

1 Einleitung

1.1 Krebs

Im Jahre 2000 gab es weltweit mehr als sechs Millionen durch Krebs verursachte Todesfälle [1]. Krebs ist damit die dritthäufigste Todesursache. Selbst mit den heutigen Möglichkeiten in der Frühdiagnostik und der Therapie können nur ca. ein Drittel aller Krebsfälle als heilbar eingestuft werden. Laut WHO (World Health Organisation) gab es im Jahre 1997 ca. neun Millionen Neuerkrankungen. Diese Zahl wird sich Schätzungen zufolge im Jahre 2015 mit fünfzehn Millionen Neuerkrankungen nahezu verdoppeln.

Als Ursachen gelten vor allem steigender Zigarettenkonsum, Änderungen der Ernährungsgewohnheiten, höhere Lebenserwartung und steigende Belastung durch Kanzerogene [2].

Die häufigsten Krebsarten sind Brust-, Lungen-, Darm-, Prostata-, Bauchspeicheldrüsen-, Speiseröhren-, Leber-, Eierstock- und Blutkrebs. Dabei gibt es geschlechtsspezifische und geographisch-völkerspezifische Unterschiede, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

Krebs ist der Oberbegriff für mehr als einhundert verschiedene Krankheiten, die durch dysreguliertes, enthemmtes und autonomes Überschusswachstum bestimmter Körperzellen verursacht werden (→ Neoplasmen).

1.1.1 Störungen in der zellulären Signaltransduktion als eine Ursache der Krebsentstehung

Alle Neoplasmen, sowohl benigne als auch maligne, sind gekennzeichnet durch autonomes Zellwachstum, wobei Malignome zusätzlich die Fähigkeiten besitzen, in benachbarte Gewebe einzudringen, diese zu zerstören (infiltratives und destruktives Wachstum) und außerdem zu metastasieren.

Die Ursache des autonomen Zellwachstums liegt in einer Störung der zellulären Signaltransduktion, die zu einem Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelldifferenzierung auf der einen und Apoptose auf der anderen Seite führt.

Unter Signaltransduktion versteht man die aus einer Kaskade von biochemischen Einzelreaktionen bestehenden Abläufe bei der Übertragung von Signalen von der Zelloberfläche zum Zellkern. Dadurch werden bestimmte genetische Prozesse, wie

Differenzierung und Wachstum ausgelöst. Signaltransduktionswege sind stark verzweigt und können sich kreuzen und überlappen [3].

Neue Erkenntnisse über die komplexen Vorgänge bei der Krebsentstehung erhofft man sich durch die rasch voranschreitende Genom- und Proteomforschung. Das Verstehen von Krebs auf molekularer Ebene ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer, potenter und möglichst spezifischer Krebstherapeutika.

So weiß man heute, dass ca. 20 Prozent der über 30 000 menschlichen Gene für Signaling-Proteine kodieren. Allerdings ist man noch weit davon entfernt, alle Einzelheiten des Zellsignalings zu verstehen.

Eine wichtige Gruppe signalübertragender Proteine, die bei vielen epidermalen Tumoren (Tabelle 1) eine Rolle spielt, ist die Familie der EGF-Rezeptoren (EGFR: *engl.*: Epidermal Growth Factor Receptor = Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor).

	Anteil EGFR-exprimierender Tumore in %		Anteil EGFR-exprimierender Tumore in %
Kopf- u. Halstumore	80-100	Eierstocktumore	35-70
Nierentumore	50-90	Blasentumore	31-48
Glioblastome	40-50	Bauchspeicheldrüsentumore	30-50
Brusttumore	14-91	Nicht-kleinzellige Lungentumore	40-80
Dickdarntumore	25-77		

Tabelle 1: *EGFR-Expression in verschiedenen epidermalen Tumoren* [4]

1.1.2 EGFR-Targeting als neue Strategie in der Krebstherapie

EGFR-exprimierende Tumore gelten als besonders aggressive, oft gegen Chemo- und Hormontherapie resistente Tumore mit besonders schlechter Prognose für die Patienten. Deshalb werden große Anstrengungen unternommen, neue Krebstherapeutika zu entwickeln, die den EGFR und seine Signalwege blockieren.

Dabei handelt es sich um eine völlig neue Therapiestrategie, mit der erstmals der Krebs kausal behandelt werden kann. Inzwischen sind mehrere Wirkstoffe zur Inhibition des EGFR-Signalings in späten klinischen Phasen, im Verfahren der Zulassung bzw. bereits zugelassen. Zu ihnen gehört der monoklonale HER2-Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®], Hoffmann La-Roche), der für die Behandlung des metastasierenden, HER2-überexprimierenden Mammakarzinoms auch in Deutschland Anwendung findet. ZD-1839 (Iressa[®], AstraZeneca) ist ein EGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitor, der momentan die Phasen II/III klinischer Studien durchläuft.

Auf die Möglichkeiten des EGFR-Targetings wird im Abschnitt **1.6** noch näher eingegangen.

1.2 Der humane Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

1.2.1 Aufbau

Der EGFR gehört zur Superfamilie der membranständigen Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen (RPTK), von denen bisher 58 bekannt sind (Bild 1).

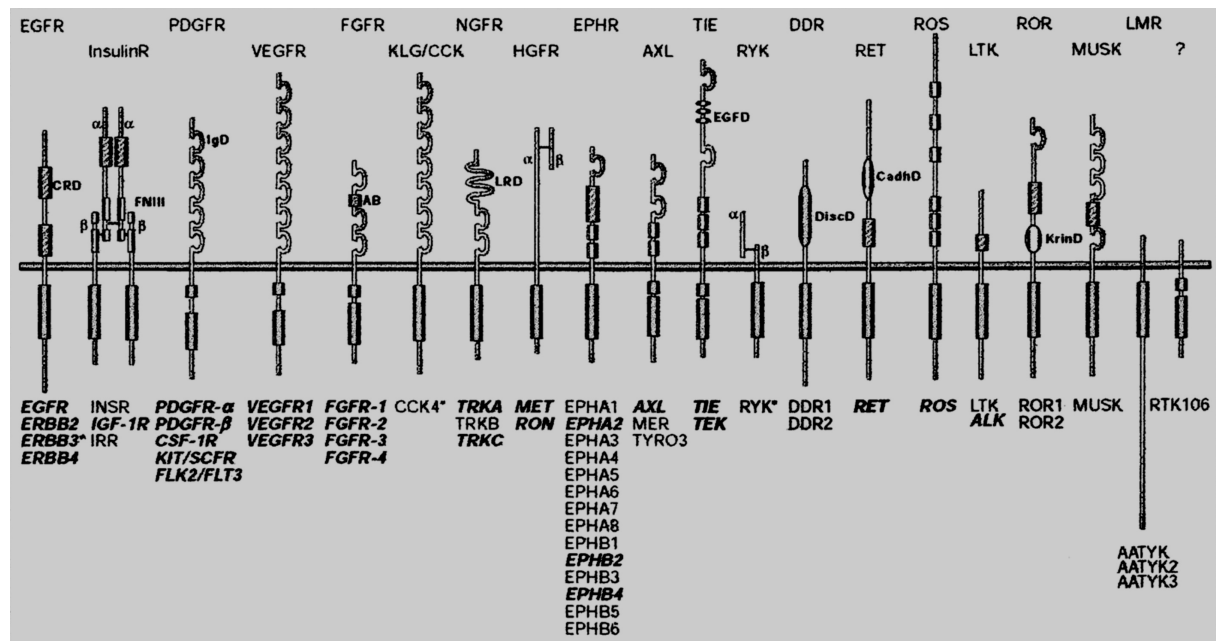


Bild 1: Die 58 bisher bekannten humanen RPTKs [3]

EGFR (epidermal growth factor receptor), InsR (insulin receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), FGFR (fibroblast growth factor receptor), KLG/CCK (colon carcinoma kinase), NGFR (nerve growth factor receptor), HGFR (hepatocyte growth factor receptor), EphR (ephrin receptor), Axl, a Tyro3 PTK, TIE (tyrosine kinase receptor in endothelial cell types), LTK (leukocyte tyrosine kinase), ROR (receptor orphan), MuSK (muscle-specific kinase), LMR (Lemur *Abk.*: AB (acid box), CadhD (cadherin-like domain), CRD (cystein rich domain), DiscD (discoidin-like domain), EGFD (epidermal growth factor-like domain), FNIII (fibronectin type-III-like domain), IgD (immunoglobulin-like domain), KrinD (kringle-like domain), LRD (leucin-rich domain), α , β (verschiedene RPTK-Untereinheiten), * (keine intrinsische Kinaseaktivität), fett und kursiv (RPTKs, die in humanen Tumoren eine Rolle spielen)

Eine weitere Gruppe von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) bilden die im Zytoplasma gelöst vorliegenden nicht-Rezeptor-assoziierten PTKs (non-receptor PTKs). Sie sind wichtige Bestandteile der intrazellulären Signalkaskaden (z.B. Src-, Abl-Kinase).

Man unterscheidet vier, weitgehend homologe menschliche EGF-Rezeptoren, die eine Familie bilden: EGFR (HER, ErbB1), ErbB2 (Neu, HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Der am besten untersuchte Rezeptor dieser Familie ist der EGFR selbst. 1984 erfolgte die Aufklärung seiner cDNS-Sequenz [5,6].

Demnach hat der EGFR eine molare Masse von ca. 170 000 und besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette (Monomer) aus 1186 Aminosäuren mit einem hohen Oligosaccharidanteil (ca. 40 kDa).

Der EGFR ist aus einer extrazellulären ligandbindenden Domäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität aufgebaut. Beide Domänen sind durch eine hydrophobe Sequenz (transmembranäre Domäne) miteinander verbunden (Bild 2).

