

Charakterisierung von *in vivo* Modellen des humanen
nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zur Therapieoptimierung

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Jana Rolff

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/innen 1. Dr. I. Fichtner
 2. Prof. W. Uckert
 3. Prof. S. Fröhling

Tag der mündlichen Prüfung 23.04.2012

Für Renate

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	3
Summary	5
1. Einleitung	7
1.1 Epidemiologie und Histologie des Bronchialkarzinoms	7
1.2 Therapie des Bronchialkarzinoms	8
1.2.1 Klassische Therapien	9
1.2.2 Zielgerichtete Therapien	10
1.3 Molekularbiologie des Bronchialkarzinoms	12
1.4 Diagnostische Marker des Bronchialkarzinoms	14
1.5 Prognostische und prädiktive Marker des Bronchialkarzinoms	15
1.5.1 Mutationen	16
1.5.2 Einzelnukleotidpolymorphismen	16
1.5.3 Gen- und Proteinexpressionsprofile	18
1.6 Zelluläre Mechanismen, die das individuelle Ansprechen auf die klassische Chemotherapie beeinflussen	19
1.6.1 Resistenz durch einen gesteigerten Efflux	20
1.6.2 Resistenz durch Entgiftung	23
1.7 Zelluläre Mechanismen, die das individuelle Ansprechen auf zielgerichtete Therapien beeinflussen	24
1.7.1 EGF-Rezeptor-Inhibitoren	24
1.7.2 Interaktionen zwischen der Angiogenese und dem EGFR-Netzwerk	29
1.8 Xenografts als präklinische Modelle	31
1.9 Zielsetzung	33
2. Material & Methoden	35
2.1 <i>In vivo</i> Versuche	35
2.1.1 Etablierung der Xenografts und Probengewinnung	35
2.1.2 Pharmakologische Versuche	37
2.2 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1 DNA-Extraktion	38
2.2.2 Mutationsanalysen	38
2.2.3 RNA-Extraktion	39
2.2.4 cDNA Synthese	39
2.2.5 RealTime PCR	39
2.2.6 Microarrayanalysen	40
2.3 Biochemische Methoden	41
2.3.1 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	41
2.3.2 Immunhistochemie/Immunfluoreszenz	42
2.3.3 ELISA	43
2.3.4 Gelelektrophorese und Immunoblot	44

2.3.5	Durchflusszytometrie	45
2.4	Statistische Analysen	45
2.4.1	Auswertung der pharmakologischen Experimente	46
2.4.2	Korrelationsanalysen	46
2.4.3	Analyse der Kontingenztabellen	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Allgemeine Charakteristika der Modelle	47
3.1.1	Histologischer Vergleich der Patiententumore und ihrer abgeleiteten Xenografts	47
3.1.2	Wachstumsverhalten der Modelle	48
3.1.3	Analyse der Phänotypen der Patiententumore und der Xenografts	51
3.1.4	Vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen Primär- und Xenografttumor	57
3.1.5	Analyse von lungenkrebsassoziierten Genen	62
3.1.6	Sensitivitätsprofile der Xenograftmodelle	63
3.2	Marker für die klassische Chemotherapie	66
3.2.1	Intrinsische Expression resistenzassoziierter Marker	66
3.2.2	Resistenzassoziierte Marker nach einer Zytostatikatherapie	70
3.2.3	Analyse resistenzassoziierter Einzelnukleotidpolymorphismen	72
3.3	Marker für die anti-EGFR-Therapie	73
3.3.1	Die ERBB-Rezeptoren	73
3.3.2	Liganden des EGFR	77
3.3.3	Ausgewählte EGFR-,Downstream'-Signalwege	81
3.3.4	EGFR-,Downstream'-Signalwege nach einer anti-EGFR-Therapie	82
3.3.5	Genexpressionsstudien zur Therapieoptimierung in Erlotinib Non-Respondern	84
3.4	Anti-angiogene Therapie	85
3.4.1	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A	85
3.4.2	Kombination von Erlotinib und Bevacizumab zur Therapieoptimierung	86
4.	Diskussion	93
4.1	Identitäts- und Repräsentationsanalyse	93
4.2	Patientenabgeleitete Xenografts als Modelle zur Charakterisierung und Validierung von Markern der klassischen Chemotherapie	98
4.3	Patientenabgeleitete Xenografts als Modelle zur Charakterisierung und Validierung von Markern der anti-EGFR-Therapie	103
4.4	Patientenabgeleitete Xenografts als Modelle zur Therapieoptimierung	111
4.5	Perspektiven	115
5.	Abkürzungen	117
6.	Literatur	119
7.	Anhang	133
	Danksagung	147
	Erklärung	149

ZUSAMMENFASSUNG

Das Bronchialkarzinom ist die häufigste Todesursache bei den Krebserkrankungen. Gleichzeitig ist es nach wie vor eine Krebsart mit einer schlechten Prognose. Die systemischen Behandlungsoptionen des Lungenkarzinoms bestehen aus einer Chemotherapie mit platinbasierten Medikamenten in Kombination mit Paclitaxel, Gemcitabin und Etoposid. Trotz dieser Vielzahl an Möglichkeiten ist die Therapie des Lungenkarzinoms unbefriedigend. In den letzten Jahren wurden zielgerichtete Therapien gegen einzelne Proteine wie den EGFR entwickelt. Erste klinische Studien machten deutlich, dass nur Subpopulationen von der Therapie mit den anti-EGFR-Medikamenten Erlotinib und Cetuximab profitieren. Trotz einiger prädiktiver Marker wie Mutationen im Exon 18-21 im *EGFR*, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, warum auch Patienten ohne Mutationen auf die Behandlung ansprechen. Eine bessere (Vor-)Selektion der Patienten entsprechend ihrer Sensitivität ist wünschenswert, um unnötige Behandlungen zu vermeiden. Ferner ist eine weitere Aufklärung von Mechanismen, die die Medikamentensensitivität beeinflussen, nötig. Dies bedarf klinisch relevanter präklinischer Modelle, in denen diese Analysen durchgeführt werden können. In einer klinischen Kooperation wurden 25 Xenograftmodelle des Lungenkarzinoms etabliert, die im Rahmen dieser Arbeit vergleichend charakterisiert wurden.

Ein Schwerpunkt bestand in der Überprüfung der Identität der patientenabgeleiteten Xenografts mit ihren korrespondierenden Patiententumoren. Die Analyse der Histologie, der Proliferationsmarker sowie epithelialer und mesenchymaler Marker fand übereinstimmende Ergebnisse in den Patiententumoren und ihren abgeleiteten Xenografts. Auch auf Genebene deckten sich die Expressionsprofile der Xenograft- und ihrer Patiententumore.

Weitere Analysen sollten die Bedeutung der Xenografts als Modell zur Charakterisierung von prädiktiven und prognostischen Markern aufklären. Dazu wurde ein mRNA-, Protein- und SNP-Profil ausgewählter resistenzassoziierter Marker der Chemotherapie erstellt. Die in den Xenografts erhobenen mRNA- und Proteinexpressionsprofile der Marker wiesen Gemeinsamkeiten mit klinischen Probenkollektiven auf. MDR1 und MRP1 scheinen keine Resistenz gegenüber den Zytostatika in den Modellen zu vermitteln, wohingegen ABCG2 und LRP in einzelnen Modellen das Ansprechen modifizieren könnte. Die SNP in Genen der DNA-Reparatur, -Replikation und Entgiftung zeigten nur einen sehr geringen Einfluss auf die Sensitivität.

Des Weiteren befasste sich diese Arbeit mit der Untersuchung von Markern der anti-EGFR-Therapien. mRNA- und Proteinexpressionsprofile des EGFR und weiterer ERBB-Rezeptoren sowie der Liganden des EGFR wurden in den Xenografts erstellt und stimmten mit publizierten klinischen Daten überein. Innerhalb der ERBB-Rezeptoren wurde eine Verbindung zwischen *ERBB2* und *ERBB3* und im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Erlotinib gezeigt. Die

heterogenen Profile der Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG mit 20- bis 100-fachen Expressionsunterschieden waren in der Lage, das Ansprechen auf die EGFR-Inhibitoren in einzelnen Modellen zu erklären. Ebenso konnte das individuelle Proteinexpressionsprofil der EGFR-,Downstream'-Signalwege vereinzelt eine Resistenz in den Xenografts vermitteln.

Auf Basis vergleichender Genexpressionsstudien in Erlotinib Respondern und Non-Respondern zur Therapieoptimierung wurde der vaskuläre Wachstumsfaktor VEGFA als Ziel für eine Kombinationsbehandlung mit dem Angiogeneseinhibitor Bevacizumab identifiziert. Die Kombinationsbehandlung von Bevacizumab mit Erlotinib führte zu einem reduzierten Tumorwachstum durch einen additiven Effekt der Medikamente in ausgewählten Modellen. Die Regulationsmechanismen hinter dem Ansprechen sind auf die Interaktion des EGFR- und VEGFA-Signalweges zurückzuführen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen machten deutlich, dass die individuellen Tumoreigenschaften in den patientenabgeleiteten Xenografts auf Gen- und Proteinebene erhalten bleiben und die Xenografts als Modelle zur Markeranalyse sowie zur Therapieoptimierung eingesetzt werden können. Dieses Xenograftset stellt eine Verbindung zwischen der Zellkultur und Klinik her und mit seiner Hilfe können zukünftig klinik-relevante Fragestellungen beantwortet werden.

SUMMARY

Lung cancer is still one of the most frequent cancers worldwide. At the same time patients with lung cancer showed an unfavourable prognosis. The treatment option is classical chemotherapy that is based upon the combination of platin-based drugs with paclitaxel, gemcitabine and etoposide. Despite these options no further improvement seems to be possible. For some years targeted drugs against single proteins like the EGFR were developed. In the clinical trials it became obvious that only subpopulations of patients benefit from the treatment with the anti-EGFR-drugs erlotinib and cetuximab. Mutations in the exon 18-21 in the *EGFR* are used as markers but it is still unknown why patients without these markers respond as well. A better selection of patients to avoid treatment would be helpful. Furthermore, the understanding of mechanisms of sensitivity needs to be extended. Therefore, pre-clinical models that are suitable for analysis and that represent clinical populations of patients are required. In this work 25 patient derived xenografts from lung cancer were intensely studied.

First, the xenografts were compared with their corresponding patient tumor. The analysis of the histology and the expression of proliferation as well as epithelial and mesenchymal markers showed concordance of the patient tumor and the derived xenograft. The gene expression profiles were also maintained in the xenografts.

Further analysis should elucidate the relevance of the xenografts as models for the characterisation and validation of predictive and prognostic markers. SNP, mRNA and protein expression profiles of resistance markers for chemotherapy were generated and showed similarities with clinical data. MDR1 and MRP1 do not mediate resistance in the xenografts whereas ABCG2 and LRP could modify the response in single xenografts. The SNPs in genes of detoxification, DNA repair and replication only have a minor impact on the sensitivity.

As marker for the anti-EGFR targeted therapies the EGFR and other ERBB receptors as well as ligands of the EGFR were analysed. The mRNA and protein expression profiles resemble clinical data sets. A correlation of *ERBB2* and *ERBB3* and in relation to the response to erlotinib was found. To some extent the heterogeneous expression profile of the EGFR downstream signaling pathways and the profile of the ligands could explain the response of individual xenografts.

An optimisation of the therapy should be achieved with the help of gene expression studies. The vascular endothelial growth factor VEGFA was identified for a combination treatment with the anti-angiogenic drug bevacizumab in erlotinib resistant tumors. The combination of erlotinib and bevacizumab reduced the tumor growth in selected models. The mechanism of response was not due to hypoxic conditions in the tumor tissue.

In summary, the analysis could show that the individual characteristics of the patient tumor were maintained in the xenograft at gene and protein level. The patient derived xenografts are a reliable tool for studies designed to improve treatment strategies.

1. EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Histologie des Bronchialkarzinoms

Nach Herz-Kreislaufkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Jeder vierte Todesfall geht auf eine Krebserkrankung zurück. Lungenkrebs führt dabei am häufigsten zum Tode. Bei Männern und Frauen nimmt dieser mit schätzungsweise 35.000 bzw. 15.000 Neuerkrankungen im Jahr Platz 3 ein [1]. Für die betroffenen Patienten bedeutet diese Erkrankung eine große Einschränkung ihrer Lebensqualität und sie stellt eine enorme wirtschaftliche Belastung für die Gesellschaft dar.

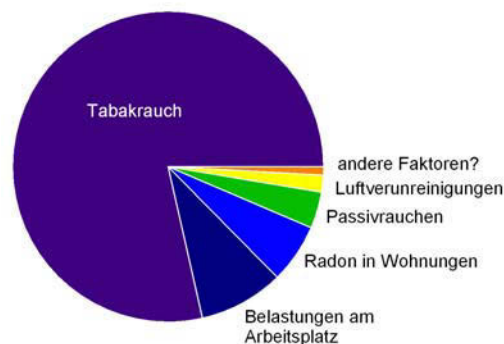


Abb. 1: Ursachen und Risikofaktoren für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms. Modifiziert nach [3].

Die Hauptursache für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms ist das inhalative Tabakrauchen. Menschen, die ein Leben lang Raucher waren, haben ein 20-30-fach höheres Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken [2]. Zu den weiteren bekannten Krebsauslösern gehören u. a. Asbest, Quarzstäube, Arsen, Chromate, Nickel und aromatische Kohlenwasserstoffe.

Das Bronchialkarzinom wird basierend auf histologischen Kriterien in kleinzellige (SCLC) und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) unterteilt, wobei ein Verhältnis von 1:4 vorherrscht. Das NSCLC und das SCLC unterscheiden sich hinsichtlich der Fünf-Jahresüberlebensrate, die für das SCLC ca. 7% und für das NSCLC ca. 20% beträgt. Die Lebenserwartung ist stark vom Stadium des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose abhängig. Die schlechte Prognose von Patienten mit fortgeschrittenem Stadium UICC IV wird durch die hohe Anzahl (90%) der tumorbedingten Todesfälle nach zwei Jahren deutlich. Aber auch $\frac{3}{4}$ aller Patienten mit Stadium UICC III sind nach diesem Zeitraum verstorben. Werden Patienten mit einem frühen Stadium (UICC I und II) diagnostiziert, beträgt die Fünf-Jahresüberlebensrate für das NSCLC 65% bzw. 35% (SCLC: 34%

und 19%), jedoch werden nur 20% der NSCLC (5% des SCLC) in diesen Stadien entdeckt. Diese Zahlen machen deutlich, dass es weiterer Forschungen beim Lungenkarzinom bedarf [3].

