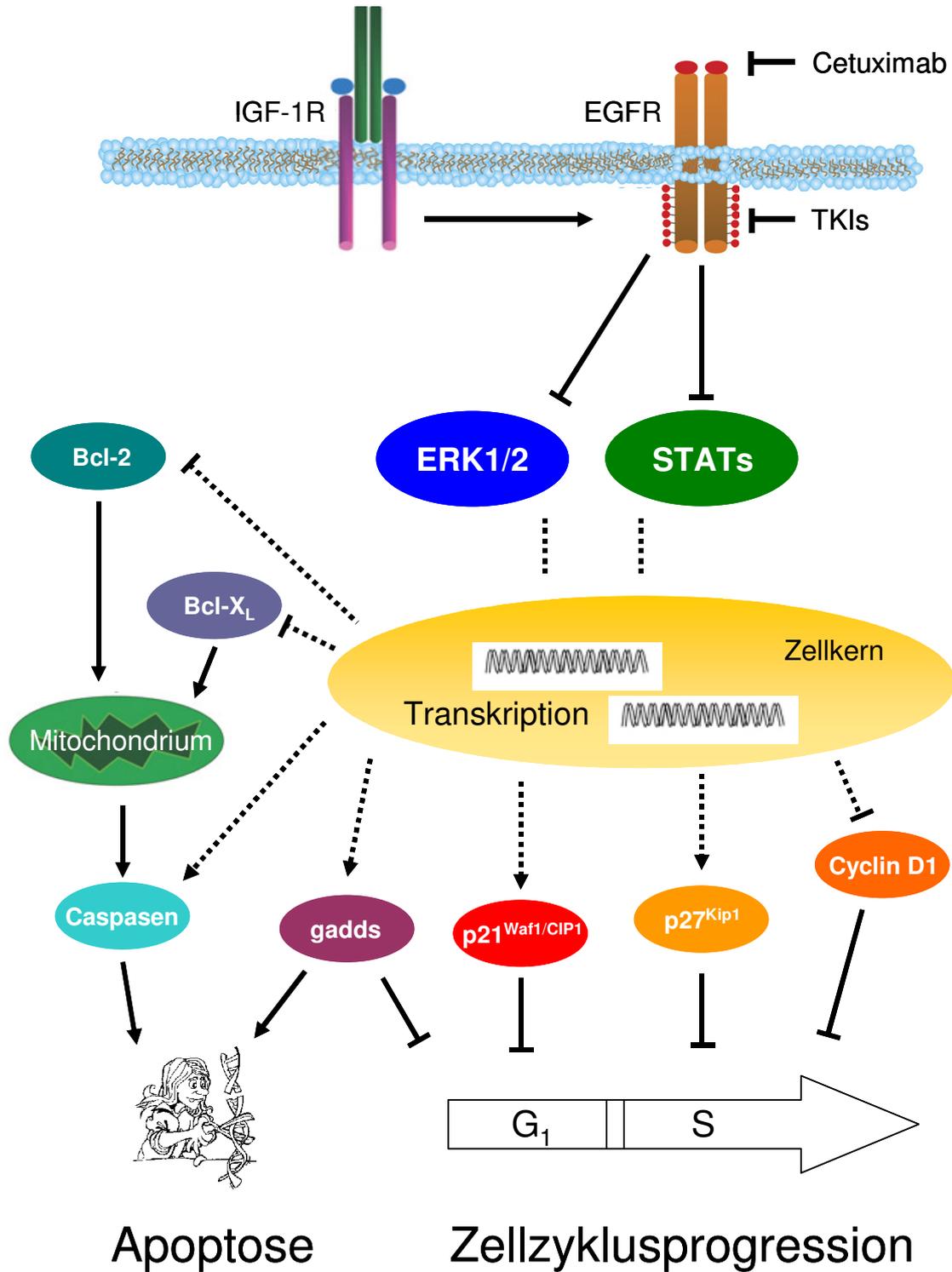


Abbildung 5-1: Mechanismen der durch EGFR-Inhibition induzierten Apoptose und des Zellzyklusarrests am G₁/S-Kontrollpunkt in hepatozellulären Karzinomzellen. Dargestellt sind die in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge zwischen EGFR-Inhibition und dadurch induzierter Apoptose und Zellzyklusarrest. EGFR-Blockade führt zunächst zur Aktivierungshemmung von ERK1/2 und von STAT-Proteinen. Diese Hemmung resultiert in einer differentiellen Expression apoptose – und zellzyklusregulierender Gene. Der Zellzyklus-promoter Cyclin D1 wird supprimiert, während die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Waf1/CIP1} und p27^{Kip1} sowie der zellzyklusarretierenden und pro-apoptotischen gadd45 gesteigert wird. Über die Suppression antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie erfolgt eine mitochondrienabhängige Apoptoseinduktion, welche über Caspaseaktivierung zur Fragmentation der nukleären DNA führt. Gestrichelte Linien kennzeichnen transkriptionelle Vorgänge.

5.2 Kombinationstherapeutische Ansätze

5.2.1 EGFR-Inhibition und konventionelle Chemotherapeutika

In dieser Arbeit wurden an hepatozellulären Karzinomzellen die Kombinationen von Erlotinib mit Chemotherapeutika, die bei der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) zum Einsatz kommen, untersucht (vgl. **Kap. 1.1.3.1**). Eine systemische Chemotherapie verbietet sich aufgrund nicht vertretbarer Toxizitäten bei den in der Regel leberinsuffizienten HCC-Patienten (**Kap. 1.1.3.4**). Untersucht wurden vier Chemotherapeutika mit verschiedenen Wirkungsprinzipien: die DNA-quervernetzende Substanz Cisplatin; der Mikrotubuli-Inhibitor