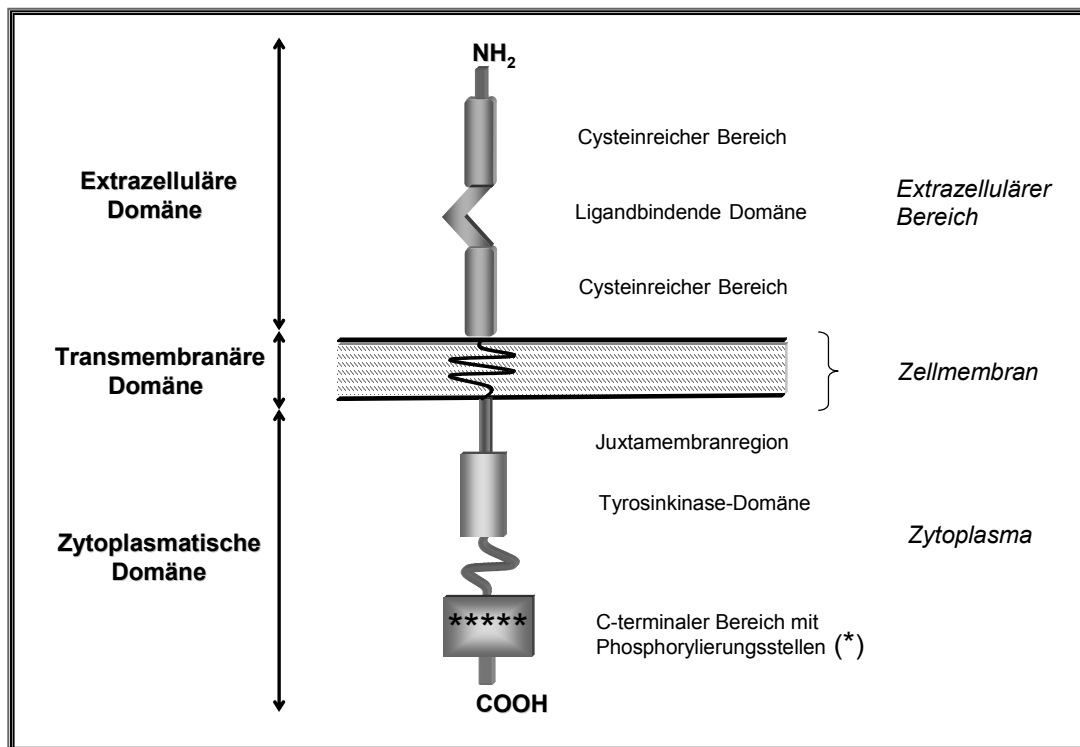


Bild 2: Schematischer Aufbau des EGF-Rezeptors [4]

Die extrazelluläre Domäne besteht aus 621 Aminosäuren, mehreren Oligosaccharidketten und hat zwei cysteinreiche Sequenzen (Σ 10 Prozent), zwischen denen sich die eigentliche ligandbindende Domäne befindet [7].

Die Transmembranregion ist aus 23, hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren aufgebaut und dient der Verankerung in der Membran und der Separierung von extrazellulärer und zytoplasmatischer Domäne.

Die zytoplasmatische Domäne besteht aus 542 Aminosäuren und kann nochmals in juxtamembrane Region, Tyrosinkinase-Domäne und carboxyterminalen Bereich unterteilt

werden [8]. Als juxtamembrane Region bezeichnet man die Sequenz zwischen Transmembran- und Tyrosinkinasedomäne.

Die Tyrosinkinase-Domäne ist in allen PTKs weitgehend homolog. Sie enthält immer eine Sequenz GlyXGlyXXGlyX(15-20)Lys, die Teil der ATP-Bindungstasche ist [9].

Neben der ATP-Bindungsstelle gibt es innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne eine Substratbindungsstelle und aufgrund der zentralen Rolle im Zellsignaling werden weitere Bindungsstellen für Regulationsfaktoren, Adapterproteine etc. postuliert.

Der carboxyterminale Bereich ist durch Phosphorylierungsstellen charakterisiert, von denen bisher sechs identifiziert werden konnten (Tyr 992, Tyr 1045, Tyr 1068, Tyr 1086, Tyr 1148, Tyr 1173) [10,11].

1.2.2 Die Liganden der EGF-Rezeptor-Familie

Zur EGF-Familie gehören über 3000 Proteine mit verschiedenen Funktionen. Von diesen konnten bisher zehn als Liganden der Rezeptoren der EGFR-Familie identifiziert werden:

- EGF (*engl.*: epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor)
- TGF- α (*engl.*: transforming growth factor- α = transformierender Wachstumsfaktor-alpha)
- AR (Amphiregulin; auch: Keratinozyten-autokriner Faktor, Kolorektumzellen-abstammender Wachstumsfaktor)
- HB-EGF (*engl.*: heparin binding epidermal growth factor-like factor = Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor-ähnlicher Faktor)
- BTC (Betacellulin)
- EPR (Epiregulin)
- EPI (Epigen)
- Neureguline
 - Hereguline (Isoformen α und β), (auch: Neureguline, gliale Wachstumsfaktoren, Acetylcholinrezeptor-induzierende Faktoren)
 - NRG-2s (Isoformen α und β), (Neuregulin-2; auch: Kleinhirn-abstammender Wachstumsfaktor)
 - NRG-3 [7,12].

EGF (53 Aminosäuren, 6.4 kDa) ist der Prototyp dieser sehr eng verwandten Wachstumshormone [13]. Alle Proteine der EGF-Familie haben als gemeinsames Merkmal eine aus 50 Aminosäuren bestehende Sequenz, die so genannte EGF-Domäne (Bild 3).

Diese enthält sechs Cysteinreste, die untereinander drei Disulfidbrücken ausbilden. Dadurch ist die Entstehung von drei Schleifen bedingt. Diese Sequenz kann auch mehrfach enthalten sein. Über die nicht-EGF-Sequenzen ist wenig bekannt, ihr Anteil kann aber beträchtlich sein [7].

EGF-Syntheseorte sind die Speicheldrüse sowie Mammapithel- und Nierentubuluszellen.

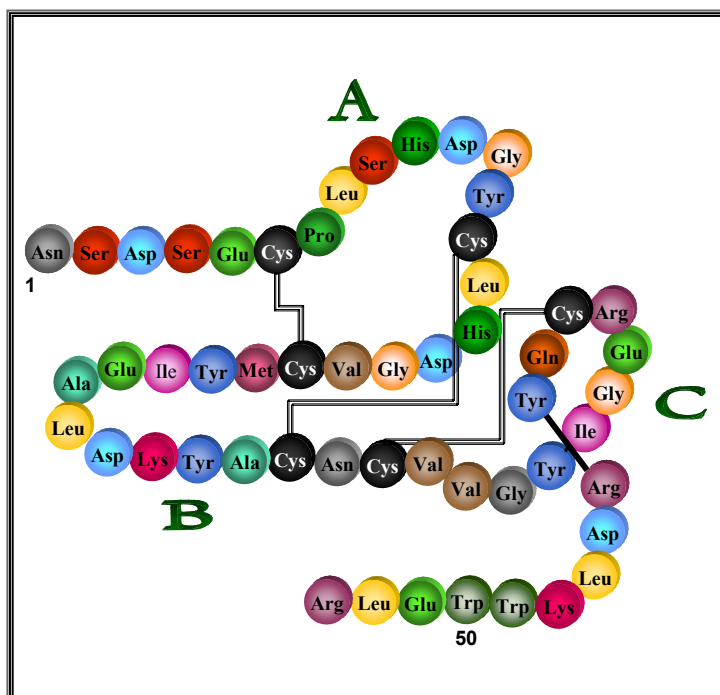


Bild 3: Schematische Darstellung der EGF-Primärstruktur – die Aminosäuren 1-50 entsprechen der sog. EGF-Domäne [14]
(A, B, C: durch Disulfidbrücken bedingte Schleifen)

Die oben genannten Faktoren, mit Ausnahme einiger Neuregulin-Isoformen, werden als glykosylierte, in der Membran verankerte Vorstufen synthetisiert [7]. Aus diesen Vorläufern wird durch Proteolyse der lösliche Wachstumsfaktor freigesetzt, der dann parakrin (an Rezeptoren anderer Zellen) wirkt [15]. Von NRGs ist auch bekannt, dass sie juxtakrin, d.h. als in der Membran verankert bleibende Faktoren, wirken können [10].

Der Proteolysevorgang wird durch eine Familie von transmembranären Metalloproteasen reguliert, die z.B. durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, aber auch durch tumorfördernde Phorbolster aktiviert werden.

1.2.3 Vergleich des EGF-Rezeptors mit dem Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor ist ebenfalls eine membranständige RPTK. Er wird von Leber-, Muskel- und Fettgewebszellen sowie von Monozyten und Fibrozyten exprimiert. Sein Ligand ist das Insulin, dessen Primärstruktur bereits 1949/50 von Sanger aufgeklärt werden konnte.

Insulin ist ein Peptidhormon, das aus zwei durch Disulfidbrücken verknüpften Peptidketten besteht. Die Biosynthese des Insulins erfolgt in den B-Zellen der LANGERHANS-Inseln [16].

Im Unterschied zum EGF-Rezeptor ist der Insulinrezeptor ein tetrameres Molekül mit der Struktur $\alpha_2\beta_2$. Er ist demnach aus je zwei identischen Untereinheiten aufgebaut, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Bild 4).