Die histologische Einteilung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms erfolgt in sieben verschiedene histologische Klassen, von denen nur vier näher beschrieben werden, da diese im Rahmen dieser Arbeit relevant sind. Das Plattenepithelkarzinom (SCC) ist ein epithelialer Tumor mit Verhornung, der vom Bronchialepithel abstammt. Über 90% der Plattenepithelkarzinome werden bei Rauchern diagnostiziert. Das Adenokarzinom (ADC) ist ein Tumor mit glandulärer Differenzierung und unterschiedlichen Wachstumsmustern. In vielen Ländern ist das Adenokarzinom mittlerweile das am häufigsten diagnostizierteste Lungenkarzinom. Unter sarkomatoiden Karzinomen werden gering differenzierte nicht-kleinzellige Karzinome zusammengefasst, die sarkomähnliche oder sarkomatöse Strukturen besitzen. Zu dieser Klasse wird auch das pleomorphe Karzinom (PLC) gezählt. Die sarkomatoiden Tumore sind gewöhnlich aggressiver, zeigen eine ausgedehnte Metastasierung und zeichnen sich durch eine schlechtere Prognose als andere NSCLC Typen aus. Großzellige Karzinome (LCC) weisen weder differenzierte noch kleinzellige Eigenschaften auf. Die Zuordnung erfolgt per Ausschluss. Diese Karzinome sind histogenetisch heterogen und enthalten vermutlich zu einem hohen Anteil gering differenzierte SCC und ADC. Epitheliale Tumore des kleinzelligen Typs sind durch Zellen mit einem geringen Zytoplasmaanteil und schlecht definierten Zellgrenzen gekennzeichnet [3].

1.2 Therapie des Bronchialkarzinoms

Die Histologie und das Stadium des Bronchialkarzinoms entscheiden vorrangig über die Therapie und die Prognose des Patienten. Das Stadium ist definiert durch die lokale Tumorausdehnung, die Angabe zur Lymphknotenmetastasierung und durch das Auffinden von Fernmetastasen. Zusätzlich wird in der Therapieentscheidung die physische Verfassung des Patienten berücksichtigt. Für die Behandlung werden lokal wirksame Methoden, wie Operation und Strahlentherapie und auch systemisch wirksame Verfahren, wie Chemotherapie oder neuere zielgerichtete Therapien angewendet.

Das kleinzellige Lungenkarzinom wird in frühen Stadien (lokal begrenztes Karzinom) operiert und anschließend mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt. Fortgeschrittene lokal begrenzte Karzinome und späte Stadien erhalten eine primäre Chemotherapie, eine lokale Strahlentherapie und eine prophylaktische Schädelbestrahlung.

Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom im frühen Stadium wird mit einer Operation entfernt, an die sich (hauptsächlich bei schlechten Prognosefaktoren) eine adjuvante Behandlung anschließt.

Bei Patienten mit Stadium III besteht das Standardvorgehen aus einer Chemotherapie (teilweise mit vorausgegangener Operation) und einer postoperativen Bestrahlung. Tumore mit Stadium IV werden zumeist mit einer Chemotherapie behandelt [4].

1.2.1 Klassische Therapien

Eine wichtige Behandlungsoption bei der Bekämpfung von Lungenkarzinomen stellt die klassische Chemotherapie dar. Zytostatika hindern die Tumorzelle an der Zellteilung und führen sie zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose. Der Wirkungsmechanismus dieser Medikamente beruht u. a. auf der Hemmung der DNA-Replikation oder der Zytokinese. Da dies sehr grundlegende Prozesse sind, wirken fast alle Zytostatika auf Gewebe mit einer schnellen Regeneration. Die daraus resultierenden Nebenwirkungen einer Chemotherapie sind Haarausfall, Schädigungen der Darmmucosa und der Hämatopoese. Innerhalb der vergangenen 20 Jahre wurden neue Zytostatika entwickelt, die die Chemotherapie des fortgeschrittenen Lungenkarzinoms ergänzen. Diese Substanzen zeigen in der Monotherapie Remissionsraten um bis zu 20% und rufen weniger Nebenwirkungen bei den Patienten hervor. Standardsubstanzen in der Behandlung des NSCLC sind Gemcitabin, Vinorelbin und die Taxane Docetaxel und Paclitaxel. Sie werden häufig in einer Kombination mit platinhaltigen Medikamenten wie Cis- und Carboplatin verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vier Zytostatika Carboplatin, Gemcitabin, Paclitaxel und Etoposid (angewendet beim SCLC) als Repräsentanten für die klassische Therapie ausgewählt und in den Experimenten eingesetzt.

Die Antitumorwirkung dieser Zytostatika basiert auf folgenden Wirkungsmechanismen:

Die zytotoxische Wirkung von **platinbasierten Verbindungen** entsteht durch die Bindung an die DNA und eine Hemmung der Reparaturenzyme. Ein Vertreter dieser Gruppe ist Carboplatin (CPT), das gleichzeitig eine alkylierende Substanz ist. Es induziert eine Quervernetzung der Guanosin-Moleküle in den DNA-Einzel- und Doppelsträngen [5;6]. Die daraus resultierende Störung der DNA-Matrizenfunktion führt zu einer Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese. Carboplatin wird als ein Baustein in der Kombinationstherapie des NSCLC verabreicht.

Taxane binden an polymerisierte Mikrotubuli. Abhängig von der Konzentration wird die Mikrotubulinpolymerisation verstärkt bzw. die Mikrotubulidynamik gestört. Dies führt zu einem mitotischen Arrest, der in Folge die Apoptose auslöst [7]. Von den Taxanen erhielt Paclitaxel (PTX) als erstes Medikament die Zulassung für die klinische Anwendung [8]. Docetaxel, ein halbsynthetisches Taxan, wird ebenfalls in der Therapie des nicht-kleinzelligen Lungekarzinoms verwendet.

Antimetabolite wie Gemcitabin (GEM) hemmen die DNA-Synthese, indem sie anstelle des physiologischen Substrats Desoxycytidintriphosphat in die DNA eingebaut werden. Die zytotoxische Wirkung wird durch einen Kettenabbruch und die anschließende vollständige Inhibition der DNA-Synthese und der Blockade der Ribonukleotidreduktase vermittelt. Das Pyrimidinanalogon GEM wird intrazellulär durch Nukleosidkinasen zu wirksamem Di- und Triphosphatnukleosid metabolisiert, welches in die DNA eingebaut wird [9].

Topoisomerasehemmer hindern Reparaturenzyme an der Korrektur von DNA-Brüchen. Sie hemmen die Topoisomerase II, was zu einer Inhibition und Veränderung der DNA-Synthese führt. Die Zytokinese wird inhibiert, da Zellen in der G₂-Phase blockiert werden und in der G₂- und S-Phase die Apoptose eingeleitet wird. Etoposid (ETO) ist ein halbsynthetisches Podophyllotoxin-derivat mit zytotoxischer und antineoplastischer Wirkung. Für Etoposid wurden zwei unterschiedliche dosisabhängige Wirkungen dokumentiert. Hohe Konzentrationen bewirken eine Lysis mitotischer Zellen während niedrigere Konzentrationen die Zellen vor der Prophase hemmen. Etoposid soll auch in der Lage sein, indirekt DNA-Einzelstrangbrüche zu induzieren [10;11].

Trotz der Fortschritte der letzten Jahrzehnte führt die Behandlung des NSCLC mit Hilfe der klassischen Chemotherapie zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Es konnte bis heute nicht geklärt werden, warum das SCLC besser auf eine Therapie anspricht als das NSCLC. Intrinsische oder erworbene Resistenzen limitieren zusätzlich den Erfolg einer Chemotherapie. Nur durch neue Therapiekonzepte kann eine Verbesserung bei der Behandlung des Lungenkarzinoms erreicht werden.

1.2.2 Zielgerichtete Therapien

Neuere Konzepte beruhen auf zielgerichteten Therapien. Diese Substanzen greifen vermehrt in Prozesse ein, die vorrangig an der Krebsentstehung beteiligt sind. Dadurch versprechen sie im Vergleich zur Chemotherapie eine bessere Wirkung auf Malignome und geringere Nebenwirkungen auf nicht-maligne Körperzellen. Die neuen Therapeutika, sogenannte 'Targeted Drugs', greifen gerichtet in gestörte Regulationsvorgänge maligner Zellen ein, indem sie ein oder mehrere Ziele (-Moleküle) inhibieren.

Im Lungenkarzinom wurde u. a. der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (engl., 'epidermal growth factor receptor' = EGFR) als ein Ziel für neue Medikamente identifiziert. Der EGFR ist häufig in Krebszellen dereguliert, was auch auf das Lungenkarzinom zutrifft [12]. Verantwortlich dafür können Genmutationen, Genamplifikationen und/ oder eine gesteigerte Proteinexpression sein, die die Tumorentwicklung und das unkontrollierte Wachstum der Tumorzellen stimulieren. Es wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt, den EGFR zu hemmen, von denen kleine Moleküle und

monoklonale Antikörper bereits in die klinische Praxis integriert wurden. Erste Vertreter der EGFR-Inhibitoren waren die Wirkstoffe Gefitinib, Erlotinib und Cetuximab.

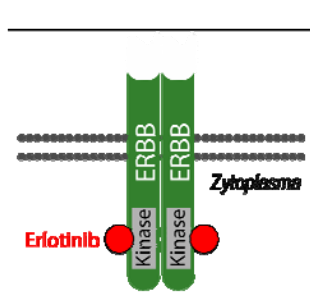


Abb. 2: Target von Erlotinib

Der **Tyrosinkinaseinhibitor** Erlotinib (ERL) wird zu den niedermolekularen Molekülen gezählt. Erlotinib hemmt reversibel die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase des EGFR, indem es kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle im katalytischen Zentrum bindet [13]. Die nachfolgenden Signalkaskaden werden blockiert und die fehlenden Wachstums- und Überlebenssignale führen zur einer

Wachstumsinhibition oder zur Apoptose der Zelle. Erlotinib ist seit 2005 als Zweitlinientherapie bei fortgeschrittenem oder metastasiertem Lungenkarzinom und seit April 2010 zur Erhaltungstherapie bei unverändertem Krankheitszustand nach der ersten Chemotherapie zugelassen [14].

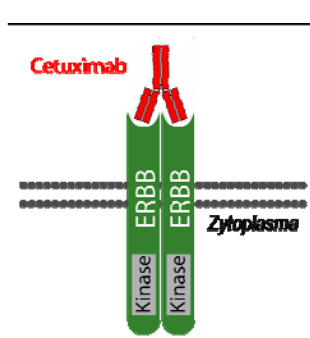


Abb. 3: Target von Cetuximab

Cetuximab (CET) ist ein chimärer monoklonaler **Immunglobulin G1-Antikörper**, der kompetitiv an die Ligandenbindungsstelle des EGFR bindet. Diese Blockierung verhindert die Aktivierung des EGFR durch seine natürlichen Liganden. Als Folge wird die Signalübertragung unterbrochen und die Apoptose eingeleitet [15]. Bisher darf Cetuximab nicht für die Behandlung des Lungenkarzinoms verwendet werden. Das Medikament erhielt aber eine Zulassung für die Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms und für Kopf-Hals-Tumore [14].

Das Überleben einer Tumorzelle ist neben bestimmten Signalwegen auch von der Vaskularisation abhängig. Ab einer Tumorgöße von mehr als 2 mm erfordert das Wachstum eines Tumors die Bildung tumoreigener Blutgefäße, um die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherzustellen, aber auch um Abfallprodukte abzutransportieren [16]. Eine wichtige Rolle in der Stimulation der Neo-Angiogenese nimmt der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (engl., 'Vascular endothelial growth factor A' = VEGFA) ein. VEGFA bindet auf der Oberfläche der vaskulären Endothelzellen an die VEGF-Rezeptoren, die wiederum die Signalkaskade zur Angiogenese aktivieren. Eine Inhibition der Neo-Angiogenese stellt somit ein weiteres Ziel der zielgerichteten Medikamente dar.

Bevacizumab (BEV) ist ein humanisierter monoklonaler **Immunglobulin G1-Antikörper**, der an alle VEGFA-Isoformen bindet. Es kommt zur Bildung eines Komplexes, der nicht mehr in der Lage ist, an die VEGF-Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 auf der Oberfläche von Endothelzellen zu binden [17;18]. Die Neutralisierung von VEGFA normalisiert das vorhandene Tumorgefäßsystem und

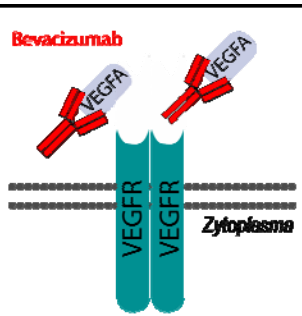


Abb. 4: Target von Bevacizumab

hemmt die Bildung neuer Blutgefäße, wodurch das Tumorwachstum inhibiert wird [19]. Bevacizumab besitzt eine Zulassung zur Erstlinientherapie von inoperablem, fortgeschrittenem, metastasiertem oder rezidiviertem NSCLC. Die Patienten sollen keine Plattenepithel-Histologie aufweisen und zusätzlich eine Kombination mit einer platinbasierten Chemotherapie erhalten [14].

Die in die neuen Therapien gesetzten Erwartungen wurden jedoch nicht in vollem Umfang für alle Patienten erfüllt. Während der klinischen Studien mit zielgerichteten Medikamenten wurde deutlich, dass teilweise nur Subpopulationen der Patienten von einer Therapie profitierten. Wie auch bei den klassischen Substanzen war ein Teil der Patienten bereits intrinsisch resistent oder entwickelte im Laufe der Behandlung eine Resistenz. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die Patienten vor der Behandlung besser zu selektieren und damit den Therapieerfolg zu steigern.