Docetaxel; SN-38, der aktive Metabolit des Topoisomerase-I-Inhibitors Irinotecan sowie das zytostatisch wirksame Antibiotikum Doxorubicin, welches über Interkalation in die DNA und RNA das Tumorstadium hemmt. Unabhängig von der unterschiedlichen Pharmakodynamik der Zytostatika resultierten fast alle Kombinationen in additiven bzw. synergistischen antineoplastischen Effekten (**Kap. 4.8.1**). Die HCC-Zelllinien zeigten sich gegenüber Cisplatin-Behandlung resistent, sprachen aber dennoch auf Erlotinib an. Diese Tatsache lässt den Einsatz von Erlotinib für die Zweit- bzw. Drittlinietherapie nach Zytostatikatherapieversagen sinnvoll erscheinen. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass der die alleinige Zytostatikatherapie übersteigende antineoplastische Effekt vor allem auf eine deutliche Erhöhung der Apoptoseinduktion zurückzuführen war (**Kap. 4.8.2**). Dies könnte unter anderem an den in dieser Arbeit mittels *Western Blot* und *cDNA-Array* gezeigten Effekten der EGFR-Inhibition liegen, antiapoptotische Faktoren wie z.B. Bcl-2, Bcl-X_L oder das jun-D-Protoonkogen zu unterdrücken, während proapoptotische Faktoren wie Caspasen oder gadd45 verstärkt exprimiert bzw. aktiviert werden (**Kap. 4.4.4** und **Kap. 4.7**). Modifikationen des Zellzyklus durch Zytostatika konnten im Falle von Docetaxel durch Erlotinib signifikant verstärkt werden (**Kap. 4.8.3**). Möglicherweise spielt hier die im *cDNA-Array* (**Kap. 4.7**) beobachtete Überexpression des für den S-G₂/M-Übergang wichtigen Cyclin B1 eine Rolle, welche zu einem partiellen Arrest des Zellzyklus in der Mitosephase führt (**Kap. 4.5.1**), in der Docetaxel selektiv seine Wirkung entfaltet.

Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend verstärkten die in dieser Arbeit untersuchten Arzneistoffe die Effektivität konventioneller Zytostatika in weiteren *in-vitro*-Tumormodellen (Grunwald und Hidalgo, 2003; Harari, 2004). Darüber hinaus konnten manche der vielversprechenden *in-vitro*-Ergebnisse in klinischen Studien bereits bestätigt werden: Für Cetuximab liegen z.B. Phase-III-Studien zum Einsatz des monoklonalen Antikörpers in Kombination mit Cisplatin bei Hals- und Kopftumoren (Burtneiss, 2005) oder mit Irinotecan beim Kolonkarzinom (Cunningham *et al.*, 2004) vor, in denen die Überlebenszeit der

Patienten durch die Kombination im Vergleich zur alleinigen Zytostatikabehandlung signifikant erhöht werden konnte. Erlotinib zeigte in Phase-III-Studien in Kombination mit Gemcitabin beim fortgeschrittenen Pankreskarzinom (Moore *et al.*, 2005) einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur Zytostatika-Monotherapie.

In den groß angelegten Phase-III-INTACT-Studien (*Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment*) dagegen konnten die Kombinationen Gefitinib/Gemcitabin/Cisplatin (INTACT-1; (Giaccone *et al.*, 2004a; Giaccone *et al.*, 2004b) bzw. Gefitinib/Paclitaxel/Carboplatin (INTACT-2; (Herbst *et al.*, 2004) keinen Überlebensvorteil im Vergleich zur jeweiligen Zytostatikakombination ohne Gefitinib zeigen. Die mit den INTACT-Studien vergleichbaren TALENT bzw. TRIBUTE-Studien mit Erlotinib verfehlten ebenfalls den primären Endpunkt, eine Verlängerung der Lebenszeit im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie (Herbst *et al.*, 2005).

Aufgrund der positiv verlaufenen Studien hält man trotzdem an dem vielversprechenden Ansatz zur Kombination von EGFR-Blockade mit konventionellen Zytostatika fest. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Toxizitäten von Zytostatika und anti-EGFR-Therapie nicht verstärken oder überlappen (Kim *et al.*, 2001). Dies bietet die Möglichkeit einer Steigerung der Effektivität einer Zytostatikatherapie ohne Erhöhung der Dosis und der damit verbundenen (häufig dosislimitierenden) unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Immunsuppression, Anämie, Diarrhoe und Emesis. Zur Zeit laufen für Cetuximab, Gefitinib und Erlotinib mehr als 100 klinische Studien, die unterschiedliche Behandlungsschemata mit Zytostatika und gleichzeitiger EGFR-Blockade an den verschiedensten Tumorentitäten untersuchen (www.clinicaltrials.gov).

Insgesamt stellen die in dieser Arbeit vorgestellten *in-vitro*-Ergebnisse zur Kombination von EGFR-Blockade mit konventionellen Zytostatika einen interessanten Ansatzpunkt für neue Arzneistoffkombinationen der TACE dar, deren Resultate in klinischen Studien überprüft werden sollten.

5.2.2 EGFR und IGF-1R

Der *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R) wird ähnlich wie der EGFR mit der Karzinogenese, dem Wachstum und dem Überleben von Tumoren in Verbindung gebracht (Baserga, 1999; Rubin und Baserga, 1995). Beim IGF-1R handelt es sich um einen tetrameren Rezeptor, der wie der EGFR eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Durch Bindung von Liganden (IGF-1/IGF-2) kommt es zur Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomäne des IGF-1R und dadurch zur Aktivierung des Ras-Raf-MAP-