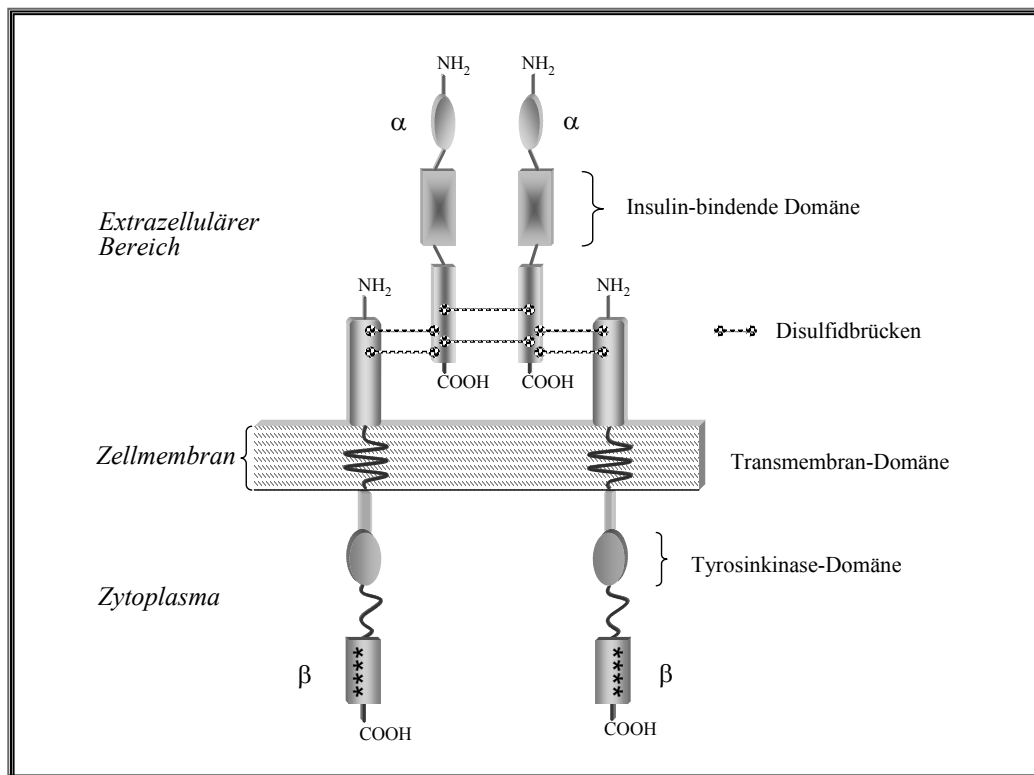


Bild 4: Schematischer Aufbau des Insulinrezeptors [17]

1.3 Funktionsweise des EGF-Rezeptors

1.3.1 Aktivierung durch Bindung eines Liganden

Die Aktivierung der Rezeptoren der EGFR-Familie erfolgt durch Bindung ihrer Liganden. Die EGF-Hormone (Abschnitt 1.2.2) haben unterschiedliche Affinitäten zu den Mitgliedern der EGFR-Familie (Tabelle 2).

Rezeptor/ Rezeptor- heterodimere	Affinitäten				
	sehr hoch (<1 nM)	hoch (1-100 nM)	moderat (100-1000 nM)	niedrig (>1000 nM)	keine messbare Bindung
EGFR		TGF- α , EGF, BTC, HB-EGF		Epiregulin	Hereguline, NRG-2s
ErbB2					
ErbB3		Heregulin- β	Heregulin- α		EGF, TGF- α , HB-EGF, Epiregulin, BTC, NRG-2s
ErbB4		BTC, Hereguline, NRG-2 β , EGF	Heregulin- α	Neuregulin-3	EGF, TGF- α , HB-EGF, Epiregulin, NRG-2 α
ErbB2/EGFR		TGF- α , EGF, BTC, HB-EGF		Epiregulin	Hereguline, NRG-2s, NRG-3
ErbB2/ErbB3	Heregulin- β	Heregulin- α	NRG-2 α		EGF, TGF- α , HB-EGF, NRG-2 α , BTC
ErbB2/ErbB4	BTC, Heregulin- β , NRG-2 α		NRG-3, Epiregulin, TGF- α , HB-EGF		

Tabelle 2: Einteilung der Liganden nach ihrer Bindungsaffinität zu den Rezeptoren der EGFR-Familie [18]

Für den ErbB2-Rezeptor konnte noch kein Ligand identifiziert werden (Orphan-Rezeptor) [10]. Er ist aber ein bevorzugter Dimerisierungspartner und erhöht z.T. die Affinitäten der mit ihm dimerisierenden Rezeptoren [7].

Ein Wachstumsfaktor bindet an zwei Rezeptoren gleichzeitig, das führt zu einer Dimerisierung [19]. Im Verlauf dieser Verdopplung können zwei EGF-Rezeptoren gleichen Typs (\rightarrow Homomer), aber auch unterschiedlichen Typs (\rightarrow Heterodimer) korrespondieren.

Die Fähigkeit der Liganden, unterschiedliche Rezeptorhomomere und -heterodimere zu stabilisieren (Tabelle 2), kann zum Teil mit ihrer Bivalenz erklärt werden. Die EGF-Hormone haben nämlich zwei verschiedene Bindungsstellen in ihrer EGF-homologen Domäne: eine mit hoher Bindungsaffinität im N-terminalen Bereich und eine mit niedriger Bindungsaffinität im C-terminalen Bereich [20].

Durch die Dimerisierung kommt es zur Konformationsänderung der Rezeptoren, und die Tyrosinkinasen werden aktiviert (Bild 5).

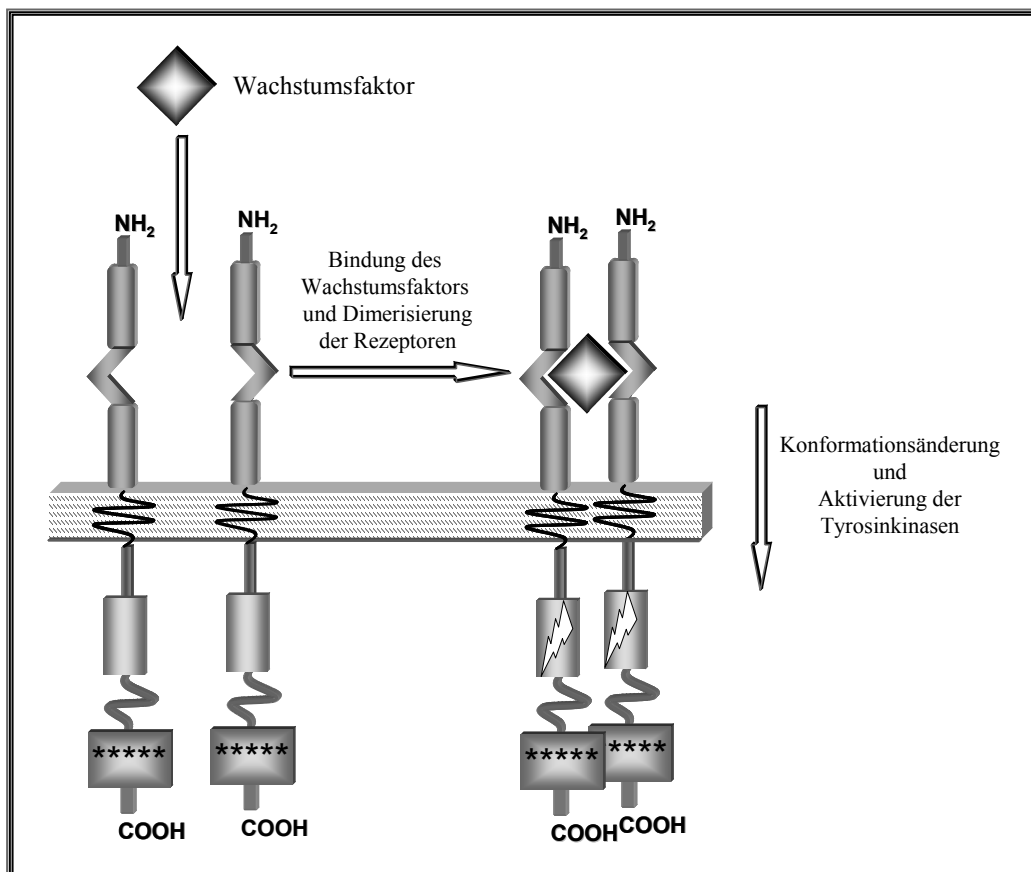


Bild 5: Schematische Darstellung der EGF-Rezeptor-Aktivierung [3]

1.3.2 Auto-/Transphosphorylierung an den Phosphorylierungsstellen im carboxyterminalen Bereich

Nach Aktivierung der Tyrosinkinase erfolgt die Bindung von ATP in der dortigen ATP-Bindungstasche. Der C-terminale Teil gelangt infolge dessen durch seine Flexibilität an die Substratbindungsstelle der TK-Domäne und wird dort, abhängig vom gebundenen Liganden und Dimerisierungspartner des Rezeptors, an bestimmten Autophosphorylierungsstellen phosphoryliert [21]. Dies kann auch durch die Tyrosinkinase des Dimerisierungspartners, also durch Transphosphorylierung, erfolgen [22]. Von den Phosphorylierungsstellen ist abhängig, welche Signalwege anschließend aktiviert werden.

Die entsprechenden Phosphotyrosine sind hochaffine Bindungsstellen für SH2-Domäne(n)-tragende Proteine (SH=src-homolog; src ist eine lösliche, im Zytoplasma lokalisierte Tyrosinkinase). Diese können zelluläre Signalproteine (z.B. src, PLC- γ , GAP) und Adapterproteine (z.B. GRB1, GRB2) sein [9,23].

Die Auto-/Transphosphorylierung der Rezeptorenmonomere wirkt sich modulierend auf die Phosphorylierungsaktivität gegenüber zellulären Substraten aus, da beide Vorgänge in Konkurrenz zueinander stehen [24].

1.3.3 Desaktivierung des Rezeptors

Nach Ligandbindung gelangen die Rezeptordimere in Clathrin-überzogene Bereiche der Zellmembran und werden in die Zelle aufgenommen (ligandinduzierte Endozytose) [25]. Dissoziiert der Ligand-Rezeptor-Komplex in der Zelle, wird der Rezeptor recycelt und gelangt zurück an die Zellmembran, ist dies nicht der Fall, wird der gesamte Komplex lysosomal abgebaut, wodurch die Anzahl an EGF-Rezeptoren an der Zellmembran sinkt. Auch diese Vorgänge sind abhängig vom gebundenen Liganden und Dimerisierungspartner. Für EGFR-Homomere mit gebundenem EGF wurde aber bisher nur der Abbau gefunden. Ist der Ligand aber TGF- α oder der Dimerisierungspartner ein ErbB2-Rezeptor, so kommt es zum Recycling [26].

Somit hat TGF- α ein höheres mitogenes Potential als EGF, da das Rezeptorrecycling überwiegt und die Anzahl der EGF-Rezeptoren an der Zellmembran somit nahezu gleich gehalten wird [15,27].

1.4 EGFR-Signaling

Als EGFR-Signaling bezeichnet man die Übertragung der durch Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren ausgelösten Signale durch das Zytoplasma zum Zellkern.