1.3 Molekularbiologie des Bronchialkarzinoms

Krebs wird als eine genetische Erkrankung mit einer Akkumulation somatischer Mutationen und als das Resultat eines mehrstufigen Prozesses angesehen. Im Laufe der Entstehung eines Tumors finden zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen statt. Es werden Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sowie epigenetisches ‚Gene-Silencing‘ oder -Aktivierung beobachtet. Während der Lebensspanne eines Menschen erfährt das Genom Billionen von Mutationen. Obwohl effiziente Reparatursysteme zur Verfügung stehen, werden nicht alle DNA-Schäden behoben. Ebenso werden nicht alle Zellen mit einem irreparablen DNA-Schaden in den programmierten Zelltod geführt. Zellen, die Mutationen enthalten, können überleben und die geschädigten Gene weitergeben. Die Auswirkung einer Mutation auf die Funktion eines Gens ist abhängig von der Lokalisation in kodierenden oder nicht-kodierenden Regionen der DNA. Ist die Mutation in einer kodierenden Region angesiedelt, können Veränderungen in der Funktion des Proteins auftreten. Dies kann einen Gewinn der Aktivität oder einen Funktionsverlust zu Folge haben. Für die Tumorentwicklung entscheidend sind die Kombinationen von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen in einer Zelle. In Krebszellen sind verschiedene Klassen von Proteinen mutiert, die meist in die Proliferation involviert sind. Als Beispiele können Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren oder DNA-Reparaturenzyme genannt werden. Mit Mutationen in diesen Proteinen können Zellen unbegrenzt proliferieren und sich der Wachstumskontrolle entziehen.

Zahlreiche dieser Veränderungen treten auch bei Lungenkarzinomen auf, wobei es Unterschiede zwischen SCLC und NSCLC gibt. Bei NSCLC werden weiterhin Unterschiede zwischen SCC und ADC gesehen [3].

Gemeinsam haben viele Bronchialkarzinome eine Genmutation im Tumorprotein (TP) 53. Als Transkriptionsfaktor ist TP53 in die Regulation des Zellzyklus, der Seneszenz, die Induktion der Apoptose und die DNA-Reparatur involviert. *TP53*-Mutationen werden für bis zu 50% der NSCLC und für mehr als 70% der SCLC dokumentiert [20].

Die zweithäufigste Veränderung betrifft eine Blockierung des Signalweges, der das Retinoblastom-Suppressorgen kontrolliert, das an der G₁- zur S-Phase-Transition beteiligt ist.

Mutationen im *RAS* (engl., ‚Rat sarcoma viral oncogene‘ = RAS) -Gen sind ebenfalls vielfach in Lungenkarzinomen vorzufinden [21]. *RAS*-Gene kodieren für membranständige, 21 kDa Guanosintriphosphat (GTP) bindende Proteine, die das Wachstum, die Differenzierung und die Apoptose regulieren. Dafür interagieren sie mit unterschiedlichen Mitgliedern der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-, den Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT)- sowie mit den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- Signalkaskaden. Mit einer Mutation im Codon 12, 13 oder 61 verliert das *KRAS*-Protein seine GTPase-Aktivität, wodurch es zu einer Akkumulation von aktivem Ras und damit zu einem anhaltenden wachstumsstimulierenden Signal in der Zelle kommt [22]. Die Zelle wird unabhängig von anderen Wachstumssignalen, die bisher durch alternative Signalwege übermittelt wurden. *KRAS*-Mutationen sind für ca. 90% der *RAS*-Mutationen im ADC verantwortlich. Ferner befinden sich ca. 97% der *KRAS*-Mutationen im Codon 12 und 13. Einige genetische Veränderungen scheinen an histologische Subtypen gekoppelt zu sein. Mutationen im *KRAS* Codon 12 wurden bei ca. 30-40% der Adenokarzinome beobachtet, sind jedoch seltener in anderen NSCLC Subtypen und in SCLC [23;24].

In bis zu 5% der SCC und SCLC treten Mutationen im *APC*-Gen, einem Mitglied des Wnt-Signalweges, auf [25]. Amplifikationen von *MYC* wurden in einer kleinen Anzahl von fortgeschrittenem NSCLC (<10%) und häufiger in SCLC (30%) gefunden. Im Jahr 2007 wurde das EML4-ALK-Fusionsonkogen beim Lungenkarzinom beschrieben. Diese Fusion führt zu einer konstitutiv aktiven chimären Tyrosinkinase und resultiert in einer erhöhten Teilungsrate [26].

Die dargestellten und weitere Mutationen ermöglichen der Zelle das unkontrollierte Wachstum durch die permanente Stimulation der Proliferation und der Vermeidung der Apoptose. Die Entwicklung einer normalen Zelle zu einer malignen Zelle stellt keinen abgeschlossenen Prozess dar. Während der fortschreitenden Tumorprogression finden weiterhin dynamische Veränderungen im Genom der Tumorzelle statt. Ein Kennzeichen des Genoms von Tumorzellen ist die hohe genomische Instabilität, die der Zelle den Erwerb weiterer Mutationen z.B. unter einer Therapie

ermöglicht. Zusätzliche Mutationen können die Aggressivität und das Metastasierungspotenzial der Tumorzelle steigern.

1.4 Diagnostische Marker des Bronchialkarzinoms

Mit Hilfe von diagnostischen Markern (Tumormarker) kann auf das Vorliegen eines Tumors geschlossen werden. Tumormarker sind Bestandteile der Tumorzelle oder Stoffwechselprodukte des malignen Wachstums. Tumorzellen produzieren oder induzieren in ihrer Umgebung Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate, die im Tumorgewebe detektiert werden können. Nach einer Freisetzung in den Blutkreislauf sind die Marker auch im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nachzuweisen. Eine Analyse von auf der Zelloberfläche präsenten Antigenen ist ebenfalls möglich. Das wichtigste Einsatzgebiet der Tumormarker liegt in der Therapie- und Verlaufskontrolle von Tumoren und in der Früherkennung von Metastasen oder Rezidiven.

Beim Bronchialkarzinom existieren mehrere Marker (Keratine, Vimentin, Desmin, Neurofilamente, epitheliale Membranantigene, das karzinoembryonale Antigen und die einzigen lungenspezifischen Tumormarker ‚Surfactant-Apoprotein‘ und Clara-Zell-Antigen), die für die Identifizierung eines malignen Wachstums eingesetzt werden [3;27]. Neben diesen lungenspezifischen Tumormarkern, die teilweise dem Epithel zuzuordnen sind, existieren weitere, die allgemeingültig für alle Tumorzellen angewandt werden können. Da (Lungen)Karzinome einen epithelialen Ursprung besitzen, eignen sich epitheliale Marker besonders zum Nachweis von Tumorzellen.

Ein tumorassoziierter Marker ist das epitheliale Zelladhäsionsprotein (engl., ‚Epithelial cell adhesion molecule‘ = EPCAM). Es war das erste mit einem monoklonalen Antikörper identifizierte tumorassozierte Antigen [28]. Es wird von einer großen Anzahl Adeno- und Plattenepithelkarzinomen (die auch Lungenkrebs umfassen) exprimiert [29;30]. Eine starke EPCAM-Expression ist während der frühen Embryonalentwicklung im primären Lungen- und Bronchienepithel zu beobachten, die später im alveolären Epithel des adulten Menschen erhalten bleibt [31]. Eine Funktion von EPCAM ist die Vermittlung der Zelladhäsion, indem es direkt mit dem Aktin-Zytoskelett über α -Actinin interagiert. Eine andere Art der Adhäsion kann auch mit Hilfe von Cadherinen ausgebildet werden. Eine EPCAM-Überexpression in Zellen führte zu einer Verminderung der Cadherin vermittelten Adhäsion [32].

Cadherine sind Proteine, die an der Ausbildung der Zonula Adhaerens im Epithel über eine Kalzium-abhängige Adhäsion beteiligt sind. Zusammen mit Ankerproteinen wie Cateninen, Vinculin und α -Actinin sind sie mit dem Zytoskelett verbunden. E-Cadherin ist ein Vertreter der Cadherine und wird in epithelialen Zellen vorgefunden. Es interagiert mit α -, β - und γ -Catenin und bildet Cadherin-Catenin-Komplexe. Die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion ist die wichtigste in

epithelialen Zellen. Daher wirkt E-Cadherin als Tumorsuppressor, indem es die Invasion und Metastasierung durch die Formation eng verbundener Zellschichten inhibiert [33].

Zur Auslösung der Metastasierung ist es notwendig, dass die festen Zellstrukturen aufgebrochen werden, um einzelnen Zellen eine Invasion in neues Gewebe zu ermöglichen. Dies geschieht mittels eines Prozesses, der als epitheliale mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird. Bei der EMT werden epitheliale und adhäsive Verbindungen aufgelöst, das Zytoskelett wird umorganisiert und die Expression mesenchymaler Gene wird induziert [34]. Die Abnahme des epithelialen Phänotyps ist an einen Verlust von E-Cadherin gekoppelt [35], was wiederum mit einer Verminderung von Cateninen einhergeht. Die Regulation von E-Cadherin auf der transkriptionellen Ebene wird über die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, ZEB1 oder Twist gesteuert. Gleichzeitig ist Snail in der Lage, mesenchymale Gene, wie Vimentin und Fibronectin zu induzieren. Während der EMT kommt es zu einer vermehrten Expression von mesenchymalen Markern, wie Vimentin, Fibronectin und dem Transkriptionsfaktor Snail, während die epithelialen Marker E-Cadherin und Catenin abnehmen.

Mit Hilfe dieser Marker ist es möglich, epitheliale Tumorzellen im Gewebe nachzuweisen und gleichzeitig den Prozess der EMT in den Zellen zu untersuchen, was die Erstellung eines Phänotyps der Tumorzellen ermöglicht.

1.5 Prognostische und prädiktive Marker des Bronchialkarzinoms

Bisher werden für die Therapieentscheidung überwiegend der histologische Subtyp, das Stadium und der körperliche Allgemeinzustand des Patienten zugrunde gelegt. Durch die neuen Medikamente wandelt sich die Therapie des Lungenkarzinoms grundlegend. So werden mittlerweile Marker berücksichtigt, die für den Krankheitsverlauf und die Therapieentscheidung eine wichtige Rolle spielen.

Prognostische Marker, wie Mutationen im *KRAS*-Gen erlauben eine Aussage hinsichtlich der Überlebenszeit eines Patienten, unabhängig von der Behandlung, wobei die Aggressivität eines Tumors im Hinblick auf das Rezidiv- oder Progressionsrisiko berücksichtigt wird. Prädiktive Marker ermöglichen den Effekt eines bestimmten Arzneimittels etwa in Bezug auf die Tumoransprechrage, die Zeit bis zur Progression, das Überleben des Patienten unter Therapie oder die Toxizität zu bewerten. Zum Beispiel werden im Lungenkarzinom aktivierende Mutationen in der Tyrosinkinase des *EGFR* als Marker für das Ansprechen auf die Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib oder Gefitinib gesehen [36].

Die neuen zielgerichteten Therapien haben zu Beginn große Hoffnungen geweckt, die sie nur zum Teil erfüllen konnten. Ferner machen die geringe Überlebensrate und die unbefriedigenden

Ansprechraten auf die klassische Chemotherapie Marker oder Signaturen zur Vorhersage des Therapieansprechens erstrebenswert. Die Identifizierung und Validierung von Markern bedarf intensiver Forschungen in geeigneten klinisch relevanten Proben und Modellen.

1.5.1 Mutationen

Mutationen in Lungenkarzinomen, die bereits in die Entwicklung eines Karzinoms involviert sind oder während der Tumorprogression auftreten, werden als prognostische oder prädiktive Marker diskutiert.

Seit der Entwicklung neuer EGFR-Inhibitoren werden Mutationen im **EGFR** zunehmend als prädiktive Marker in der Literatur erwähnt. Die retrospektive Analyse der klinischen Studien zeigte, dass Subpopulationen bestehend aus Frauen, Asiaten, Nie-Rauchern oder Patienten mit einer ADC-Histologie eine höhere Ansprechrate auf die Medikamente besitzen. Die Patienten wiesen aktivierende Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne des **EGFR** auf. Bisher sind drei unterschiedliche Arten der Mutationen identifiziert: ‚Missense‘, Deletionen und ‚In-Frame‘-Insertionen im Exon 18-21 [37]. *In vitro* Analysen konnten zeigen, dass die Mutationen die Rezeptoren gegenüber der Ligandenbindung sensitivieren [37;38].

Die häufig zu beobachtenden **TP53**-Mutationen in Lungenkarzinomen sind mit einer schlechteren Prognose im histologischen Subtyp ADC assoziiert.

Mutationen im Gen **KRAS** haben sowohl einen prognostischen als auch einen prädiktiven Wert. Sie korrelieren mit einem schlechteren Überleben und werden gleichzeitig mit einem schlechten Ansprechen auf eine Chemotherapie in der adjuvanten Situation und bei fortgeschrittenen Stadien in Verbindung gebracht [3]. Seit kurzem werden **KRAS**-Mutationen als prädiktive Marker für anti-EGFR-Therapien diskutiert. In einer retrospektiven Analyse von klinischen Proben wurde deutlich, dass Tumore mit einer **KRAS**-Mutation nicht auf Tyrosinkinaseinhibitoren ansprechen [39]. Die Mutation führt zu einem konstitutiv aktivierten RAS-Protein, das die entsprechenden nachgeschalteten Signalkaskaden permanent stimuliert. Somit ist die Zelle nicht mehr von der Aktivierung bzw. Blockierung des vorgeschalteten EGFR abhängig.

1.5.2 Einzelnukleotidpolymorphismen

Neben den genannten Mutationen können weitere Variationen in der DNA auftreten. Einzelnukleotidpolymorphismen (engl., Single nucleotide polymorphism = SNP) sind Variationen an einzelnen Nukleotidpositionen, die in mindestens einem Prozent der Bevölkerung auftreten. Im Gegensatz kommt eine Mutation seltener in der Gesellschaft vor. Zwei Drittel aller SNP sind durch einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin gekennzeichnet. Das humane Genom weist ca. 10 Millionen SNP auf. Abhängig von der Lokalisation eines SNP kann dies funktionelle

Konsequenzen haben [40]. Ein Teil der bisher identifizierten SNP befindet sich in kodierenden Regionen, was aber nicht zwangsweise zu einer Aminosäuresubstitution führt. Nur ca. 1% der SNP haben funktionelle Konsequenzen, wodurch es zu einer erhöhten oder reduzierten Aktivität des Proteins kommen kann. Der diploide Chromosomensatz des Menschen enthält je ein väterliches und ein mütterliches Allel, weshalb der Genotyp in drei verschiedenen Varianten (V) auftritt: V1/V1, V1/V2, V2/V2. Es wird vermutet, dass SNP zu mehr als 90% die Individualität des Menschen bestimmen. Demzufolge könnten SNP auch den Phänotyp eines Individuums beeinflussen, wie unter anderem Entwicklung, Alterung, Stoffwechsel, Metabolismus von Medikamenten und dem Risiko, an bestimmten Krankheiten zu erkranken [41].