Kinaseweges, des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weges (PI3PK) und von SAPKs wie p38 oder JNK (*Jun N-terminal kinase*) (O'Connor, 2003). Hepatozelluläre Karzinome zeigen häufig eine sehr starke Expression des IGF-1R (Scharf *et al.*, 1998), die auch für HepG2 und Huh-7-Zellen in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (**Kap. 4.9.1**). Aufgrund ähnlicher mitogener Effekte, die teilweise sogar über dieselben Signalwege vermittelt werden, liegt die Vermutung nahe, das EGFR und IGF-1R miteinander im Sinne eines „*cross-talks*“ interagieren können. In der Tat konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Behandlung von HepG2-Zellen mit IGF-1 den MAP-Kinaseweg aktiviert, aber auch zur Phosphorylierung des EGFR führt (**Kap. 4.9.2**). Über bislang nicht bekannte Signalwege kann die Tyrosinkinase des EGFR folglich durch den IGF-1R transaktiviert werden. Desweiteren konnte die IGF-1-vermittelte ERK1/2-Aktivierung durch Erlotinibbehandlung teilweise unterdrückt werden (**Kap. 4.9.3**). Dieses Ergebnis kann die in den Wachstumsversuchen beobachtete stärkere antiproliferative Aktivität der TKIs im Vergleich zu Cetuximab erklären (**Kap. 4.2.1** und **Kap. 4.2.2**): Cetuximab kann als Inhibitor der Ligandenbindung keinen Einfluß auf Transaktivierungsvorgänge nehmen, während Gefitinib und Erlotinib durch direkten Angriff an der intrazellulären Domäne des EGFR sowohl die intrinsische Aktivität als auch die durch „*cross-talk*“ vermittelte Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase unterdrücken.

Neben der in vorliegender Arbeit erstmals gezeigten Transaktivierung des EGFR durch den IGF-1R in HCC-Zellen (**Kap. 4.9.2**) konnte in anderen Tumorentitäten die Möglichkeit eines *cross-talks* zwischen EGFR und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen und Zytokinrezeptoren gezeigt werden (Fischer *et al.*, 2003; Zwick *et al.*, 1999). Auch hier verläuft die Kreuzaktivierung über die Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors (Zwick *et al.*, 1999) und sollte somit, wie in vorliegender Arbeit für IGF-I-vermittelte Aktivierung gezeigt, durch TKIs inhibiert werden.

Die enge Verknüpfung der EGFR- und IGF-1R-vermittelten Signaltransduktion wird auch als die Ursache von Resistenzen gegenüber anti-EGFR-basierten Therapieansätzen diskutiert: Über eine Überexpression des IGF-1R und seiner nachgeschalteten mitogenen Signalwege können die Tumorzellen die EGFR-Inhibition kompensieren (Chakravarti *et al.*, 2002).

Eine simultane Blockade von EGFR und IGF-1R könnte demnach zu einer Wirkungsverstärkung des molekular basierten Therapieansatzes führen. In dieser Arbeit wurden erstmals Untersuchungen zur simultanen IGF-1R-Tyrosinkinaseinhibition und EGFR-Blockade durch einen monoklonalen Antikörper (Cetuximab) oder durch EGFR-TK-Inhibitor (Erlotinib) beim hepatozellulären Karzinom durchgeführt. In den untersuchten Zellmodellen

waren die Kombinationen dabei jeweils deutlich wirksamer als die Behandlung mit den jeweiligen Arzneistoffen allein (**Kap. 4.9.4**). Vermutlich ist der beobachtete antiproliferative Synergismus das Ergebnis der simultanen Unterdrückung des MAP-Kinaseweges sowie der durch Rezeptor-Rezeptor-„*cross-talk*“ vermittelten kompensatorischen Mechanismen zwischen beiden Wachstumsfaktorrezeptoren, was die Hypothese von Chakravarti *et al.* bestätigen würde. Für resistenzüberwindende Eigenschaften einer kombinierten anti-EGFR/anti-IGF-1R-Therapie spricht ferner die Tatsache, dass in gegen Cetuximab vergleichsweise unsensiblen Huh-7-Zellen die stärksten synergistischen Effekte beobachtet werden konnten. Insgesamt stellt die simultane Blockade von EGFR und IGF-1R einen höchst interessanten Ansatzpunkt zur Entwicklung neuartiger zukünftiger HCC-Therapieschemata dar, welcher weiter verfolgt werden sollte.