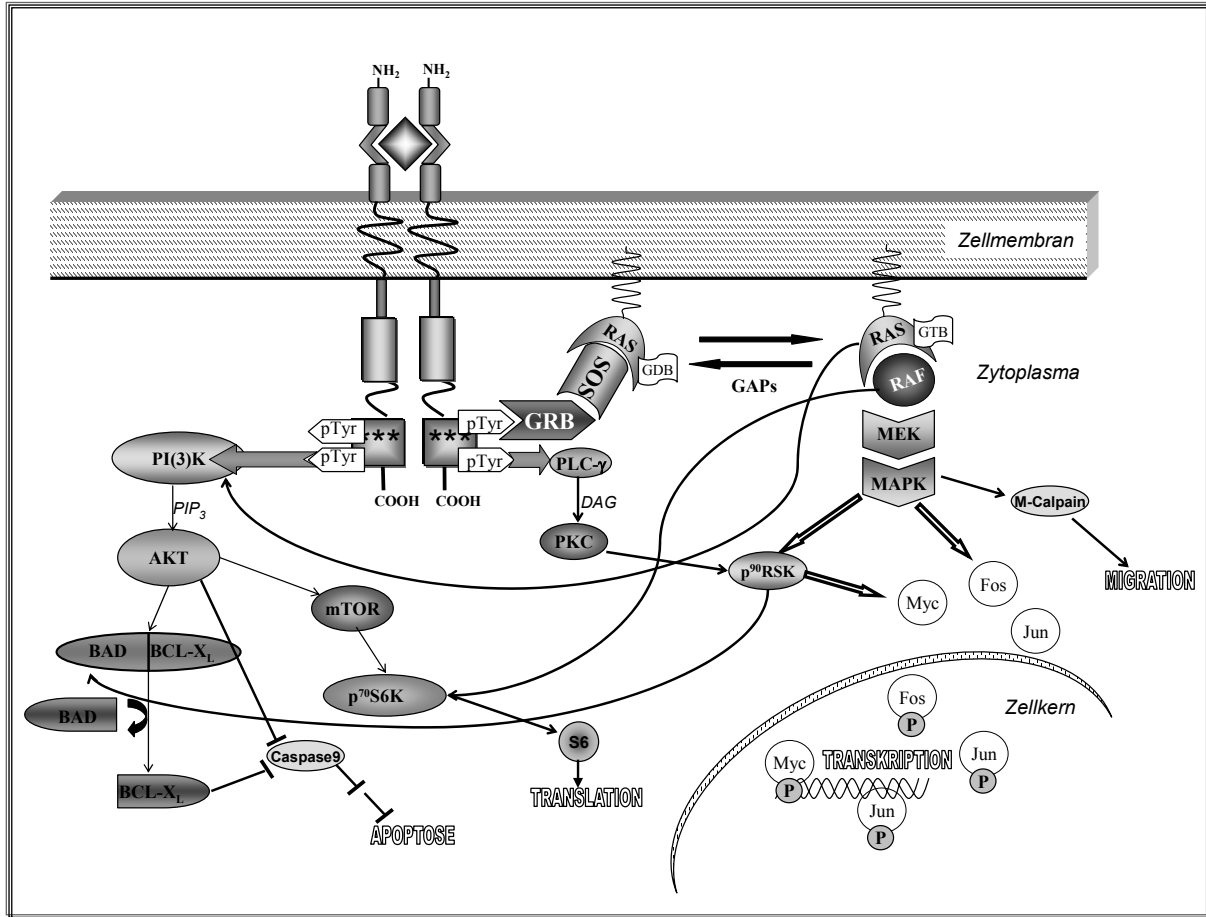


Bild 6: Vereinfachtes Schema des EGFR-Signaling, (Abk. s. Text) [28,29,30,31,32,33]

Dabei werden durch EGFR-Aktivierung eine Reihe von Signalwegen einganggesetzt (Bild 6), die sich untereinander kreuzen und überlappen können und so im Endeffekt zu Genexpression, Zellteilung, Differenzierung, Steigerung der Zellbeweglichkeit und Inhibition der Apoptose führen.

Diese Vorgänge unterliegen normalerweise einer strikten Kontrolle und Regulation. Störungen im EGFR-Signaling, auf die an späterer Stelle eingegangen wird, können zur Tumorbildung führen. Wie zuvor bereits beschrieben (Abschnitt 1.3.2), sind die durch Auto-/Transphosphorylierung bereitgestellten Phosphotyrosine wichtige Ausgangspunkte des EGFR-Downstream-Signaling, da sie Bindungsstellen für Signal- und Adapterproteine sind. Die wichtigsten Substrate der EGFR-PTK sind das G-Protein Ras, PI3K

(Phosphatidylinositol-3-Kinase) und PLC- γ (Proteinlipase C- γ). Ras bindet dabei aber nicht direkt an Strukturen des EGFR's, sondern über Adapterproteine (GRB) (Bild 6).

1.4.1 Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade

RAS ist ein in der Membran verankertes G-Protein, das in der inaktiven GDP- und der aktiven GTP-gebundenen Form existiert. Die Bildung des aktiven, GTP-gebundenen RAS erfolgt durch die Bindung an SOS (*engl.*: son of sevenless) oder einem anderen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GNEF: *engl.*: guanine nucleotide exchange factor) [36].

Das SOS-Protein ist wiederum über das Adapterprotein GRB2 mit der zytoplasmatischen Domäne des aktivierten EGFR's verbunden. Die Bindung von SOS an RAS bewirkt dessen Konformationsänderung, die eine Dissoziation von GDP und die Bindung von GTP zur Folge hat.

RAS-GTP rekrutiert die Serin/Threonin-Kinase (Ser/Thr-Kinase) Raf (auch MAPKKK: *engl.*: mitogen-activated protein kinase kinase kinase) in die Nähe der Zellmembran und aktiviert diese [34]. Einmal aktiviert, phosphoryliert Raf die Ser/Thr-Kinase MEK (auch MAPKK: *engl.*: mitogen-activated protein kinase kinase), durch die dann die MAPK (*engl.*: mitogen-activated protein kinase, auch ERK: extracellular signal-regulated kinase), ebenfalls eine Ser/Thr-Kinase aktiviert wird [35].

Das G-Protein RAS aktiviert vermutlich auch die PI3K, die PLC- γ und weitere Downstream-Effektoren, wie die G-Proteine RAC und RHO [36].

1.4.2 Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase ist ein Enzym, das Phosphatidylinositol (z.B. PIP₂→PIP₃) und verwandte Substrate phosphoryliert. Sie ist ein Heterodimer aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit.

Über eine SH2-Domäne in der regulatorischen Untereinheit erfolgt die Bindung an Phosphotyrosin in der zytoplasmatischen Domäne des EGFR's. Dadurch wird die Phosphorylierung durch die EGFR-PTK ermöglicht [26].

Das am besten untersuchte PI3K-Substrat ist AKT, eine zelluläre Ser/Thr-Kinase. Diese Kinase gilt als Verzweigungspunkt zweier bedeutender Signalwege: nämlich einem Proliferations-aktivierenden und einem Apoptose-inhibierenden Signalweg.

Akt spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Balance zwischen Überleben und Apoptose [37,38].

1.4.3 Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ)

Die phosphorylierten Tyrosine Tyr 992, Tyr 1068 und Tyr 1173 sind potentielle Bindungsstellen für die SH2-Domänen der PLC- γ , die dann durch Tyrosinphosphorylierung durch die EGFR-PTK aktiviert wird [11]. Zusätzlich kann die Aktivierung durch Phosphorylierung an Serinresten erfolgen. Dies geschieht durch eine Serinkinase, die vermutlich ebenfalls im Rahmen des EGFR-Signalings aktiviert wird.

PLC- γ gehört zu einer Familie von Isoenzymen, die Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysieren [39]. IP₃ ist ein intrazellulärer Botenstoff (second-messenger), der im endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeicherte Calciumionen freisetzt, wodurch Ca-abhängige Enzyme und Prozesse aktiviert werden [40]. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) [39].

1.4.4 Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellwachstum

Als Proliferation bezeichnet man die Vermehrung von Gewebe durch Zellteilung (→Erhöhung der Zellzahl) und/oder Zellwachstum.

Die Replikation tierischer Zellen ist ein zyklischer Prozess in vier Phasen:

- (1) G₁-Phase, gekennzeichnet durch Proteinbiosynthese und Zellwachstum
- (2) Synthesephase (S-Phase), in der die Verdopplung der DNS erfolgt
- (3) G₂-Phase, ebenfalls gekennzeichnet durch Proteinbiosynthese und Zellwachstum
- (4) Mitosephase (M-Phase), in der die DNS auf die zwei Tochterzellen verteilt wird.

Nach der Mitose tritt die Zelle entweder in einen neuen Zellzyklus ein oder es kommt zur Differenzierung. Des Weiteren ist der Eintritt der Zelle in eine Ruhephase (G₀-Phase) möglich [41].

Regulatoren des Zellzyklus sind die cyclinabhängigen Proteinkinasen (Cyclinkinasen; CDK: *engl.*: cyclin-dependent kinases), die in einem komplexen Signaltransduktionssystem für die vollständige und richtige Weitergabe des Genoms sorgen und somit wesentlich zu dessen Stabilität beitragen [42,43].

Wachstumsfaktoren steuern Zellwachstum und -proliferation, indem sie den Übergang einer Zelle von der G₀-Phase in die G₁-Phase, das Voranschreiten der G₁-Phase sowie den Eintritt in die S₁-Phase induzieren. Dies erfolgt durch die Aktivierung der Transkription bestimmter Gene und die Aktivierung der Translation bestimmter mRNS [32].

1.4.4.1 EGFR-vermittelte Aktivierung von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellwachstum

Durch die im Rahmen des EGFR-Signalings aktivierte RAS/MAPK-Signalkaskade sowie die PI3K-Signalkaskade kommt es zu einer Steigerung von Transkription und Translation.

Durch die MAPK werden u.a. die Ser/Thr-Kinasen p90RS6K (*engl.*: 90kD ribosomal S6 kinase) und MSK-1 (*engl.*: mitogen and stress activated kinase-1) sowie eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk-1, c-fos, c-myc) aktiviert [44,45].

Die beiden Ser/Thr-Kinasen wiederum können an der Transkription beteiligte Proteine phosphorylieren, die dadurch aktiviert werden.