Neben der bereits erwähnten Mitwirkung von **TP53** an verschiedenen Regulationsprozessen ist die TP53-abhängige Apoptose ein wichtiger Mechanismus durch den DNA-schädigende Zytostatika den Zelltod einleiten. Der SNP R72P ist in einer prolinreichen Gendomäne lokalisiert, die wichtig für die Apoptosefunktion ist. Es gibt Hinweise, dass der R-Genotyp ein höheres Potenzial besitzt, die Apoptose zu induzieren [42;43]. In NSCLC war die Sensitivität gegenüber platinbasierten Chemotherapien in P-Trägern höher und gleichzeitig besaßen sie eine verlängerte progressionsfreie Zeit und Gesamtüberleben [44]. Die Ergebnisse einer Meta-Analyse legen nahe, dass das P-Allel einen ‚low-penetrance‘ Faktor für die Entwicklung von Lungenkrebs darstellt [45;46].

Das ‚mouse double minutes‘-2-Protein (**MDM2**) ist eine TP53-spezifische E3-Ubiquitin-Ligase und der zelluläre Gegenspieler von TP53. MDM2 hemmt die wachstumssupprimierende Funktion von TP53 in normalen, ungeschädigten Zellen. Es besteht ein eng kontrolliertes Wechselspiel zwischen dem Tumorsuppressor TP53 und dem Onkoprotein MDM2. Einerseits aktiviert TP53 die Transkription und damit die Expression von MDM2. Andererseits ist MDM2 in der Lage, die Transkriptionsfunktion von TP53 zu blockieren und das Protein zu degradieren. Der SNP T309G befindet sich im Promotor des *MDM2*-Gens. Das G-Allel erhöht die Bindungsaffinität des Transkriptionsaktivator stimulierendes Protein 1. Als Folge wird die Expression von MDM2 gesteigert, die zu einer Abschwächung des TP53-Signalweges führt [47]. Für Lungenkrebs liegt vermutlich ein erhöhtes Risiko für die G/G-Variante des SNP vor [48;49]. Zusätzlich ist der T/T-Genotyp mit einem längeren Überleben im fortgeschrittenen Lungenkarzinom verbunden [50].

Für den **EGFR** wurde der SNP R497K in der extrazellulären Domäne des Rezeptors beschrieben [51]. Der SNP ist durch den Nukleotidaustausch Guanosin – Adenosin charakterisiert, was in einer Umwandlung der Aminosäure Arginin – Lysin mündet. Der Lysin-Genotyp war mit einem verlangsamten Wachstum einer Zelllinie assoziiert. In Gefitinib behandelten Lungenkrebspatienten war keine Verbindung zwischen dem *EGFR*-Wildtyp und der Prognose vorhanden [52].

Die hier beschriebenen SNP sind noch in der Validierung und benötigen weitere Studien, um ihren Wert als prädiktive Marker abschließend beurteilen zu können.

1.5.3 Gen- und Proteinexpressionsprofile

Die bisher erwähnten Marker sind einzelne Marker, doch kann auch ein Profil aus mehreren Markern einen prognostischen oder prädiktiven Nutzen haben.

In den letzten Jahren gewann die Analyse der Genome und Proteome zunehmend an Bedeutung. Neue Verfahren und Technologien wurden entwickelt, die das Erfassen aller Transkripte der Zelle zu einem bestimmten physiologischen Zeitpunkt ermöglichen. Die wichtigste Technologie stellt das DNA-Microarray dar. Mit seiner Hilfe werden Genexpressionsprofile erstellt und eine genomweite vergleichende Analyse der Genaktivität ermöglicht. Es erfasst gleichzeitig eine Vielzahl von Transkripten quantitativ. Anschließend erfolgt die Analyse der Chipdaten mit bioinformatischen Algorithmen, die durch Funktionsanalysen ergänzt werden.

Proteine unterliegen einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Proteolyse und weiteren, wodurch auch ihre Funktionen in zellulären Prozessen und Signalkaskaden verändert werden. Diese posttranslational durchgeführten Modifikationen werden nicht durch die Aktivität ihrer Transkripte dargestellt. Um mehr über die daraus resultierenden Funktionen zu erfahren, werden Proteinexpressionsanalysen durchgeführt. Bei Protein-Microarrays werden native, rekombinante oder synthetische Proteine in Form einer Matrix auf feste Oberflächen fixiert (gespottet). Es werden ‚Reverse Phase Protein‘-, Antikörper-, Antigen- oder Proteindomänen-Microarrays unterschieden, abhängig ob die Proteine der Probe oder die bekannten Testproteine fixiert werden. Die SELDI-Proteinchip-Technologie verbindet die Microarray- mit der MALDI-TOF-Technologie und ermöglicht die Durchführung der Proteinreinigung, der quantitativen Detektion und die Identifizierung der Aminosäuresequenz auf einer Plattform.

Diese Technologien erlauben die Identifizierung neuer Marker und können zur Aufklärung von zellulären Mechanismen führen.

In Lungenkarzinomen wurde mit Hilfe der ersten Microarryanalysen versucht, die histologische Klassifizierung auch auf Genebene darzustellen. Garber *et al.* gelangen es, die Tumore in SCC, LCC, ADC und SCLC zu unterscheiden [53]. Eine andere Untersuchung deckte weitere Subklassen von Adenokarzinomen auf [54]. Die Genexpressionsanalyse von Wigle *et al.* fand keine histologische Einteilung ihrer Proben, jedoch einen Zusammenhang zum Überleben [55]. Zahlreiche Studien folgten, die Signaturen zum Überleben, allgemeinen klinischen ‚Outcome‘ und dem erneuten Auftreten des Tumors erkannten [56-60]. Ein kritisches Review dieser Studien sah allerdings noch keine klinische Anwendbarkeit dieser Signaturen. Vielmehr wurden Probleme bei dem Studiendesign und der Analyse offensichtlich [61]. Auch auf Proteinebene wurden Profile erstellt, die das Überleben vorhersagen sollen [62]. In jüngerer Zeit wurde auf der Suche nach prognostischen und prädiktiven Profilen ein Fokus auf die zielgerichteten Therapien wie Tyrosinkinaseinhibitoren gelegt. Taguchi *et al.* beschrieben eine Proteomsignatur, die die Patienten

entsprechend ihrem ‚Outcome‘ nach einer anti-EGFR-Therapie gruppierte. Für die klassische Chemotherapie wurde allerdings kein Profil gefunden [63]. Eine andere proteinbasierte Signatur teilte Patienten mit einer Erlotinib- und Bevacizumab-Behandlung basierend auf ihrem ‚Outcome‘ ein. Ferner konnte das Gesamtüberleben und die progressionsfreie Zeit in Erlotinib behandelten Probanden vorhergesagt werden [64]. Erst kürzlich wurde ein Profil aus den fünf Genen *Lipocalin-2*, *NPR3*, *OGG1*, *TRIM72* und *C5orf23* vorgestellt, das retrospektiv aus der BATTLE-Studie ermittelt wurde [65]. In Patienten mit *EGFR*- und *KRAS*-Wildtyp bestimmte es den progressionsfreien Überlebensvorteil in Erlotinib behandelten Probanden. Der prädiktive Wert dieser Gene und weiterer zusätzlicher Marker des PI3K-AKT-Signalweges, EGFR-Signaturen und *KRAS*-Mutationen werden prospektiv in der BATTLE II-Studie überprüft.

Die Genexpressionsprofile bzw. Proteomsignaturen können helfen, grundlegende Mechanismen der Tumorentwicklung und -progression aufzuklären. Sie können aber auch erste Hinweise bieten, Patienten für eine Therapie auszuwählen. Aufgrund der unterschiedlichen Methoden und Probenkollektive sind weitere Validierungen unerlässlich und es bleibt abzuwarten, ob sich eine oder mehrere Signaturen im klinischen Alltag durchsetzen. Bis dahin sollten weitere Forschungen durchgeführt werden, um das individuelle Ansprechen eines Patienten besser zu verstehen. Dafür sind geeignete Modelle notwendig, an denen unterschiedliche Aspekte gleichzeitig und unkompliziert analysiert werden können.

1.6 Zelluläre Mechanismen, die das individuelle Ansprechen auf die klassische Chemotherapie beeinflussen

Die Chemotherapie des Bronchialkarzinoms hat trotz der Entwicklung neuer Zytostatika in den letzten Jahrzehnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt. Entweder sprechen die Patienten von vornherein nicht auf die Medikamente an oder sie entwickeln im Laufe der Therapie eine Resistenz. Zytostatika hindern die Tumorzelle an der Mitose und führen die Zelle in den Zelltod. Resistenzmechanismen befähigen die Zelle Apoptose bzw. Nekrose zu umgehen und sichern das Überleben der Zelle.

Eine Vielzahl an verbundenen und gemeinsam regulierten Resistenzmechanismen wurde in Lungenkarzinomen identifiziert. Die intrazelluläre Zytostatikakonzentration wird durch Änderungen des Influx oder Efflux mittels ATP-abhängiger, membranständiger (ABC-) Transporter reduziert oder eine gesteigerte DNA-Reparatur durch Modifikation der Enzyme der DNA-Replikation und -Reparatur verschlechtern das Ansprechen. Des Weiteren kann eine vermehrte Expression des Glutathions zu einer Resistenz führen. [66].

1.6.1 Resistenz durch einen gesteigerten Efflux

Eine häufig beschriebene Resistenz auslösung wird durch die ATP-abhängigen, membranständigen Transporter vermittelt. Sie schleusen verschiedene Zytostatikaklassen aus der Zelle und reduzieren folglich ihre effektive intrazelluläre Konzentration, wodurch die Zelle resistent wird. Die Familie der ABC-Transporter hat ein großes Spektrum an Substraten und somit Medikamenten, die Anthrazykline, Vinkaalkaloide, Epipodophyllotoxine und Taxane beinhalten. Die phylogenetische Untersuchung klassifizierte die ABC-Superfamilie in sieben Subfamilien (ABCA bis ABCG), die nochmals untergruppiert sind. Nach aktuellem Stand der Forschung sind 49 verschiedene ABC-Transporter des Menschen bekannt [67]. Eine Überexpression der ABC-Transporter ‚Multidrug resistance protein 1‘ (MDR1) und dem ‚Multidrug resistance-associated protein 1‘ (MRP1) wurde in Tumorzelllinien entdeckt. Ihre Überexpression war mit einem erhöhten Efflux an Zytostatika wie Anthrazyklinen, Epipodophyllotoxinen und Vinkaalkaloiden assoziiert. Die Expression von MDR1 und MRP1 in der menschlichen Lunge deutet an, dass sie entscheidend zum Schutz gegen endogene und exogene toxische Substanzen beitragen [68].

Transporter \ Substrat	Etoposid	Paclitaxel	Erlotinib
ABCB1 (MDR1, PGP)	+	+	+
ABCC1 (MRP1)	+	-	-
ABCG2 (BCRP)	+	-	+

Tab. 1: Mitglieder der ABC-Transporter-Familie und eine Auswahl ihrer Substrate. + Substrat; - kein Substrat

Der MDR1-Transporter gehört zur ABCB-Familie und ist in der Lage, Zytostatika wie Etoposid, Doxorubicin und Vinblastin zu transportieren, aber auch Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib [69;70]. In normalen und malignen Geweben konnten unterschiedliche Expressionsstärken der *MDR1*-mRNA nachgewiesen werden [71], und eine immunhistologische Färbung des MDR1-Proteins im Tumor war ebenfalls erfolgreich [72]. Dennoch ist die Bedeutung der MDR1-Expression im Zusammenhang zur Chemoresistenz umstritten [73-75]. Bei der Erstellung eines Resistenzprofils in NSCLC Patienten wurde MDR1 in einem Profil identifiziert [76]. Auch für das SCLC finden sich Hinweise, dass MDR1 eine Resistenz vermitteln kann. Die Proteinmenge von MDR1 als auch MRP1 korrelierte mit dem Ansprechen [77]. Neben dem Zusammenhang zwischen der MDR1-Expression und der Chemosensitivität wurde in einer anderen Studie eine Korrelation mit dem Überleben gesehen [78]. Im NSCLC scheint eine Resistenz eher durch MRP1 vermittelt zu werden. MRP1 weist nur eine 15%ige Aminosäurehomologie zu MDR1 auf und zeigt trotzdem ein ähnliches, wenn auch nicht identisches Zytostatikaspektrum, das Wirkstoffe wie Doxorubicin,

Vincristin, Etoposid und Methotrexat einschließt. Das Protein transportiert neutrale und anionische hydrophobe Substrate, nachdem sie an organische Anionen wie Glutathion konjugiert wurden oder es ko-transportiert unkonjugiertes Glutathion [79-81]. Eine MRP1-Überexpression vermittelte eine Resistenz gegenüber Zytostatika in einer Lungenkrebszelllinie [82] und mehrere Studien belegen, dass der Nachweis von MRP1-mRNA oder -Protein mit dem Ansprechen auf Medikamente wie Doxorubicin, Vincristin, Etoposid oder einer platinbasierten Chemotherapie assoziiert war [83;84]. In der Subfamilie ABCG ist der Transporter G2 (ABCG2) von besonderem Interesse. Seine Substrate umfassen Arzneimittel wie Mitoxantrone, Topotecanderivate und Anthrazykline ebenso wie die neuen zielgerichteten Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib [70;85;86]. In einer Studie enthielten unbehandelte Tumore, wie Plattenepithel- und Adenokarzinome eine moderate bis starke ABCG2-Proteinmenge [87]. Als prognostischer Marker ist ABCG2 in der Diskussion, da das schlechte klinische ‚Outcome‘ in fortgeschrittenen NSCLC Proben an den Nachweis von ABCG2 gebunden war. Und als möglicher prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine platinbasierte Therapie wurde ABCG2 in fortgeschrittenem NSCLC gesehen [88;89]. Im SCLC bestand ein Zusammenhang zum progressionsfreien Überleben und der Sensitivität [90].