5.2.3 Dualer Angriff am EGFR

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob die simultane Blockade der extrazellulären Liganden-bindenden Domäne des EGFR und der intrazellulären Tyrosinkinase eine geeignete Methode darstellt, die Effekte einer anti-EGFR-Monotherapie des HCC zu erhöhen. Die gleichzeitige Behandlung der HCC-Zellen mit Cetuximab und Erlotinib resultierte in einer Addition der wachstumshemmenden Eigenschaften der Einzelarzneistoffe (**Kap. 4.10**) und war damit der Monoapplikation der Substanzen überlegen. Die Ergebnisse bestätigen damit Untersuchungen an anderen Tumormodellen (Huang *et al.*, 2004; Matar *et al.*, 2004).

Die Verstärkung der antiproliferativen Effekte durch die Mab-TKI-Kombination könnte verschiedene Gründe haben: Die Arzneistoffe inhibieren ihr *Target* nicht vollständig. Bei Gefitinib, Erlotinib und Cetuximab handelt es sich um reversible kompetitive (Rezeptor-) Antagonisten. Gefitinib und Erlotinib konkurrieren mit ATP nach den Regeln des Massenwirkungsgesetzes um die ATP-Bindungsstelle an der intrazellulären EGFR-Tyrosinkinase, Cetuximab mit den endogenen Liganden (EGF, TGF- α , etc.) um die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle. Bei gleichbleibender Konzentration der jeweiligen Konkurrenten steigt somit durch den dualen Angriff am Rezeptor der relative Anteil an inhibiertem Rezeptor und somit die Effektivität der dadurch vermittelten Wachstumsinhibition.

Die dem EGFR nachgeschalteten Signalwege zeigen extreme Komplexität (Yarden und Sliwkowski, 2001). Aufgrund unterschiedlicher Angriffspunkte beeinflussen TKIs und Mab diese Wege nicht exakt gleich. Bei simultaner Anwendung der beiden Arzneistoffklassen

sollten sich somit die Effekte der Einzelsubstanzen wie z.B. Apoptoseinduktion, Zellzyklusarrest oder Hemmung der Transaktivierung der EGFR-Tyrosinkinase durch andere (Wachstums-) Rezeptoren überlagern und verstärken. Die beobachtete nahezu additive Wachstumsinhibition bestätigt diese Überlegungen.

5.3 EGFR-Tyrosinkinaseinhibition als innovatives Therapieprinzip beim Ösophaguskarzinom

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der in der vorliegenden Arbeit am Modell des HCC erzielten Ergebnisse auf eine weitere noch nicht untersuchte Tumorentität, wurden Untersuchungen der Effekte einer EGFR-TK-Inhibition am Modell des Ösophaguskarzinoms durchgeführt. Für die Untersuchungen am Ösophaguskarzinom wurden zusätzlich Primärzellkulturen von Biopsaten humaner Ösophaguskarzinome etabliert, um ein patientennahes Modell zu erfassen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen am Ösophaguskarzinom waren mit denen an HCC-Zellen vergleichbar: Die ähnlich starke Expression des EGFR in allen Zelllinien konnte nachgewiesen werden (**Kap. 4.11.1**), und die Zellen zeigten eine zeit- und dosisabhängige Wachstumsinhibition durch Erlotinibbehandlung. Die Ösophaguskarzinomzelllinien zeigten dabei allerdings starke Unterschiede in der Sensitivität gegenüber dem EGFR-TKI (**Kap. 4.11.2.1**). Die Ursache dafür könnte die vor kurzem beschriebene Mutation im EGFR (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004) sein, die zu EGFR-TKI-Resistenz führt. Vier von fünf Biopsaten zeigten ein gutes Ansprechverhalten auf die Erlotinibbehandlung (**Kap. 4.11.2.2**). Bereits nach drei Tagen war das Tumorstadium im Schnitt signifikant um etwa 64% im Vergleich zur Kontrolle vermindert, ein Biopsat wurde als *non-responder* identifiziert. Es existieren zwei histologische Typen des Ösophaguskarzinoms: Das weltweit am häufigsten auftretende Plattenepithel- und das in westlichen Ländern rasch zunehmende Adenokarzinom (Koshy *et al.*, 2004). Berichte über ein besseres Ansprechen von Adenokarzinomen auf EGFR-Blockade (Engelman und Janne, 2005) konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da Adeno- und Plattenepithelkarzinome annähernd gleich gutes Ansprechen zeigten. Die Ergebnisse der *ex-vivo*-Untersuchungen können die Basis für weitergehende Untersuchungen am Tiermodell darstellen. Die Effekte der TK-Inhibition auf das Tumorstadium waren im Falle der Ösophaguskarzinomzellen eindeutig dem auch in HCC-Zellen beobachteten G₁-Zellzyklusarrest zuzuordnen (**Kap. 4.11.4**). Je stärker die antiproliferative Wirkung von Erlotinib war, desto stärker zeigte sich in den jeweiligen Kyse-Zellen der Arrest in der G₁-Phase. Analog zu den Beobachtungen beim HCC ging der Zellzyklusarrest mit einer Expressionszunahme von p27^{Kip}, p21^{Waf1/CIP1} und einer Abnahme von Cyclin D1 einher