Die durch die MAPK aktivierten Transkriptionsfaktoren gelangen in den Zellkern. Dort lösen sie durch Wechselwirkungen mit DNS-Elementen in der Promotorregion von Genen deren Transkription aus [46]. Dabei handelt es sich vor allem um Gene, die für Proteine kodieren, die an dem Voranschreiten und der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind (z.B. Cyclin D1 → fördert Eintritt in einen neuen Zellzyklus).

Die PI3K/Akt-Signalkaskade ist an der Kontrolle der Translation während der Proteinbiosynthese beteiligt. Der Akt-Downstream-Effektor mTor (*engl.*: mammalian target of rapamycin), ebenfalls eine Ser/Thr-Kinase, fungiert als ein Sensor für das Angebot an Nährstoffen und sorgt für ein Gleichgewicht zwischen Nährstoffangebot und Zellwachstum. Wenn benötigte Nährstoffe in ausreichendem Maße vorhanden sind, gibt mTor ein positives Signal an die Ser/Thr-Kinase p70S6K.

Diese phosphoryliert dann das ribosomale Protein S6 (S6 ribosomal protein) und dadurch kommt es zu einer Steigerung der Translation, wobei vor allem Proteine entstehen, die am Voranschreiten des Zellzyklus (vor allem G₁-Phase) beteiligt sind und Proteine, die an der Translation beteiligt sind [47]. Die Kinasen mTor und p70S6K sind somit wichtige Aktivatoren des Zellzyklus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch EGFR-Aktivierung Vorgänge der Transkription und der Translation gefördert werden, wodurch es zu Proliferation, Differenzierung und Wachstum kommen kann.

1.4.5 Apoptose

Apoptose ist der programmierte Zelltod. Sie ermöglicht die sichere Beseitigung geschädigter Zellen ohne Entzündungsreaktionen. Caspasen [Cysteinyl-Aspartasen, früher ICE (Interleukin-1 β -converting enzyme)-like Proteasen], eine Familie von Cystein-Proteasen, sind die Hauptregulatoren der Apoptose.

Initiator-Caspasen wie die Caspasen 8 und 9 werden durch proapoptotische Signale aktiviert. Caspase 8-Aktivierung erfolgt durch die Bindung von Liganden (FasL/CD178, TNF) an so genannte Todesrezeptoren (Fas/CD95, TNF-R1, = Rezeptor-basierte Apoptose) [48].

Die Aktivierung der Caspase 9 kann durch Cytochrom C erfolgen. Cytochrom C wird nach DNS-Schädigung (z.B. durch γ -Strahlen) aus den Mitochondrien freigesetzt [49].

Die aktivierten Initiator-Caspasen aktivieren dann wiederum nachgeschaltete Caspasen (z.B. Caspase 3, 6 und 7), die dann hauptsächlich die Spaltung von Lamin- und Aktin-Strukturen induzieren. Darüber hinaus wurden viele weitere Caspase-Substrate identifiziert, die häufig Bestandteil des DNS-Reparaturapparates oder der Zellstruktur sind.

Infolge dessen kommt es zu den typischen morphologischen Veränderungen von Zelle und Zellkern, zur Degradierung der DNS durch Fragmentierung und zur Inhibition der DNS-Reparatur [50,51].

Im Rahmen des EGFR-Signalings kann es zu einer Inhibition der Apoptose kommen. Dies wird im folgenden Abschnitt erläutert.

1.4.5.1 EGFR-vermittelte Apoptose-Inhibition

Das Schlüsselenzym der EGFR-induzierten Apoptose-Inhibition ist die Akt-Kinase (=PKB, Rac). Sie wird durch Phosphatidylinositol-3-phosphat (PIP₃), das durch PI3K katalysierte Reaktionen bereitgestellt wird, aktiviert. Zu ihren Downstream-Effektoren gehören Apoptose-fördernde Faktoren, wie Caspase 9 und BAD, die durch Akt phosphoryliert und dadurch inhibiert werden.

Das proapoptotische Protein BAD kann dann nicht mehr an Bcl-xL binden, um dieses zu inhibieren. Bcl-xL ist ein antiapoptotisches Protein in der äußeren Hüllmembran der Mitochondrien, das dort die Freisetzung von Cytochrom C inhibiert und damit Caspase 9-Aktivierung und Apoptose verhindert [52].

Die Akt-Kinase kann die Caspase 9 auch direkt inhibieren.

Die MAPK (s. Ras/MAPK-Signalweg) und die PKC (s. PLC- γ) aktivieren die Kinase p90RSK (90 kDa-ribosomale S6-Kinase) [32]. Diese aktiviert nachfolgend den Transkriptionsfaktor CREB (*engl.*: cAMP response element-binding protein), was zu einer Steigerung der Expression antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie (z.B. Bcl-xL) führt. Weiterhin kann auch p90RSK das BAD-Protein phosphorylieren und damit inhibieren [29,30,50].

1.4.6 Migration

Die Migration von Zellen, also deren Wanderung, ist ein wichtiger Schritt während der Embryonalentwicklung und der Wundheilung (physiologisch), aber auch für die Metastasierung (pathophysiologisch) von Bedeutung.

Zellen liegen in einem Zellverband sozusagen verankert vor. Die Verankerung erfolgt durch fokale Adhäsionsproteine. Fokale Adhäsionsproteine (z.B. Talin) stellen eine Verbindung zwischen den membranständigen Integrin-Rezeptoren, die an Liganden in der extrazellulären Matrix gebunden sind und dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett her [53,54].

Damit die Migration der Zelle möglich wird, müssen neue fokale Adhäsionen am vorderen Ende der Zelle ausgebildet werden und alte am hinteren Ende der Zelle gelöst werden. Des Weiteren muss der Zellkörper nach vorn bewegt werden und sich das Zytoskelett abschließend reorganisieren [55].

Somit stellt die Migration einen sehr komplexen biophysikalischen Prozess unter Beteiligung vieler verschiedener Faktoren dar, der in vier Hauptschritten abläuft:

- (1) Ausbildung von Zellfortsätzen (Lamellipodia, Filopodia) am nach vorn gerichteten Ende
- (2) Formierung neuer Adhäsionen am „vorderen Ende“
- (3) Bruch der Adhäsionen am „hinteren Ende“ (Deadhäsion)
- (4) Translokalisierung der Zellmasse, Reorganisation des Zytoskeletts [56].

Diese Vorgänge werden intrinsisch, aber auch extrinsisch, und zwar z.T. durch Wachstumsfaktoren reguliert [57].

1.4.6.1 EGFR-vermittelte Vorgänge der Migration

Der EGFR ist an der Induktion der Schritte 3 und 4 der Migration durch Aktivierung von M-Calpain beteiligt [57].

Man unterscheidet zwei Calpain-Isoformen: M-Calpain und Mu-Calpain. M- und Mu-Calpain sind Calcium-abhängige Cystein-Proteasen, die fokale Adhäsionsproteine proteolytisch spalten und somit eine wichtige Rolle sowohl bei Deadhäsionsvorgängen, als auch bei der Ausbildung neuer Adhäsionen spielen.

Über den Erk/MAPK-Weg wird M-Calpain aktiviert, wobei der Mechanismus noch nicht geklärt ist. M-Calpain spielt eine wichtige Rolle bei der Deadhäsion und ermöglicht somit die Translokation.

Mu-Calpain ist bei der Ausbildung neuer Adhäsionen von Bedeutung. Die Aktivierung von Mu-Calpain ist unabhängig vom EGFR-Signaling [57].

1.5 Gesteigertes EGFR-Signaling als eine Ursache für die Krebsentstehung

1.5.1 Protoonkogene - Onkogene

Protoonkogene sind Gene, die für Proteine kodieren, die die Zellproliferation anregen (z.B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Nicht-Rezeptor assoziierte PTKs, Transkriptionsfaktoren). Beim Menschen wurden bisher über fünfzig solcher Protoonkogene identifiziert [16]. Protoonkogene ähneln oft bestimmten Sequenzen in der Erbinformation tumorerzeugender Retroviren.

Das für den EGFR kodierende Gen (c-erbB1) ist ein derartiges Protoonkogen. Es ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und besteht aus 26 Exons. Davon kodieren die Exons 2-14 die extrazelluläre Domäne, das Exon 15 die Transmembran-Domäne, die Exons 16-21 die Tyrosinkinase-Domäne und die Exons 22-26 den carboxyterminalen Bereich mit den Autophosphorylierungsstellen [58].

Man fand eine weitgehende Homologie des c-erbB1-Gens zum v-erbB-Onkogen des Avian Erythroblastosis Virus [6,59]. Dieses Onkogen kodiert eine trunkierte (verkürzte) Form des EGFR's (Deletion in der extrazellulären Domäne), dessen Tyrosinkinase konstitutiv aktiviert ist [60]. Auch das Gen für den erbB2-Rezeptor (c-erbB2) auf Chromosom 17 ist ein Protoonkogen [61,62].

Onkogene sind Gene, die auf die Zellproliferation so stark aktivierend einwirken, dass ein Tumor entstehen kann. Protoonkogene können durch Mutationen aktiviert und somit zu Onkogenen werden. Diese Umwandlung erfolgt durch Genamplifikation (Vervielfältigung des Gens), Punktmutationen durch ionisierende Strahlen oder chemische Kanzerogene und Translokationen (chromosomale Rekombinationen) [63].

1.5.2 Ursachen eines gesteigerten EGFR-Signalings

1.5.2.1 Überexpression des EGF-Rezeptors

Die Ursachen für eine gesteigerte Expression des EGFR's können Genamplifikation, gesteigerte Aktivität des EGFR-Promotors und Dysregulation von Prozessen der Translation und Posttranslation sein.

Die Anzahl an EGF-Rezeptoren beträgt in normalen Zellen ungefähr 40-100, maligne Zellen können bis zu zwei Millionen EGF-Rezeptoren besitzen [8].

Diese Überexpression wirkt sich wie folgt aus:

- Steigerung von Zellbeweglichkeit, -adhäsion und -invasionskapazität (→ erhöhtes Metastasierungspotential) [64,65,66]
- Störungen der normalen Zellzykluskontrolle und Blockierung der Apoptose (→ gesteigerte Proliferation) [67,68]
- Förderung der Angiogenese (= Gefäßneubildung → ermöglicht schnelles Wachstum durch ausreichende Bereitstellung der benötigten Substrate) [69].