Neben den hier detaillierter beschriebenen Hauptvertretern der Multimedikamentenresistenz sind auch andere Mitglieder der ABC-Transporterfamilie in der Lage, das Ansprechen der Tumorzellen zu beeinflussen. Dabei besitzen Mitglieder einer Subfamilie teilweise unterschiedliche Substratspektren, die zusätzlich zu den bereits erwähnten Wirkstoffen auch weitere beinhalten.

Ein ABC-Transporter unabhängiger Transportmechanismus wird durch intrazelluläre vesikel-assoziierte Ribonukleoproteine, sogenannten ‚Vaults‘ vermittelt. Sie bestehen aus einer untranslatierten RNA und drei Proteinen. ‚Vaults‘ sind vermutlich in die subzelluläre Redistribution von Substanzen, z.B. im nukleozytoplasmatischen Transport involviert. Sie erzeugen Resistenzen gegen Substanzen wie Doxorubicin, Vincristin, Etoposid und Cisplatin. Eine gesteigerte Synthese von ‚Vaults‘ wurde in intrinsisch multimedikamentenresistenten Lungenkrebszellen und auch in zytostatikaselektionierten Sublinien beobachtet [91]. In der Lungenkrebszelllinie H460 war eine erworbene Resistenz gegen Etoposid mit einer erhöhten Expression vom ‚Lung resistance related Protein‘ (LRP) verbunden [92]. Die Konzentration von LRP führte in den NCI-60-Zelllinien zu einer stärkeren Korrelation mit der Sensitivität als vergleichsweise die Überexpression von MRP1 [93]. Ein Zusammenhang zwischen LRP und der Resistenz gegenüber Doxorubicin [94] als auch einer platinbasierten Therapie [83] wurde für NSCLC Proben beschrieben.

Die ersten *in vitro* Analysen konnten zeigen, dass die vier Marker MDR1, MRP1, ABCG2 und LRP in eine (erworbene) Resistenz involviert sind und somit einen Resistenzmechanismus darstellen. Trotzdem ist sich die Fachwelt bis heute noch nicht über die Bedeutung in klinischen

Patientenkollektiven einig. Kliniknahe Untersuchungsmodelle, die eine bessere Verbindung zwischen der Klinik und der Zellkultur herstellen, können eine wichtige Rolle bei der Suche nach Resistenzmarkern einnehmen.

Resistenz durch Veränderungen in der DNA-Replikation und -Reparatur

Der Wirkungsmechanismus der Zytostatika beruht u. a. auf der Hemmung der DNA-Replikation. Veränderungen in der Expression von zellulären Enzymen, Kofaktoren und strukturellen Proteinen, die direkt oder indirekt an der DNA-Replikation, Transkription oder Reparatur beteiligt sind, können das Ansprechen beeinflussen. DNA-Reparaturmechanismen sind in Lungenkarzinomen als auch in anderen Tumorentitäten häufig anormal [95]. Abwandlungen in DNA-Reparaturenzymen führen zur verminderten oder erhöhten Aktivität, die mit einer Resistenz gegenüber Bestrahlung, alkylierenden Substanzen, Platinderivaten und DNA-schädigenden Medikamenten wie Anthrazyklinen assoziiert sind [96-99]. Die Reparatur der DNA geschieht abhängig vom Schadenstyp durch Basenexzisionsreparatur, Nukleotidexzisionsreparatur, 'Mismatch Repair' oder Reparatur der Doppelstrangbrüche. SNP in einzelnen oder mehreren reparaturassoziierten Genen könnten Auswirkungen auf die DNA-Reparaturkapazität eines Menschen haben.

Die Basenexzisionsreparatur repariert oxidierte oder reduzierte Basen, DNA-Addukte oder Schäden durch methylierende Substanzen. Der Mechanismus besteht aus DNA-Glykosylasen, die anormale Basen erkennen und ausschneiden; Endonukleasen, die die Basen entfernen und der DNA-Polymerase β , die das korrekte Nukleotid einfügt. Die Reparatur wird beendet, indem die DNA-Ligase und Kofaktoren wie 'X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells' (XRCC) 1 die DNA-Stränge wieder verbinden. Das Vorkommen von SNP in den beteiligten Enzymen wird in Verbindung mit dem Lungenkrebsrisiko gesehen [100]. Eine Vielzahl von SNPs sind für *XRCC1* erfasst, von denen der SNP R399Q am häufigsten in der Bevölkerung zu finden ist. Dieser SNP wird im Zusammenhang mit einem veränderten Risiko für Lungenkrebs erwähnt [101;102].

Die Nukleotidexzisionsreparatur erkennt Schäden wie Pyrimidindimere, größere chemische Addukte und 'Cross-Links', die von Antimetaboliten, alkylierenden Substanzen, Platinderivaten und Anthrazyklinen verursacht werden [99;103]. Das System umfasst Faktoren wie 'Xeroderma pigmentosum' (XP) A, 'Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency' (ERCC) 2, ERCC3, ERCC5, ERCC1, XPC und den Transkriptionsfaktor IIIH. Die Reparatur kann in vier Schritte unterteilt werden:

- 1) Erkennung des Schadens durch einen XPC-Proteinkomplex,
- 2) Auftrennung der DNA mittels des Transkriptionsfaktors IIIH-ERCC2-Komplexes,
- 3) Abtransport der Einzelstrangfragmente mit Hilfe des ERCC1-ERCC3-Komplexes,
- 4) DNA-Neusynthese durch die DNA-Polymerase.

Shen *et al.* entdeckten den SNP 118 in *ERCC1*, der zwar keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat, aber durch Abwandlung des Codons die Transkriptionsrate auf fast 50% reduzierte [104;105]. Seit kürzerer Zeit ist *ERCC1* als prädiktiver Marker in der Diskussion. Zhou *et al.* und andere sahen einen Zusammenhang zwischen dem SNP und dem Ansprechen auf eine Carboplatin-Therapie [106;107]. Erste klinische Studien zur Überprüfung der *ERCC1*-Expression und dem Ansprechen wurden und werden durchgeführt. Hinweise für den prädiktiven und prognostischen Wert des SNP K751Q in *ERCC2* sind ebenfalls in der Literatur vorhanden. Das Glycin-Allel war mit einem höheren DNA-Addukt-Level oder einer verringerten DNA-Reparaturkapazität [108-110] und gleichzeitig mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko verbunden [111]. Die funktionellen Folgen des *ERCC5* SNP D1104H sind noch unbekannt, jedoch werden eine Veränderung der Aktivität und eine Modifikation der Krebsveranlagung vermutet. Der D/D-Genotyp korrelierte mit dem Vorkommen von Lungenkrebs [112] und ein schlechteres Überleben von Patienten mit Lungenkarzinomen war an den homozygoten H-Genotyp gebunden [113].

Die Reparatur der Doppelstrangbrüche, die durch Replikationsfehler oder ionisierende Strahlung entstanden sind, können mit Hilfe von zwei Mechanismen korrigiert werden: nicht-homologes ‚End-joining‘ oder homologe Rekombination [114]. An der homologen Rekombination sind mehr als 16 Moleküle beteiligt, die auch die Gene *BRCA1* und *BRCA2* sowie *XRCC3* umfassen [115]. Studien haben sich bisher mit dem Krebsrisiko und dem *XRCC3* SNP T241M befasst. Eine Meta-Analyse konnte keine Verbindung zwischen diesem SNP und dem Lungenkrebsrisiko feststellen [116]. Der homozygote M-Genotyp stellte sich als ein prognostischer Faktor bei jüngeren Patienten unter einer Gemcitabin-/ Cisplatin-Therapie heraus [117].

1.6.2 Resistenz durch Entgiftung

Einen weiteren Resistenzmechanismus stellt eine gesteigerte Entgiftung dar. Die Glutathion-S-Transferasen (GST) nehmen eine wichtige Rolle in diesem Prozess ein. Sie katalysieren die Bindung von hydrophoben und elektrophilen Substanzen an reduziertes Glutathion. Die Glutathionkonjugate sind häufig weniger toxisch und weisen eine bessere Wasserlöslichkeit als die ursprünglichen Substanzen auf, was ihre Exkretion erleichtert. Für das Gen *GSTP1* ist u. a. der SNP I105V bekannt. Lungenkrebszellen mit einem V-Genotyp besaßen eine reduzierte Enzymaktivität

[118]. Der SNP scheint in die Prognose bezüglich des Überlebens und der progressionsfreien Zeit involviert zu sein.

Die hier aufgezählten SNP in den Reparaturgenen können die DNA-Reparatur verändern. Eine fehlende oder falsche Reparatur der DNA-Schäden mündet häufig im Zelltod, das eigentliche Ziel der Chemotherapie. Ist jedoch die Aktivität der DNA-Reparatur- oder der Entgiftungsenzyme gesteigert, erlangt die Tumorzelle einen Überlebensvorteil.

1.7 Zelluläre Mechanismen, die das individuelle Ansprechen auf zielgerichtete Therapien beeinflussen

1.7.1 EGF-Rezeptor-Inhibitoren

Der EGF-Rezeptor ist das Zielprotein des Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib und des monoklonalen Antikörpers Cetuximab. In klinischen Studien sprachen jedoch nur einige Patienten auf die Medikamente an und die hohen Erwartungen konnten nicht erfüllt werden. Die Tumorzelle hat Mechanismen entwickelt bzw. waren diese bereits intrinsisch vorhanden, die die Ansprechraten verschlechterten. Die Resistenzmechanismen können auf verschiedenen Ebenen im EGFR-Netzwerk ansetzen. In vielen Tumorarten wird der EGFR-Signalweg durch eine Überproduktion der Liganden, der Rezeptoren oder einer konstitutiven Aktivierung der Rezeptoren hyperaktiviert. Das Wissen über den Mechanismus eines aktivierten Signalweges verursacht durch eine Mutation, Überexpression oder Amplifikation eines Mitgliedes des Signalweges, kann helfen, das Überleben und das Therapieansprechen des Patienten besser einzuschätzen [119].

1.7.1.1 Der EGFR und die ERBB-Proteinfamilie

Der EGFR stellt das Zielprotein der beiden Medikamente Erlotinib und Cetuximab dar. Die Therapeutika binden an unterschiedliche Domänen des EGFR und verhindern seine Aktivierung und die daraus resultierende Anschaltung nachfolgender Signalkaskaden.

Der EGFR gehört zu der Familie der ERBB-Rezeptoren, die aus vier Transmembran-Tyrosinkinase-Rezeptoren-Typ-1 bestehen: EGFR, ‚V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog‘ (ERBB) 2, ERBB3 und ERBB4. Diese eng miteinander verwandten Rezeptoren haben eine molekulare Masse von 180 kDA. Jeder Rezeptor besitzt eine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle mit zwei cysteinreichen Regionen, eine alpha-helikale Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinase [120]. Die extrazelluläre Region umfasst vier Domänen. Während die Domäne I und III für die Ligandenbindung verantwortlich sind, vermittelt Domäne II die Dimerisation zwischen den Rezeptoren. Domäne IV interagiert mit Domäne II im

inaktiven Zustand. Der Aufbau der extrazellulären Domäne des ERBB2 unterscheidet sich deutlich von den übrigen Mitgliedern. Sie weist eine starre Konformation auf, die der aktivierten Form ähnelt [121]. Diese Konformation erklärt, warum ERBB2 einerseits der bevorzugte Dimerisationspartner ist und andererseits, warum kein Ligand in der Lage ist, eine Bindung einzugehen [122]. ERBB3 fehlt dagegen die Tyrosinkinaseaktivität, da er unfähig ist ATP zu binden [123]. Eine Dimerisation kann zwischen zwei unterschiedlichen Mitgliedern (Heterodimerisation) oder zwischen zwei gleichen Rezeptoren (Homodimerisation) auftreten. Es sind zehn verschiedene Kombinationen möglich.

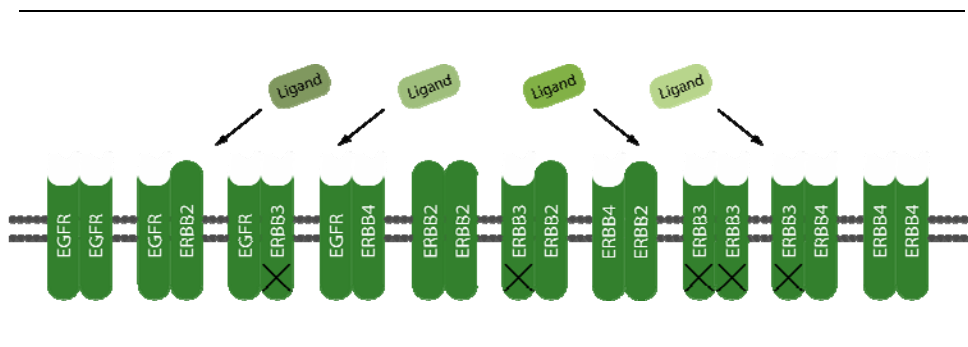


Abb. 5: **Mitglieder der ERBB-Proteinfamilie und mögliche Formationen der Homo- und Heterodimere.** Die extrazelluläre Domäne des ERBB2 liegt in einer starren Konformation vor, was eine Bindung eines Liganden verhindert. Der ERBB3 besitzt eine inaktive Tyrosinkinase (x).

Im inaktiven Zustand liegt der Rezeptor als Monomer vor. Nachdem ein Ligand gebunden hat, findet eine Konformationsänderung statt und die Partner dimerisieren. Anschließend erfolgt die gegenseitige Phosphorylierung der Tyrosinkinasen beider Rezeptoren, an die weitere Proteine binden und die Aktivierung von Signalwegen induzieren. Der Ligand und der Dimerisationspartner beeinflussen, welche Aminosäure autophosphoryliert wird und folglich welche Signalproteine rekrutiert werden [124]. Im Gegensatz zu Heterodimeren und im besonderen zu ERBB2-Dimeren weisen Homodimere nur geringe mitogene und transformierende Eigenschaften auf [125]. Das ERBB2-ERBB3-Heterodimer besitzt das höchste mitogene und transformierende Potenzial. Die Rolle des ERBB4 in der Onkogenese ist noch weitestgehend unbekannt, er scheint jedoch eher in die Wachstumsinhibition als in die Proliferation involviert zu sein [126].