(**Kap. 4.11.4**). Eine signifikante Apoptoseinduktion durch Erlotinib, wie für HepG2- und Huh-7-Zellen demonstriert, wurde dagegen in den untersuchten Kyse-Zelllinien nicht beobachtet (**Kap. 4.11.3**). Wie in den entsprechenden Versuchen an hepatozellulären Karzinomzellen, hemmt Erlotinib auch bei ösophagealen Tumorzellen dosisabhängig die Aktivierung des EGFR (**Kap. 4.11.5**) sowie die Aktivierung des mitogenen Ras-Raf-MAP-Kinase-Weges. Die Ansätze zur Verstärkung der Effekte einer gegen den EGFR gerichteten Therapie über simultane Blockade von EGFR und IGF-1R (**Kap. 4.11.6**) sowie duale Blockade des EGFR mittels monoklonalem Antikörper und TK-Inhibition (**Kap. 4.11.7**) zeigten auch beim Ösophaguskarzinom eine vielversprechende Wirkung: Die Wachstumsinhibition war jeweils durch die Kombination deutlich erhöht im Vergleich zur Monobehandlung. Interessanterweise zeigten die p53-mutierten Kyse-70-Zellen (Tanaka *et al.*, 1996) genau wie die ebenfalls eine Mutation im p53 tragenden Huh-7-Zellen gegenüber Cetuximab nur geringe Sensitivität (**Kap. 4.2.2** und **Kap. 4.11.2.1**). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass p53 eine wichtige Rolle in der durch EGFR-Blockade vermittelten Wachstumsinhibition spielen könnte. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die bei den Untersuchungen an hepatozellulären Karzinomzellen gewonnenen Erkenntnisse auf das Ösophaguskarzinom übertragen lassen. Anti-EGFR-basierte Behandlungsstrategien könnten somit auch für diese Tumorentität zur Verbesserung der bisher unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten beitragen und sollten weiter verfolgt werden. Desweiteren lassen die Ergebnisse den begründeten Schluss zu, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte nicht zelltypspezifisch sind, sondern dass es sich um generelle Wirkmechanismen handelt.

In der Zukunft könnte die Blockade von Wachstumsfaktorrezeptoren durch Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonale Antikörper aber nicht nur in der Behandlung von Tumorerkrankungen eine Rolle spielen. Resultate verschiedener Studien zeigen, dass der EGFR und/oder der IGF-1R bereits in frühen Stadien der Karzinogenese des HCC (DeCicco *et al.*, 1997; Scharf und Braulke, 2003) und des Ösophaguskarzinoms (Chen *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2002) stark überexprimiert werden. Damit wäre auch ein Einsatz der neuen Arzneistoffe zur Chemoprävention von Tumoren in Risikopatienten vorstellbar.