Obwohl die Daten variieren, findet man bei den meisten soliden Tumoren eine vermehrte EGFR-Expression. Darüber hinaus exprimieren die meisten Tumore auch verstärkt die anderen Mitglieder der EGFR-Familie [70].

Dabei sind erhöhte EGFR-Level häufig ein Marker für ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium mit schlechter Prognose [71,72].

1.5.2.2 Autokrine Stimulation

Normalerweise wirken Wachstumsfaktoren nach einem parakrinen Mechanismus (Abschnitt 1.2.2).

In Tumoren hingegen werden Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren häufig von ein und derselben Zelle gebildet, d.h. die Faktoren wirken nach einem autokrinen Mechanismus (sog. autocrine loops) [73,74].

Das Umschalten von parakriner zu autokriner Aktivierung ist ebenfalls ein wichtiger Faktor bei der malignen Transformation und während der Tumorprogression und tritt meist gemeinsam mit einer Rezeptorüberexpression auf.

1.5.2.3 c-erbB1-Genmutationen

Mutationen des c-erbB1-Gens, die bei menschlichen Tumoren eine Rolle spielen, betreffen vor allem die Exons 2-14 und 22-26, seltener die für die Juxtamembran- und Tyrosinkinase-Domäne kodierenden Genabschnitte.

Die größte Rolle spielen dabei Deletionen, die zu trunkierten Rezeptoren führen (Bild 7). Diese sind häufig auch ohne Stimulation durch Wachstumsfaktoren (konstitutiv) aktiviert. Sie

beeinträchtigen die Rezeptor-Downregulierung und/oder aktivieren andere Signalwege als der Wildtyp-EGFR. Infolge dessen kommt es zu einer gesteigerten Proliferation der sie exprimierenden Zellen [8].

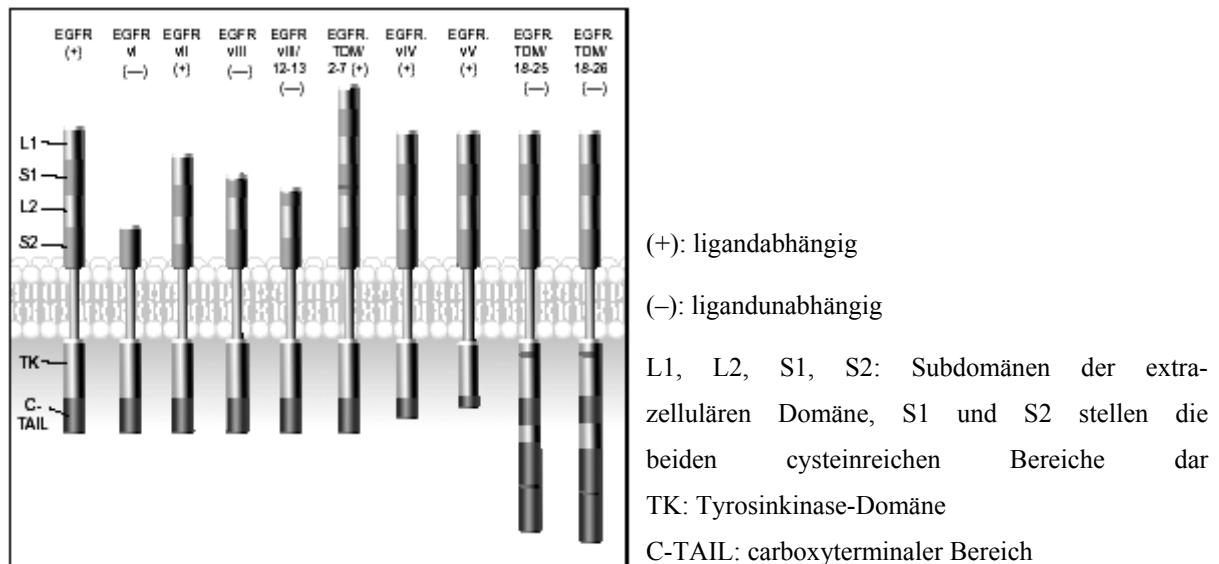


Bild 7: Schematische Darstellung von Mutationen des EGFR's [8]

Der in menschlichen Tumoren am häufigsten vorkommende EGFR-Mutant ist der EGFRvIII, ein in der extrazellulären Domäne trunkierter Rezeptor mit einer fehlerhaften Ligandbindungsdomäne. Ursache dafür ist eine Deletion der Exons 2-7 des c-erbB1-Gens, die zu einem Verlust der Aminosäuren 6-273 (Σ 267 AS) führt. Diese mutierte Form spielt eine Schlüsselrolle bei hochaggressiven Tumoren und wird vor allem von Glioblastom-, Mammakarzinom-, Prostatakarzinom- und Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen exprimiert [60,61,62].

Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Tyrosinkinase des EGFRvIII auch in Abwesenheit von stimulierenden Liganden, also konstitutiv aktiviert ist.

Des Weiteren ist ein häufig in Tumoren des Menschen nachgewiesener EGFR-Mutant ein im carboxyterminalen Bereich trunkierter Rezeptor, bei dem durch Deletion die endständigen Aminosäuren 958-1186 fehlen. In diesem Fall ist die Phosphorylierungskapazität der TK für zelluläre Substrate stark erhöht, da die normalerweise durch den carboxyterminalen Bereich erfolgende Modulation der Phosphorylierung nicht mehr in vollem Maße stattfinden kann.

Allgemein kann es durch Deletionen im carboxyterminalen Bereich auch zu Änderungen der Substratspezifität kommen und damit zur Aktivierung Wildtyp-EGFR-alternativer Signalwege [75].

Mutierte Formen des EGFR's wurden bisher nur in Tumoren nachgewiesen, die den EGFR auch überexprimieren.

1.6 Inhibitorischer Eingriff in das EGFR-Signaling – Neue Krebstherapiestrategien

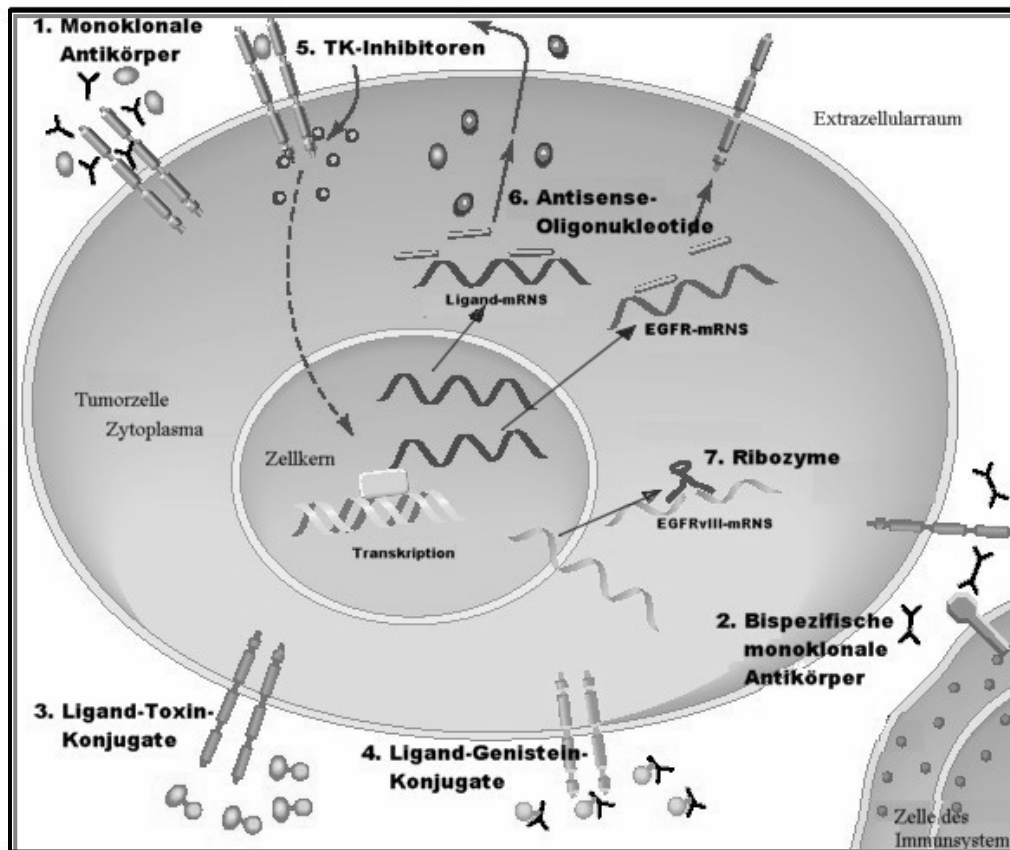


Bild 8: Schematische Darstellung der Möglichkeiten zur Inhibition des EGFR-Signaling [8]

1.6.1 Angriff an der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors

1.6.1.1 Monoklonale Antikörper

Gegen den EGF-Rezeptor gerichtete Antikörper (AK, Bild 8: 1.) binden spezifisch und mit hoher Affinität an den Rezeptor und verhindern somit nach einem kompetitiven Mechanismus die Bindung seiner natürlichen Liganden (z.B. EGF, TGF- α). Dadurch wird die ligandinduzierte TK-Aktivierung verhindert.

Des Weiteren wird die Aufnahme des Rezeptors in die Zelle (ligandinduzierte Endozytose), dessen Abbau und damit eine Rezeptor-Downregulation forciert [76,77]. Durch die fehlende Signalweiterleitung wird der Zellzyklus unterbrochen und die Apoptose induziert. Zusätzlich kann eine Hemmung der Angiogenese durch AK nachgewiesen werden [78].

IMC-C225 (Erbix, ImClone Systems/Merck, früher C225, Cetuximab, Merck) ist ein monoklonaler, chimärer EGFR-AK, der momentan die Phase III klinischer Studien durchläuft. Die bisherigen präklinischen und klinischen Daten weisen darauf hin, dass IMC-C225 die Wirksamkeit der konventionellen Chemo- und Strahlentherapie erhöht [79,80].