In Tumoren können die ERBBs unterschiedliche Veränderungen unterlaufen, die in einer konstitutiven Aktivierung des EGFR münden. Eine Genamplifikation des EGFR und ERBB2 führt zu einer Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten, die auch Lungenkarzinome umfassen. 20-40% der NSCLC Zellen weisen eine erhöhte Genkopienzahl auf, die in einem Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die Tyrosinkinaseinhibitoren steht [127-131]. Die erhöhte Genexpression führt auch zu einer Überexpression des EGFR und ERBB2. Beide werden als prognostische und

prädiktive Marker diskutiert, da die Expressionsstärke des EGFR mit der Sensitivität gegenüber Gefitinib und Erlotinib assoziiert war [132;133] und ERBB2 mit einer schlechten Prognose korrelierte [134]. Die Daten zu ERBB3 und ERBB4 deuten eine Überexpression und Hyperaktivierung im NSCLC an [135;136].

Als eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Ansprechraten im NSCLC werden Mutationen im *EGFR* gesehen. Aktivierende, sensitivierende Mutationen im Exon 18-21 in der Tyrosinkinasedomäne des *EGFR* können über das Ansprechen auf Erlotinib [36] und Gefitinib [37;38] entscheiden. Vermehrt werden diese Mutationen in Frauen, Asiaten, Nie-Rauchern und einer ADC-Histologie detektiert. In kaukasischen Patientenkollektiven weisen ca. 10-15% eine Mutation auf, während in asiatischen Kollektiven 30-40% mutiert sind. In Patienten mit Mutationen sind bis zu 80% sensitiv gegenüber Erlotinib, während es beim EGFR-Wildtyp nur 10% sind. Die Mutationen im *EGFR* sind mittlerweile als prädiktive Marker für das Ansprechen auf die Tyrosinkinaseinhibitoren akzeptiert und werden zunehmend in den klinischen Alltag integriert. Es ist nach wie vor ungeklärt, warum auch Patienten ohne Mutation sensitiv auf die Therapie reagieren.

1.7.1.2 Liganden des EGF-Rezeptors

Die konstitutive Aktivierung des EGFR und seiner nachfolgenden Signalwege kann darüber hinaus auch durch eine verstärkte Expression der Liganden stimuliert werden. Zellen, die den EGFR als Überlebens- und Proliferationssignalweg nutzen, produzieren eigenständig Liganden, die den EGFR aktivieren. Im NSCLC ist oft ein autokriner Loop zwischen EGFR und einem seiner Liganden vorhanden [137]. Mit seiner Hilfe können Tumorzellen unabhängig von externen Wachstumsfaktoren proliferieren, da sie selbst eine erhöhte Konzentration an Liganden produzieren, die wiederum die Rezeptoren stimulieren und ihre eigene Expression induzieren.

An den EGFR und die ERBB-Rezeptoren können folgende Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten binden: epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), transformierender Wachstumsfaktor (TGF) A, Amphiregulin (AREG), heparinbindender epidermaler Wachstumsfaktor (HB-EGF), Betacellulin, Epiregulin (EREG), Neuregulin 1-4 und Epigen (siehe Abb. 6). Die Liganden besitzen alle eine aus sechs Cysteinresten bestehende Konsensussequenz, das EGF-Motif, das hoch konserviert ist. Die Proteine werden als membranständige Vorläuferglykoproteine synthetisiert und nach einer proteolytischen Spaltung mittels einer Metalloprotease in den extrazellulären Raum freigesetzt.

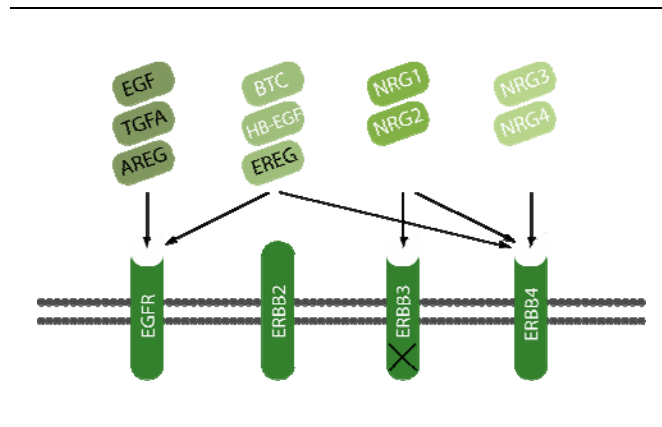


Abb. 6: **Liganden der ERBB-Proteinfamilie.** Epidermaler Wachstumsfaktor - EGF, transformierender Wachstumsfaktor A - TGFA, Amphiregulin - AREG, heparinbindender epidermaler Wachstumsfaktor - HB-EGF, Betacellulin - BTC, Epiregulin - EREG und Neuregulin - NRG.

An den EGFR binden ausschließlich die vier Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG. TGFA ist zu 46% homolog zum EGF und die Affinität von TGFA zum EGF-Rezeptor kann mit der von EGF verglichen werden [138]. AREG weist eine um 40% verminderte Bindungsaffinität zum EGFR auf, was zu einer geringeren Autophosphorylierung des Rezeptors führt [139]. AREG und EREG haben wachstumsstimulierende als auch -inhibierende Eigenschaften [140;141].

Für alle vier Liganden wurde eine Überexpression in NSCLC Tumoren nachgewiesen [142-144]. Als prognostische Marker könnten die zwei Liganden EGF und TGFA von Bedeutung sein. Ihre Expression korrelierte mit einer schlechten Prognose [145;146]. Über den prädiktiven Wert der Liganden TGFA, AREG und EREG besteht noch keine Einigkeit in der Fachwelt. In einigen Studien wurde zwischen dem Ansprechen und dem Überleben von anti-EGFR-therapierten Patienten und der TGFA-Serumkonzentration ein Zusammenhang beobachtet [147;148]. Weitere Daten konnten zeigen, dass die *AREG*-mRNA oder das Protein einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Gefitinib oder Erlotinib und das Überleben haben [149-151]. In anderen Tumorentitäten, wie kolorektalen Tumoren, war eine hohe Genexpression von *EREG* und *AREG* ebenso wie *KRAS*-Mutationen mit dem Ansprechen auf Cetuximab assoziiert [152].

1.7.1.3 Signalwege des EGFR

Die ERBB-Rezeptoren und ihre Liganden aktivieren unterschiedliche ‚Downstream‘-Signalwege, die u. a. die Zelle zur Proliferation stimulieren, das Überleben sicherstellen, die Adhäsion regulieren und die Apoptose kontrollieren. Dabei können einzelne oder mehrere Wege durch Überlappung von Proteinen in dem komplexen Netzwerk zu dem gewünschten Output führen. Der jeweilige Ligand und die Hetero-/ Homodimere bestimmen, welche Tyrosinreste am EGFR phosphoryliert werden [153]. Darauf aufbauend interagieren unterschiedliche Signalproteine zuerst mit dem EGFR und anschließend mit Proteinen aus den nachfolgenden Signalwegen.

Der RAS- und SHC- aktivierte MAPK-Signalkaskade ist ein nachgeschalteter Weg aller ERBB-Liganden. Der PI3K aktivierte Proteinkinase B (AKT)-Signalweg und p70S6K-Weg werden ebenfalls von den meisten ERBB-Dimeren aktiviert (Abb. 7). Dabei variiert die Aktivität und Kinetik von PI3K, was vermutlich durch die direkte Bindung mit ERBB3 und ERBB4 und durch die indirekte Bindung mit EGFR und ERBB2 bedingt ist [154]. ERBB3 ist nur in der Lage, mit SHC und GRB7 zu interagieren [155].

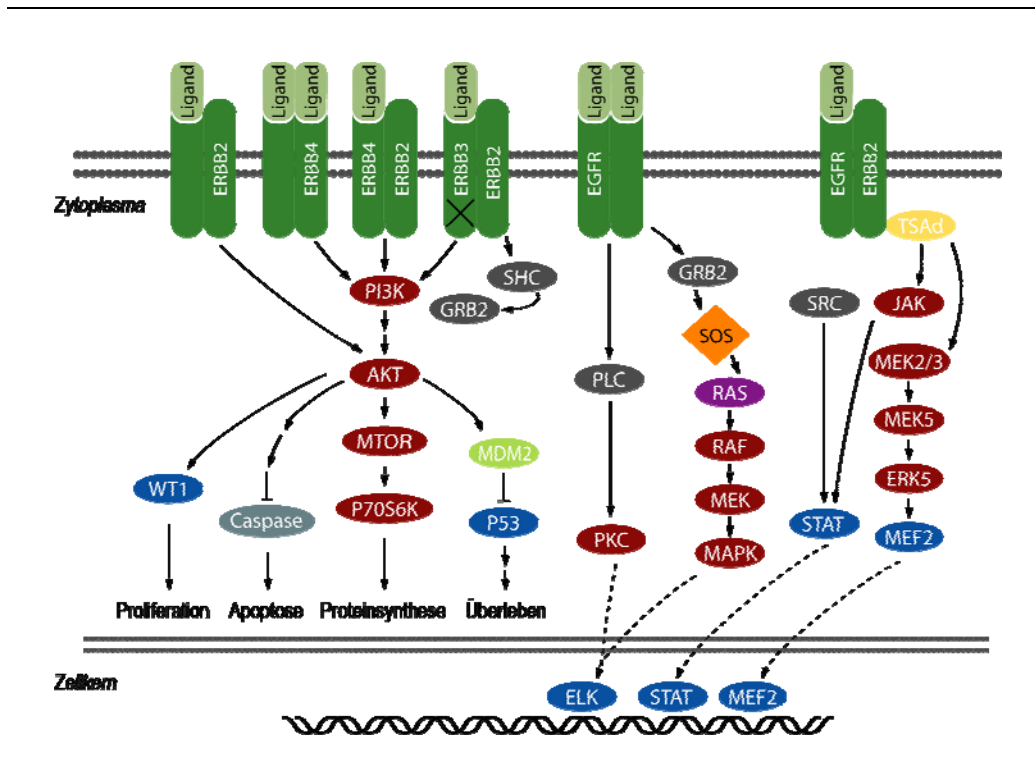


Abb. 7: Netzwerk der Signalkaskaden, die durch den EGFR oder andere ERBBs stimuliert werden.

Eine permanente Stimulation der Signalwege kann sowohl durch den EGFR als auch durch eine Überexpression eines der ‚Downstream‘-Proteine ausgelöst werden. So ist die permanente PI3K-Aktivierung ein häufiges Ereignis, das eine Resistenz vermittelt. Die erhöhte und EGFR-unabhängige PI3K-Aktivität kann durch eine Genamplifikation, aktivierende Mutationen in der p85-Untereinheit oder durch eine Überexpression von nachgeschalteten Effektoren wie AKT verursacht werden. Des Weiteren können inaktivierende Mutationen oder ein vollständiger Funktionsverlust der Phosphatase PTEN, die ein negativer Regulator von PI3K ist, dazu beitragen. Diese Veränderungen werden häufig während der Krebsentwicklung und Progression beobachtet und können zu einem konstitutiven Signal durch AKT und/ oder MAPK führen [156].

Die ERBB-Rezeptoren sind jedoch nicht nur in der Lage, die Signalwege durch direkte Stimulation einzuschalten, sondern auch durch Transaktivierungen mit Hilfe von Hormonen, Neurotransmittern, Lymphokinen und Stressinduktoren. Eine Vielzahl dieser trans-regulatorischen

Interaktionen werden durch Proteinkinasen vermittelt, die direkt die ERBB-Rezeptoren transphosphorylieren [157]. Ein intensiv untersuchter Mechanismus wird durch die G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR) repräsentiert. GPCRs induzieren das Schneiden und die Freisetzung von HB-EGF, was zu einer Phosphorylierung des EGFR führt [158]. HB-EGF im Serum von Patienten korrelierte mit dem Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren [159]. Eine EGFR-unabhängige Aktivierung von Signalwegen kann die Blockade des EGFR und seiner nachgeschalteten Kaskaden überwinden. So sind der ‚Insulin-like growth receptor‘ (IGFR) und seine Liganden in der Lage Signalwege der Mitogenese, des Überlebens und der Apoptose zu kontrollieren.

Mit Hilfe der zielgerichteten Therapien sollten Signalwege inhibiert oder geblockt werden, die eine Schlüsselfunktion im Tumorwachstum einnehmen. Es wurde jedoch deutlich, dass die Tumore die Blockade durch Nutzung verschiedener Signalkaskaden in dem redundanten Netzwerk umgehen können. Ein Kombinationsansatz der mehrere Wege gleichzeitig hemmt, könnte mehr Erfolg versprechen.

1.7.2 Interaktionen zwischen der Angiogenese und dem EGFR-Netzwerk

Ab einer bestimmten Tumorgröße ist für das Wachstum eines Tumors die Neo-Angiogenese unerlässlich. Sie versorgt den Tumor mit Nährstoffen sowie Sauerstoff und transportiert Abfallprodukte [16]. Die Ausbildung der Gefäße beginnt mit Hämangioblasten und endet mit der reifen Vaskulatur [160]. Dieser Prozess wird durch das enge Wechselspiel pro-angiogener und anti-angiogener Faktoren reguliert und schließt autokrine und parakrine Signalübertragung ein [161]. Der wichtigste Stimulator der Angiogenese ist VEGFA [162;163], dessen Expression die Vaskulatur unter normalen physiologischen Umständen kontrolliert [164]. Der angiogene Switch bewirkt unter pathologischen Bedingungen, dass VEGFA von NSCLC und SCLC sowie weiteren Krebsarten sezerniert wird und auf die endothelialen Zellen wirkt, um die Bildung neuer Gefäße anzuregen [161;165]. Die VEGFA-Expression kann durch verschiedene Faktoren wie RAS, SRC, ERBB2, EGFR und einer Hypoxie stimuliert werden. Dabei nimmt der Sauerstoffgehalt einer Zelle eine besondere Rolle in der pathologischen Angiogenese ein, da die Hypoxie vermutlich der wichtigste Regulator der VEGFA-mRNA-Expression ist [164]. Ein geringer Sauerstoffgehalt in den Zellen induziert die VEGFA-mRNA-Expression schnell aber reversibel [166]. Mit Hilfe des hypoxie-induzierten Faktors (HIF) 1A wird die Transkription einer Vielzahl von angiogenen Genen, wie VEGFA stimuliert [160]. Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird HIF1A durch proteasomalen Abbau herunterreguliert [164], während unter hypoxischen Bedingungen die intrazelluläre Proteolyse blockiert ist [167]. Neben den bereits erwähnten sind auch externe Faktoren in der Lage, die Angiogenese über die VEGFA-mRNA-Expression zu induzieren. Einige dieser Faktoren

sind Wachstumsfaktoren wie TGFA, TGFB, Tumor-Nekrosis-Faktor A, Keratinozyten-, IGF-, Fibroblastenwachstumsfaktor und Zytokine.