Ein weiterer, momentan die Phasen I (bei soliden Tumoren) bzw. II (Pankreaskarzinom) klinischer Studien durchlaufender EGFR-AK ist EMD 72000 (Merck). Es handelt sich um einen vollständig humanisierten monoklonalen AK. Durch die Humanisierung wird das Risiko von Immunreaktionen auf ein Minimum gesenkt, was auch die Zirkulationszeit im Blut und damit die Wirkdauer erhöht. Die Wirksamkeit entspricht der von IMC-C225 [78].

1.6.1.2 Bispezifische monoklonale Antikörper

Bispezifische monoklonale Antikörper (Bild 8: 2.) sind Konjugate aus einem EGFR-AK und einem Chemo- oder Strahlentherapeutikum oder Zytokin (Immunozytokine). Durch die Bindung an einen AK gelingt es, die entsprechenden zytotoxischen Agenzien spezifisch zum Tumor zu bringen bzw. die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort am Ort des Geschehens zu verstärken [3,78,80,81].

MDX 447 (Medarex) ist ein solcher bispezifischer AK, der eine Bindungsstelle für den EGFR und eine weitere für den IgG-Rezeptor CD64 hat und momentan in Phase II klinischer Studien getestet wird. Durch seine Bispezifität bringt er CD64-tragende Zellen des Immunsystems (Neutrophile, Monozyten) in unmittelbare Nähe der Tumorzellen [82].

Die spezifische Anreicherung eines Strahlenisotops (z.B. ^{90}Y , ^{131}J) in einem Tumorgewebe gelingt ebenfalls mit bispezifischen AK. Die entsprechenden Konjugate bilden sich dabei erst im Körper. Zunächst wird nur der entsprechende EGFR-Strahlenisotop-bispezifische AK verabreicht, der sich im EGFR-(über)exprimierenden Tumorgewebe anreichert. Anschließend werden die im Körper zirkulierenden überschüssigen AK entfernt. Dann erst wird das Strahlenisotop gegeben, das sich nun durch Bindung an den bispezifischen AK ebenfalls bevorzugt im Tumorgewebe anreichert [83].

1.6.1.3 Ligand-Toxin-Konjugate

Toxine sind potente zytotoxische Proteine. Um ihre Wirksamkeit (→ Blockade der Proteinsynthese) zu entfalten, müssen sie ins Zytosol gelangen.

Dies gelingt durch Bindung an einen EGFR-Liganden (meist HB-EGF, EGF, TGF- α), also durch so genanntes Drug-Targeting. Der Komplex bindet an den Rezeptor und wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, wo das Toxin durch Bindung an zelluläre Bestandteile wirkt (Bild 8: 3.).

Als Toxine werden z.B. *Pseudomonas*-Exotoxin, *Diphtheria*-Toxin (jeweils bakteriellen Ursprungs) und Ricin (aus Ricinussamen) verwendet [84].

Diese Ligand-Toxin-Konjugate befinden sich momentan ebenfalls in präklinischen Studien.

1.6.1.4 EGF-Genistein-Konjugate

Konjugate aus EGF und Genistein (5,7,4'-Trihydroxyisoflavin), einem Isoflavon der Sojabohne mit TK-inhibitorischer Wirkung, sind nachgewiesen wirksamer als Genistein allein (Bild 8: 4.; Bild 9).

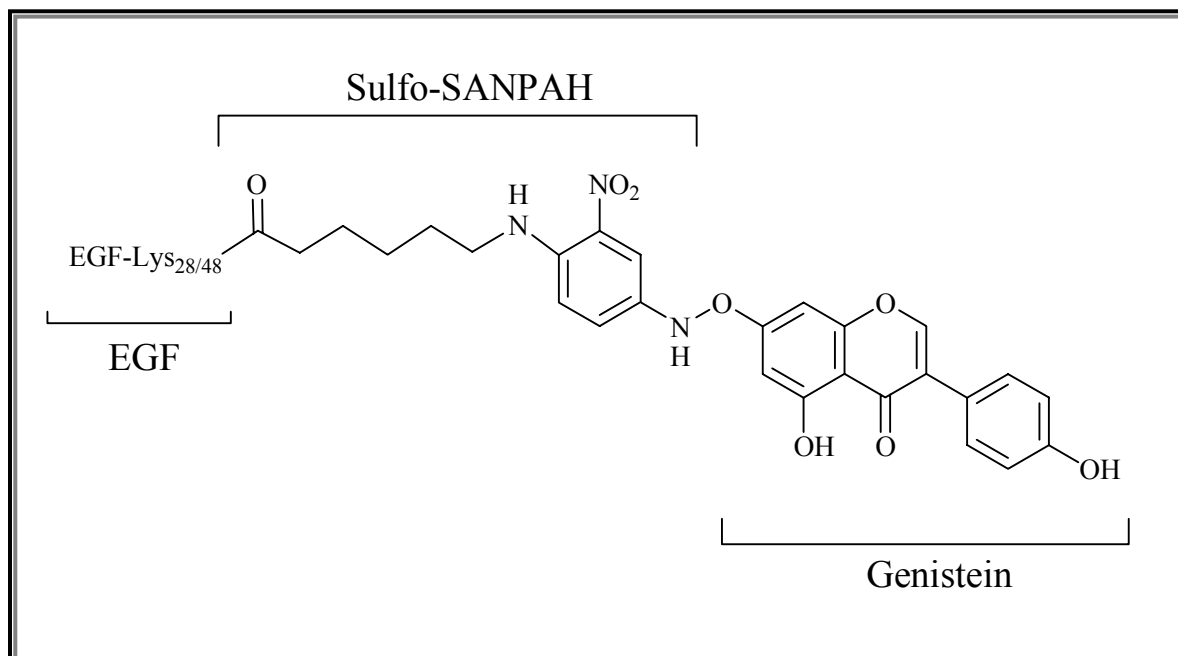


Bild 9: EGF-Genistein-Konjugat [85]

Die Herstellung des Konjugates erfolgt durch photochemische Konjugation mittels dem bifunktionellen Photolinker Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino)-hexanoat (Sulfo-SANPAH, Bild 10) [86,87].

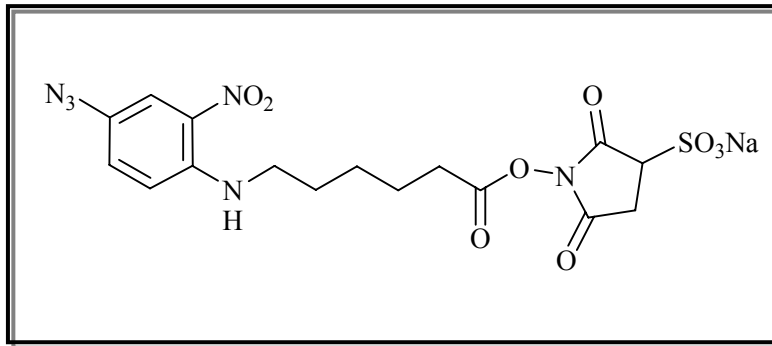


Bild 10: Der Photolinker Sulfo-SANPAH

Durch die Bindung an EGF wird das ansonsten eher schlecht zellgängige Genistein mittels der ligandinduzierten Endozytose ins Zytoplasma „geschleust“ und kann seine ATP-antagonistische Wirkung an der Tyrosinkinase entfalten.

Im Apoptose-Essay an der EGFR-exprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 hatte Genistein allein eine $IC_{50} = 120 \mu\text{M}$, das EGF-Genistein-Konjugat hingegen war mit einer $IC_{50} = 0,03 \mu\text{M}$ um das 4000-fache wirksamer. Anzumerken ist hier, dass die gleichen Konzentrationen des Konjugates 270-mal weniger Genistein enthalten [86].

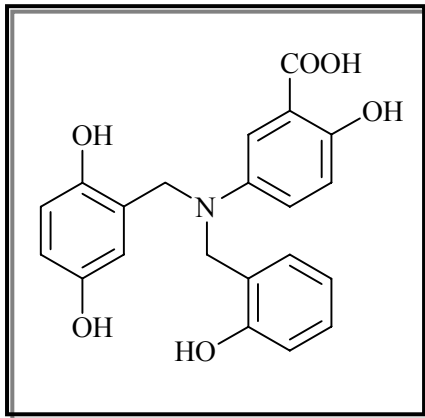
Auch EGF-Genistein-Konjugate befinden sich momentan noch in der Präklinik.

1.6.2 Angriff an der zytoplasmatischen Domäne des EGF-Rezeptors

1.6.2.1 EGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren

Die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase erfolgt durch kompetitiven ATP- und/oder Substrat-Antagonismus. TK-Inhibitoren (Bild 8: 5.) sind gewöhnlich kleine Moleküle, die sowohl aus Naturprodukten isoliert, als auch synthetisch gewonnen sein können.

Um an ihren Wirkort im Zytoplasma zu gelangen, müssen TK-Inhibitoren die Zellmembran durchdringen.



Ein sehr potenter EGFR-TK-Inhibitor natürlichen Ursprungs ist das aus *Streptomyces griseolavendus* isolierte Lavendustin A (Bild 11).

Die Substanz hat eine hohe *In-vitro* - Aktivität gegen die EGFR-TK ($IC_{50} = 0,011 \mu M$), ist aber, wahrscheinlich aufgrund schlechten Penetrationsvermögens, *in-vivo* nahezu unwirksam [88,89].

Bild 11: Der aus *Streptomyces griseolavendus* isolierte EGFR-TK-Inhibitor Lavendustin A

Der Durchbruch bei der Entwicklung von EGFR-TK-Inhibitoren gelang Mitte der 1990er Jahre mit den 4-Anilinochinazolin- und Pyridopyrimidin-Derivaten (AstraZeneca, Pfizer). Die am weitesten entwickelten Substanzen dieser Strukturklassen, ZD-1839 (Iressa[®], AstraZeneca, $IC_{50} = 0,023 \mu M$) und OSI-774 (Tarceva[®], OSI/Roche, $IC_{50} = 0,02 \mu M$), (beide Bild 12), befinden sich momentan in Phase III der klinischen Prüfung und zeigen besonders in Kombination mit konventioneller Chemo- und Strahlentherapie sehr gute Wirksamkeit (erhöhen die Apoptose-Induktion herkömmlicher Therapien um das 2- bis 3,5-fache) [90,91].