In soliden Tumoren scheinen der VEGF- und der EGFR-Signalweg darüber hinaus miteinander verbunden zu sein, indem sie sich ‚Downstream‘-Signalwege teilen [168]. Zum einen fördert die Synergie von VEGFA und EGFR die epitheliale Tumorentwicklung, da in einer zellautonomen und angiogeneseunabhängigen Art autokrines VEGFA für die Proliferation von Tumorzellen über eine VEGFR1-Aktivierung notwendig ist [169]. Zum anderen besitzen EGF und TGFA pro-angiogene Eigenschaften und sind in der Lage, die VEGFA-Expression über den EGFR zu aktivieren [170]. In ersten präklinischen Modellen führte eine Cetuximab-Therapie zu einer Verminderung pro-angiogener Faktoren wie VEGFA, Interleukin 8 und dem Fibroblastenwachstumsfaktor. Gleichzeitig war die Anzahl der Mikrogefäße und der Metastasen reduziert. Es wird vermutet, dass die Anti-Tumorwirkung Cetuximabs teilweise durch die Hemmung der Angiogenese vermittelt wird, indem vorgeschaltete angiogene Signalwege unterbrochen werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren dokumentiert [161]. Eine Inhibition des EGFR blockiert aber nicht den VEGFA, was dem Tumor die weitere Angiogenese und das Wachstum ermöglicht [171].

Die Bedeutung der beiden Signalwege von VEGFA und dem EGFR in Tumoren prädestinierten sie für eine kombinierte Behandlung. Beispielhaft werden die bisherigen Daten für die beiden Medikamente Erlotinib als EGFR-Inhibitor und Bevacizumab als Angiogenesehemmer vorgestellt. Präklinische Studien konnten eine additive Anti-Tumorwirkung von anti-EGFR und anti-angiogenen Therapien in verschiedenen Xenograftmodellen zeigen [172;173]. In einer klinischen Studie Phase I/II mit 40 NSCLC Patienten (Nicht-SCC, Stadium IIIb/IV), die zuvor eine Chemotherapie erhielten, wurde in 20% der Probanden eine partielle Antwort und in 65% ein stabiles Tumorwachstum beobachtet [174]. Andere Phase II Studien zeigten ebenfalls eine Überlegenheit der Kombination Erlotinib-Bevacizumab gegenüber der Chemotherapie [175;176]. In der ATLAS-Studie wurde der Wert der kombinierten Erhaltungstherapie mit Bevacizumab plus Erlotinib in fortgeschrittenem NSCLC (Stadium IIIb/V) bestimmt. Der primäre Endpunkt (progressionsfreies Überleben) wurde bereits nach der zweiten geplanten Zwischenanalyse erreicht und die Studie wurde gestoppt [177]. Die Ergebnisse der BeTa-Studie waren weniger überzeugend. Zwar wurde der primäre Endpunkt (verlängertes Überleben) nicht erreicht, trotzdem waren die progressionsfreie Zeit und die Ansprechrate in der Kombinationsgruppe erhöht [178]. Diese Daten machen deutlich, dass eine Kombinationstherapie mit einem EGFR-Inhibitor und einem anti-angiogenen Medikament eine biologisch sinnvolle und Erfolg versprechende Therapieoption darstellt. Weitere Untersuchungen und Studien werden zeigen, inwieweit dieses Konzept in der *Klinik relevant sein wird* und Anwendung findet.

1.8 Xenografts als präklinische Modelle

Die bis heute unbefriedigenden Ergebnisse in der Behandlung des NSCLC sowohl mit Hilfe der klassischen Chemotherapie als auch der neueren EGFR-Inhibitoren machen weitere Forschungen notwendig. Dies beinhaltet auch die Aufklärung von intrinsischen oder erworbenen Resistenzmechanismen und die Identifizierung von prognostischen und prädiktiven Markern, die die Selektion von Patienten verbessern sollen. Dies ist nur mit präklinischen Modellen möglich. In der präklinischen Forschung werden vornehmlich Tumorzelllinien oder aus Zelllinien und klinischem Tumorgewebe abgeleitete Xenografts als Modelle eingesetzt. Zelllinien stehen unbegrenzt zur Verfügung und weisen eine hohe Homogenität auf, haben aber den Nachteil der Dedifferenzierung [179]. Als weiteres Untersuchungsmaterial stehen Patientenproben aus der Klinik zur Verfügung. Diese besitzen heterogene Strukturen und sind häufig quantitativ limitiert. Patientenabgeleitete Xenografts können somit eine bessere Verbindung zwischen Modell und Klinik schaffen.

Mit der Entdeckung der immunsupprimierten Nacktmaus (NMR1:nu/nu), die T-Zell defizient ist [180] und später der ‚Severe combined immunodeficiency‘ (SCID) -Maus, die zusätzlich einen B-Zelldefekt aufweist [181], wurden die Grundlagen für die Arbeit mit Xenografts geschaffen. Im Jahr 1969 wurde der erste Bericht über das Wachstum eines humanen Tumors auf einer Nacktmaus veröffentlicht [182]. Seitdem wachsen humane Tumore auf Nackt- [183] oder SCID-Mäusen [181]. Xenografts werden entweder durch eine direkte intravenöse, intraperitoneale, subkutane oder orthotope Transplantation von Patientenmaterial oder durch Applikation von Zelllinien generiert. *In vivo* Tumore von Zelllinien, die in kontinuierlicher und hoher Passage (P) gehalten wurden, waren vermehrt dedifferenziert und zeigten keine histologischen Ähnlichkeiten zu den ursprünglichen Tumoren [179]. Ferner verlieren Zelllinien durch eine *in vitro* Kultivierung ihr tumorspezifisches Genprofil, das auch nach einer sekundären Transplantation als Xenograft nicht wieder hergestellt werden konnte [184]. Eine Stärke der Modelle stellt das breite Spektrum der verfügbaren Tumorentitäten dar und die Möglichkeit, vor der Transplantation *ex vivo* genetische oder therapeutische Manipulationen vorzunehmen. Bei der Verwendung von Xenografts ist zu berücksichtigen, dass Vaskulation und Stroma von der Maus stammen. Ferner wachsen die Tumore bei subkutaner Transplantation in einer artifizialen Umgebung, wodurch das Ereignis der Metastasierung selten zu beobachten ist. Abhängig vom Wirkungsmechanismus der Therapeutika können nicht alle Mechanismen mit Hilfe der Xenografts untersucht werden. Medikamente, die das intakte Immunsystem des Wirts für ihre Wirksamkeit benötigen, können nur in syngenem Mausmodellen angewendet werden.

Bereits in den 70-iger Jahren wurde der prädiktive Wert der patientenabgeleiteten Xenografts untersucht. Steel *et al.* etablierten Xenografts unterschiedlicher Tumorentitäten und fanden heraus, dass die Chemosensitivität mit den Patienten übereinstimmte [185]. In einem Review größerer Xenograftstudien wurde die Wirksamkeit von klassischen Medikamenten in Zelllinien und Xenografts mit klinischen Phase II Studien verglichen [186]. Der prädiktive Wert war abhängig von der untersuchten Tumorentität. Zelllinien konnten das Ansprechen für NSCLC vorhersagen, während humane Xenografts für das NSCLC und Ovarialkarzinom prädiktiv waren. In den Analysen des NCI war nur ein Teil der getesteten zelllinienabgeleiteten Xenografts mit den Daten der Klinik konsistent [187]. In patientenabgeleiteten Xenografts war die Deckungsgleichheit mit der Klinik deutlich höher. So ist von Fiebig *et al.* als auch von früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt, dass eine bis zu 90%-ige Übereinstimmung mit dem klinischen Ansprechen und eine bis zu 97%-ige Deckung bei der Resistenz erreicht wird [179].

Bis zu Beginn der Etablierung der hier verwendeten Xenografts lagen nur wenige publizierte Studien zu Lungenkarzinom-Modellen vor. Judde *et al.* generierten fünf Xenografts, die er mit einer kombinierten Chemotherapie und Gefitinib behandelte und analysierte die Marker der entsprechenden Signalwege [188]. Perez-Soler etablierte 34 Modelle am ‚MD Anderson Cancer Center‘ und untersuchte das Ansprechen auf Paclitaxel [189]. SCLC-Xenografts wurden von Poupon *et al.* auf das Ansprechen auf Zytostatika und multimedikamentenresistenzassoziierten Proteinen hin untersucht [190]. Die bis dahin etablierten Xenograftpanel bestanden nur aus einer geringen Anzahl von Modellen, die teilweise nur gegenüber einem Medikament getestet wurden. Somit war eine größere Anzahl an Modellen und ihre intensive Charakterisierung gegenüber verschiedenen Zytostatika sowie zielgerichteten Therapien und die Analyse von in der Diskussion befindlichen Markern wünschenswert.

1.9 Zielsetzung

Innerhalb der Krebserkrankungen bleibt das Lungenkarzinom die führende Todesursache. Eine individuelle Selektion der Patienten mit Hilfe von Biomarkern zur Verbesserung der Therapie und damit der Prognose ist wünschenswert. Patientenabgeleitete Xenografts auf der Maus als präklinische Modelle können helfen, derartige Marker zu identifizieren, da sie klinische Patientenkollektive modellieren und dies mit dem Vorteil der standardisierten Untersuchungsbedingungen verbinden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine vergleichende Charakterisierung von 25 patientenabgeleiteten Xenograftmodellen des Lungenkarzinoms durchgeführt.

Zusammenfassend sollten folgende Schwerpunkte untersucht werden:

1. Vergleichbarkeit der patientenabgeleiteten Xenografts mit ihren Patiententumoren
2. Validierung von Markern für das Therapieansprechen
3. Möglichkeiten zur Therapieoptimierung

1. Zunächst sollten die neu etablierten Xenografts im Vergleich zum jeweiligen Patiententumor charakterisiert werden. Marker der Proliferation und diagnostische Marker sollten vergleichend untersucht werden, um zu prüfen inwieweit die individuellen Charakteristika der Patiententumore in den Xenografts erhalten bleiben. Um eine möglichst vollständige Beschreibung der Modelle zu erhalten, wurde auf mRNA-Ebene eine vergleichende Genexpressionsanalyse der Patiententumoren und der Xenografts durchgeführt.

2. Die klassische Chemotherapie stellt eine wichtige Behandlungsoption des Lungenkarzinoms dar und vielfach angeführte, aber kontrovers diskutierte Resistenzmarker liegen vor. Die patientenabgeleiteten Xenografts sollten als Modelle zur Charakterisierung und Validierung der Resistenzmarker der klassischen Chemotherapie herangezogen werden. Dazu wurden Markerprofile auf mRNA- und Proteinebene erstellt, die mit dem Ansprechen auf die klassische Therapie korreliert wurden.

Des Weiteren sollten auch Marker analysiert werden, die im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die neueren zielgerichteten anti-EGFR-Therapien stehen. Dazu wurde der EGFR als das Zielmolekül der anti-EGFR-Therapien untersucht sowie weitere ERBB-Rezeptoren. Außerdem wurde die Aktivierung des EGFR durch seine Liganden und das komplexe EGFR-Signalnetzwerk analysiert. Diese Ergebnisse sollten mit dem Ansprechen auf die zielgerichteten Therapien korreliert werden.

3. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Therapieoptimierung. Mit Hilfe von Genexpressionsstudien sollten Medikamente bzw. Kombinationen identifiziert werden, die in Xenografts mit einer Resistenz gegenüber Erlotinib zu einer erhöhten Ansprechrate und Resistenzüberwindung führen sollten.

Für die Erreichung der Zielsetzung wurden im Einzelnen folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Vergleichbarkeit der patientenabgeleiteten Xenografts mit ihren Patiententumoren bezüglich der

- Histologie
- Proliferation
- Expression epithelialer und mesenchymaler Proteine
- Genexpression
- Mutations- und SNP-Analysen lungenkrebsassoziiierter Gene

2. Validierung von Markern für das Therapieansprechen

- Erstellung von mRNA- und Proteinexpressionsprofilen für Marker der Chemotherapie
- Korrelation der mRNA- und Proteinexpression mit dem Ansprechen
- Kurzzeitbehandlungen
- SNP-Analysen resistenzassoziiierter Marker

- Erstellung von mRNA- und Proteinexpressionsprofilen der ERBB-Rezeptoren, Liganden und EGFR-Signalwege
- Korrelation der mRNA- und Proteinexpression mit dem Ansprechen
- Kurzzeitbehandlungen

3. Möglichkeiten zur Therapieoptimierung

- Genexpressionsstudien zur Therapieoptimierung
- Umsetzung der Genexpressionsanalysen in *in vivo* Studien

Die allgemeine Charakterisierung der Xenografts sollte zu einer Beurteilung der Relevanz der patientenabgeleiteten Xenografts als präklinisches Modell führen. Zusätzlich wurden die patientenabgeleiteten Xenografts als Modell zur Identifizierung, Charakterisierung und Validierung von potentiellen prädiktiven Markern (für das Therapieansprechen) eingesetzt.

Die umfangreichen präklinischen Untersuchungen an einer ausgewählten Tumorentität mit Hilfe von die klinische Heterogenität repräsentierenden Proben und unter standardisierten Bedingungen sollten zur Erstellung von Hypothesen mit Relevanz für spätere klinische Studien (prospektiv oder auch retrospektiv) führen.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 *In vivo* Versuche

2.1.1 Etablierung der Xenografts und Probengewinnung

Innerhalb einer klinischen Kooperation der Evangelischen Lungenklinik Berlin Buch wurden 102 Patientenproben des nicht-kleinzelligen und ein kleinzelliges Lungenkarzinoms bereitgestellt. Zeitnah nach der Entnahme erfolgte die subkutane Transplantation in NMRI:nu/nu Mäuse und die Konservierung von tumorigem Patientengewebe als auch Normalgewebe. Innerhalb eines Zeitraumes von 2 ½ Jahren konnten 25 Xenografts erfolgreich etabliert werden, die die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten.