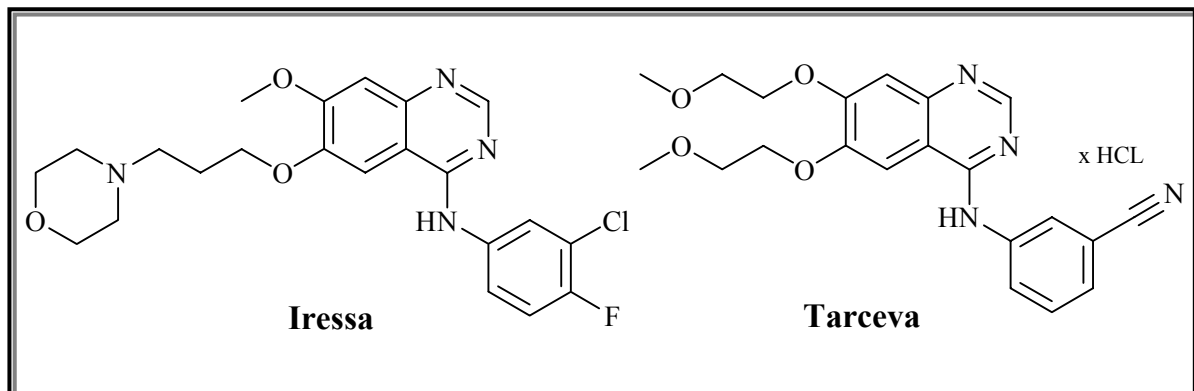


Bild 12: Die EGFR-TK-Inhibitoren mit Chinazolin-Grundgerüst Iressa[®] und Tarceva[®]

Beide Substanzen hemmen kompetitiv und reversibel die Bindung von ATP an die EGFR-TK-Domäne des HER1-Rezeptors. Dadurch wird das Tumorwachstum gestoppt (zytostatischer Effekt), in höheren Dosen wurde auch eine Rückbildung des Tumors beobachtet [92].

Ein weiteres Ziel war die Entwicklung irreversibler EGFR-TK-Inhibitoren. CI-1033 (Pfizer, $IC_{50} = 0,0014 \mu M$, Bild 13), ebenfalls aus der Gruppe der 4-Anilinochinazoline, ist ein irreversibler EGFR-TK-Inhibitor, der momentan in Phase I der klinischen Prüfung getestet

wird [93]. Die Substanz bindet über eine Michael-Akzeptor-Position in der 6-Seitenkette kovalent an Cys 773 in der ATP-Bindungstasche der TK-Domäne. CI-1033 hemmt die TKs aller EGF-Rezeptoren (HER1-4) [93].

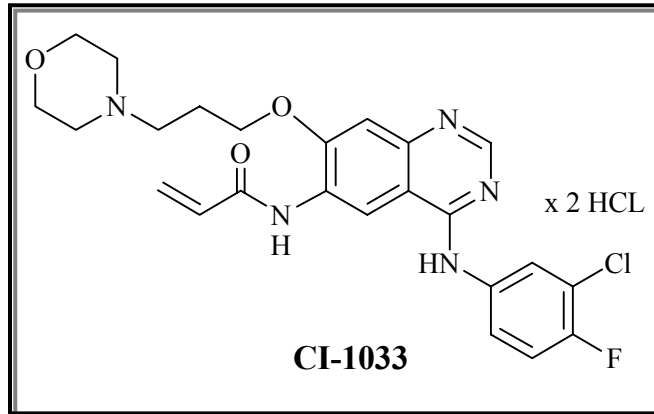


Bild 13: Der irreversible EGFR-TK-Inhibitor CI-1033

1.6.3 Inhibition der Synthese des EGF-Rezeptors und seiner Liganden

1.6.3.1 Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide (A-ON, Bild 8: 6.) sind kurzkettige synthetische Nukleinsäuren (7-30 Nukleotide), die über komplementäre Basenpaarung an die entsprechende Sequenz der im Zellkern synthetisierten mRNA des Zielproteins binden.

Dadurch wird die Synthese des entsprechenden Proteins durch Störungen des RNS-Transports, des Spleißens, der Translation sowie durch Induktion des RNS-Abbaus durch zelluläre Enzyme gehemmt [94,95].

Mit dieser Technik ist es möglich, die Synthese des EGFR's und seiner Liganden spezifisch zu hemmen.

Obwohl es sich hierbei um einen vielversprechenden Therapieansatz handelt, wurden noch keine A-ON in klinischen Studien getestet, denn ein Problem, das es noch zu lösen gilt, ist es, die A-ON an ihren Wirkort zu bringen [94].

1.6.3.2 Ribozyme

Ribozyme (Bild 8: 7.) sind katalytische RNS-Moleküle, die als Enzyme wirken und andere RNS-Moleküle abbauen. Damit verhindern auch sie das korrekte Ablesen der Erbinformation, da die entstehenden RNS-Fragmente nicht mehr in funktionierende Polypeptide übersetzt werden können.

So werden z.B. EGFRvIII-mRNS-spezifische Ribozyme entwickelt, um die Synthese dieses mutierten EGFR's zu hemmen [96].

Ribozyme stellen zwar einen vielversprechenden Therapieansatz dar, aber auch hier gibt es Probleme, die Substanzen in ausreichendem Maße an den Wirkort zu bringen [96].

1.6.4 Inhibition von EGFR-Downstream-Effektoren

Es gibt zahlreiche Ansätze, die Kinasen, G-Proteine und andere Proteine, die in den durch den EGFR aktivierten Signalkaskaden eine Rolle spielen, zu hemmen.

Auf die wichtigsten soll an dieser Stelle kurz eingegangen werden.

Inhibitoren der Farnesyltransferase: Das G-Protein Ras übernimmt eine Schlüsselrolle im EGFR-vermittelten Signaling und ist außerdem häufig selbst mutiert [36].

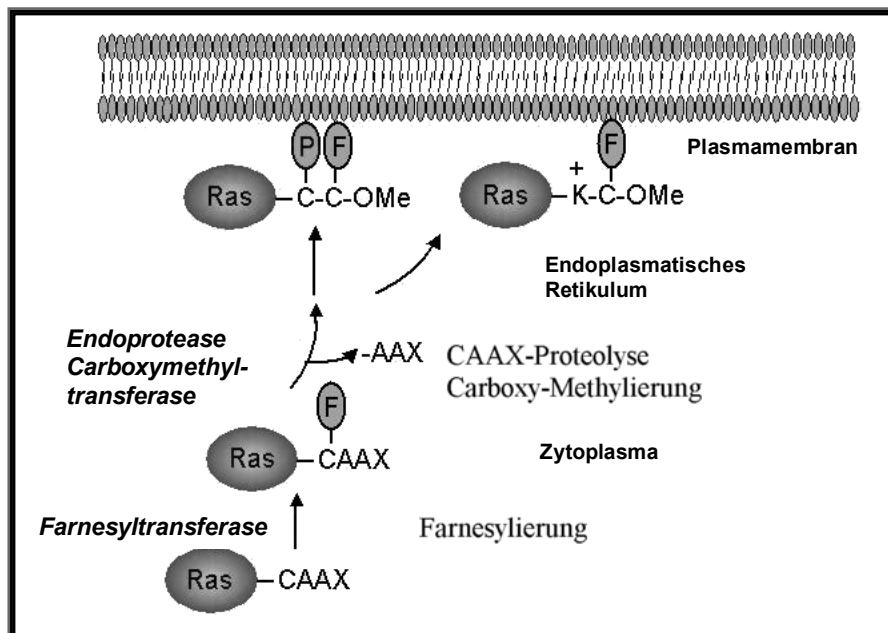
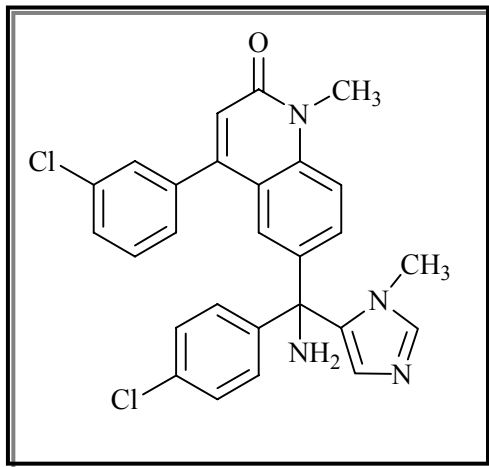


Bild 14: Schematischer Ablauf der Membranverankerung des Ras-Proteins [36]

Die Blockierung der Ras-Aktivierung gelingt z.B. mit Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs). Für seine Aktivierung muss das Ras-Protein nämlich in der Zellmembran verankert vorliegen. Dies erfolgt u.a. über Farnesylreste. Die Farnesyltransferase ist ein Enzym, das eine Schlüsselrolle bei der Membranverankerung des Ras-Proteins spielt (Bild 14). FTIs verhindern die Verankerung des Ras-Proteins in der Zellmembran und damit dessen Aktivierung.

Der FTI R115777 (Tipifarnib, Zarnestra[®], Johnson & Johnson, Bild 15) durchläuft momentan die Phasen I und II der klinischen Prüfung. R115777 induziert die Apoptose von Tumorzellen



und hemmt die Angiogenese. Besonders vielversprechend scheint dabei die kombinierte Anwendung von R115777 mit konventionellen Chemotherapeutika zu sein. Vor allem Melanome, Pankreaskarzinome und die AML (Akute Myeloische Leukämie) sprechen auf diesen FTI z.T. mit kompletten Remissionen an [97,98,99,100].

Bild 15: Der Farnesyltransferase-Inhibitor R115777

Inhibitoren der PLC- γ . Alkylphenole und Isocoumarin aus *Ginkgo biloba* (Gingkoaceae) [101], prenylierte Flavonoide aus *Sophora flavescens* (Leguminosae) [102] und prenylierte Isoflavonoide aus *Erythrina senegalensis* (Leguminosae) [103] sind einige Beispiele für Inhibitoren der Kinase PLC- γ , die momentan in präklinischen Studien näher untersucht werden.

mTOR-Inhibitoren: Auch mTOR-Inhibitoren, wie Sirolimus (Rapamycin, aus *Streptomyces hygroscopicus*) und Everolimus (partialsynthetisches Derivat von Sirolimus) werden für eine Therapie gegen Krebs und Psoriasis getestet bzw. bereits eingesetzt [104].