Zur Probengewinnung wurden 4x4 mm große Tumorstücke subkutan in NMRI:nu/nu Mäuse transplantiert und bis zu einer Größe von max. 12x12 mm wachsen gelassen. Die Tumore wurden entnommen, schock gefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Alle Tierversuche wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz sowie den UKCCCR „Guidelines for the Welfare of animals in Experimental Neoplasia“ durchgeführt.

Die klinischen und in Kooperation erhobenen Daten der Modelle standen für die weitere Auswertung zur Verfügung. Das Geschlechterverhältnis in dem Set von Xenografts war ausgeglichen. Die Histologie der NSCLC enthielt 52% Plattenepithel-, 24% Adeno-, 12% pleomorphe, ein großzelliges und ein dedifferenziertes Karzinom. Unter den 25 Modellen wurde auch ein kleinzelliges Lungenkarzinom (7530) diagnostiziert. Die Mehrzahl der Patienten wiesen ein Tumorstadium 2 und 3 auf und bis auf eine Ausnahme (7298) hatten alle Patienten einen langjährigen Zigarettenkonsum. Eine neoadjuvante Therapie erhielten vier Patienten (7126, 7177, 7406, 7530). Bereits 13 Patienten waren im Mai 2011 verstorben.

Innerhalb einer Kooperation mit R. Soong wurde der Mutationsstatus im Exon 18-21 des EGFR, im Tumorsuppressor TP53 und PI3KCA untersucht. Mutationen im EGFR wurden detektiert. Es waren jedoch keine aus der Literatur bekannten sensitivierenden Mutationen, die im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren diskutiert werden. In 13 Modellen wurde eine veränderte DNA-Sequenz in TP53 detektiert und zwei Modelle wiesen im Exon 9 von PI3KCA eine Mutation auf. Eine Übersicht der zur Verfügung stehenden Daten ist in Tab. 2 zusammengefasst.

Modell	Klinische Daten							Mutationen		
	Alter	Sex	Histologie	Tumorstadium	Raucherstatus	Todesdatum	Vorbehandlung	EGFR	TP53	PI3KCA
7064	69	w	PLC	pT3 pN0 M0 G3 R0	seit 9 a NR	05.09.2004		WT	162B:del13bp (>STOP)	WT
7126	42	w	SCC	pT3 pN0 cM0 G2 R0	R	30.07.2005	Cisplatin/ Vinorelbin	WT	WT	WT
7166	70	m	LCC	pT2 pN2 cM0 G3 R0	seit 11 a NR			WT	WT	WT
7177	42	m	SCC	ypT2 ypN2 cM0 G3 R0	R	15.11.2007	5 Zyklen Carboplatin/ Paclitaxel	WT	M246V	WT
7187	38	w	PLC	pT3 pN0 cM0 G3 R0	R	15.09.2005		WT	WT	WT
7198	60	w	ADC	pT2 pN0 cM0 G3 R0	R			IVS18+19, IVS18+73	WT	WT
7298	73	m	SCC	pT2 pN2 cM0 G3 R1	NR	15.08.2006		WT	Y234C	WT
7336	79	m	PLC	pT2 pN1 cM0 G3 R1	R	28.03.2006		Q787Q, A836R	P190L	WT
7343	52	w	SCC	pT3 pN0 cM0 G3 R1	R			WT	WT	MUT
7387	53	m	ADC	TxN2pM1	R			WT	WT	WT
7406	53	w	ADC	ypT2 ypN2 cM0 G3 R0	R	15.11.2005	2 Zyklen Cisplatin/ Vinorelbin	WT	P278T	WT
7414	64	m	SCC	pT2 pN0 cM0 G3 R0	R			WT	WT	WT
7433	72	m	SCC	pT3 pN2 cM0 G3 R0	R	30.01.2006		R836CR	258 E>STOP	WT
7462	55	w	ADC	pT3 pN0 cM0 G3 Rx	R			WT	G245V	WT
7466	57	m	ADC	pT2 pN1 cM0 G3 R0	R			WT	R196P	WT
7506	70	w	SCC	pT2 pN1 pM1 G3 R0	R			WT	190 del1bp	WT
7530	69	m	SCLC	ypT2 ypN1 cM0 G3 R0	seit 5 a NR	15.12.2008	2 Zyklen Carboplatin/ Etoposid	WT	WT	WT
7558	74	m	SCC	pT4 pN1 cM0 G3 R0	R			Q787Q	I232F	WT
7612	51	m	SCC	pT3 pN0 cM0 G3 R0	R			WT	WT	WT
7668	66	w	DDC	pT2 pN0 cM1 G4 R0	R	29.07.2006		WT	WT	WT
7700	44	w	ADC	ypT1 ypN2 cM0 G2 R0	R	15.11.2006		WT	H193Y	WT
7747	71	w	SCC	pT3 pN0 cM0 G2 R0	R			WT	WT	WT
7766	71	m	SCC	pT2 pN2 cM0 G3 R0	seit 20 a NR	25.02.2009		Q787Q	M246K	WT
7860	71	m	SCC	pT1 pN0 cM0 G3 R0	seit 20 a NR			WT	V157F	WT
7913	58	w	SCC	pT2 pN2 cM0 G2 R1	R	08.11.2008		WT	WT	MUT

Tab. 2: **Vorhandene klinische und experimentell erhobene Daten zu den 25 patientenabgeleiteten Xenografts.** Sex: m-männlicher, w-weiblicher Patient; Tumorstadium: T-Tumorausdehnung, N-Nodalstatus, M-Metastasen, G-Grading, R-Resektion; Raucherstatus R-Raucher, NR-Nichtraucher, a-Jahre; Mutationen: WT-Wildtyp

2.1.2 Pharmakologische Versuche

2.1.2.1 Testung der Sensitivität

Ein Sensitivitätsprofil der Xenografts gegenüber vier Zytostatika, zwei EGFR-Inhibitoren und einem VEGF-Inhibitor wurde erstellt. Hierfür wurden die Xenografftmodelle in Gruppen mit jeweils sechs Tieren eingeteilt und mit den entsprechenden Medikamenten nach folgendem Schema behandelt:

Medikament	Inokulation	Dosis (mg/kg/Inj.)	Behandlungszeitraum
Etoposid	i.p.	10	qd1-5
Carboplatin	i.p.	75	q7dx2
Gemcitabin	i.p.	80	q4dx3
Paclitaxel	i.v.	12,5	qd1-5
Erlotinib	p.o.	50	qd1-5x2
Cetuximab	i.p.	50	qd1-5
Bevacizumab	i.p.	5	q4dx4

Tab. 3: **Übersicht der Medikamente zur Testung der Sensitivität** mit Dosis, Applikation und Behandlungszeitraum. Inokulation: i.p.-intraperitoneal, i.v.-intravenös, p.o.-per os; Behandlungszeitraum: qadxb - alle a Tage, für b Zyklen

Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden das Körpergewicht der Tiere und das Tumolvolumen dokumentiert.

Die Beurteilung der Sensitivität wurde durch das Verhältnis des relativen Tumolvolumens der behandelten Gruppe (T) zu der Kontrollgruppe (C) als T/C-Wert [%] dargestellt. Dabei wurden Tumore mit einem $T/C \leq 30\%$ als sensitiv und Tumore mit einem $T/C > 30\%$ als resistent beurteilt. Bei den anschließenden statistischen Analysen wurde mit Hilfe des Tumolvolumens die Signifikanz des Ansprechens bewertet.

2.1.2.2 Kurzzeitbehandlungen zur Analyse der Expression

Mit ausgewählten Fragestellungen sollte die Expression eines Proteins oder Gens nach einer Behandlung detaillierter in einem Experiment analysiert werden. Dazu wurden Versuchsgruppen mit je drei Tieren über drei Tage mit dem Medikament behandelt bzw. alternativ wurde eine einmalige Behandlung durchgeführt und 24 h später wurde der Tumor konserviert. Für die Kurzzeitbehandlung wurden die Medikamente Erlotinib, Cetuximab oder Paclitaxel, Carboplatin, Etoposid, Gemcitabin und Bevacizumab verwendet und in der üblichen Dosis verabreicht.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Die Isolation der Gesamt-DNA wurde mit einem käuflich erworbenem Kit „DNeasy Blood and Tissue Kit“ (Qiagen) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Zelllyse wurde die DNA an eine Silicamatrix gebunden und nach einigen Waschschrinen zur Entfernung von Proteinen mit TE-Puffer eluiert. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch mit dem NanoDrop bestimmt.

2.2.2 Mutationsanalysen

Die Mutationsanalysen der DNA wurden mit Hilfe der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) bzw. der Pyrosequenzierung durchgeführt. Die Methode der RFLP wurde bei der Untersuchung der Gene *TP53*, *GSTP1*, *MDM2* und *EGFR* angewandt. Die Gene *KRAS12*, *KRAS13*, *KRAS61*, *ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *XRCC1* und *XRCC3* wurden mit Hilfe der Pyrosequenzierung analysiert.

2.2.2.1 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

Zunächst wurde die Zielsequenz mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Der Reaktionsansatz enthielt: 1x Reaktionspuffer, 2 mM MgCl₂, je 0,4 mM dNTPs, 0,2 mM je Primer und eine Einheit Taq platinum, sowie 100 ng DNA. Die PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 5 min 94 °C; 35-40 Zyklen: 30 s 94 °C, 30 s 54-60 °C, 30 s 72 °C; 7 min 72 °C. Zur Kontrolle der PCR wurde ein 2%iges Agarosegel angefertigt und anschließend der 2-stündige Verdau mit dem entsprechenden Enzym (Tab. 4) durchgeführt. Die DNA wurde über ein 10%iges Acrylamidgel aufgetrennt und das spezifische Bandenmuster der verdauten DNA-Fragmente wurde dokumentiert.

Gen	Primer sens (5'-3')	Primer antisens (5'-3')	Enzym
<i>TP53</i>	TCCCCCTTGCGTCCCAA	CGTGCAAGTCACAGACTT	<i>BstUI</i>
<i>MDM2</i>	GAGTTCAGGGTAAAGGYCAC	TCAAGAGAGGAAAAGCTGAGTC	<i>Mspal</i>
<i>EGFR</i>	TGCTGTGGACCCACTCTGTCT	CAACGCAAGGGGATTAAGA	<i>BsRDI</i>
<i>GSTP1</i>	ACCCAGGGCTCATGGGTAA	GCTGAACAAAGAAAGGGGCT	<i>BsmAI</i>

Tab. 4: Übersicht der Gene, Primer und Enzyme der RFLP.

2.2.2.2 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung wurde mit Hilfe des PyroMark™ Q96 ID untersucht und entsprechend den Protokollen und Kits (PyroMark Gold Q96 Reagenzien, PyroMark KRAS Kit) des Herstellers ausgeführt. In Kürze: die Zielsequenz wurde mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe eines

biotinylierten Matrizenstranges und der PyroMark™ Q96 Vacuum Prep Workstation isoliert. Der Einbau der komplementären Nukleotide in den Gegenstrang wurde mit Hilfe der Luciferase erfasst. Die Analyse wurde mit dem PyroMark™ Q96 ID und der dazugehörigen Software durchgeführt.

Gen	Primer sens (5'-3')	Primer antisens (5'-3')
ERCC1	CCTGTGGTTATCAAGGGTCA	AGCACATAGTCGGGAATTACG
ERCC 2	TGCAGCAGCTAGAATCAGA	CCTGCGATTAAAGGATGTGGA
ERCC 5	TCAAGCCTGAAAAGAAAGAGG	TTTCGCAGCTGTTCTCCTTTGTA
XRCC1	CATCGTGCGTAAGGAGTGG	ATTGCCAGCAGGATAAG
XRCC 3	GGCATCTGCAGTCCCTGG	GCTTCCGCATCCTGGCTAAAA

Tab. 5: Übersicht der Gene und Primer der Pyrosequenzierung.

2.2.3 RNA-Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Tumorproben wurde mit dem kommerziellen RNeasy Mini Kit (Qiagen) entsprechend dem beigefügten Protokoll durchgeführt.

Tumorstücke einer Größe von 4x4 mm wurden lysiert und die gelöste RNA an eine Silicamatrix gebunden und nach speziellen Waschschritten zur Entfernung von Proteinresten mit TE-Puffer eluiert.

Die RNA-Konzentrationsmessung wurde mit dem NanoDrop bei 260 nm durchgeführt.

2.2.4 cDNA Synthese

Die aus der RNA-Isolation gewonnene Gesamt-RNA diente als Grundlage für die cDNA-Synthese, für die ein kommerzieller ReverseTranskriptase-Kit (Applied Biosystems) verwendet wurde. Der 10 µl Reaktionsmix enthielt: 1x RT-Puffer, je 500 µM dNTP's, 5,5 mM MgCl₂, 2,5 µM Random Hexamere, 0,4 U/µl RNase Inhibitor und 1,25 U/µl MultiScribe-Reverse-Transkriptase. In einem Ansatz wurden 200 ng RNA eingesetzt. Die RT-Reaktion wurde bei folgenden Konditionen durchgeführt: 25 °C/ 10 min, 48 °C/ 30 min und 95 °C/ 5 min. Die fertigen Reaktionsansätze wurden gekühlt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5 RealTime PCR

Die Expression einzelner Gene wurde in der cDNA mit Hilfe der Real-Time-PCR untersucht. Die PCR wurde auf dem StepOnePlus™ System durchgeführt und für einen Ansatz wurden 200 ng cDNA, der Taqman Universal Master Mix sowie vorgefertigte, spezifische Primer-Sonden-Paare eingesetzt. Das Temperatur-Zeit-Profil bestand aus einer initialen Denaturierung (10 min) bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen einer Denaturierung für 15 s bei 95 °C und einem ‚Annealing/ Extension‘-Schritt für 1 min bei 60 °C.

Für jede Probe wurde sowohl die gesuchte cDNA als auch die des Referenzgens β -Aktin (ACTB) in mindestens zwei Replikaten gemessen. Im Anschluss an die PCR wurde der Anstieg des Fluoreszenzsignals als Maß für die entstehende Amplifikatmenge der Zyklenzahl gegenübergestellt. Als Maß zur Quantifizierung der Ausgangsmenge diente der C_T -Wert ('cycle threshold'). Zum Vergleich der Genexpression in unterschiedlichen cDNA-Proben wurde eine relative Quantifizierungsstrategie (ΔC_T) gewählt. Dabei wurde in jeder Probe die Expression des zu untersuchenden Gens auf das Referenzgen normalisiert. Es ist zu beachten, dass je höher der ΔC_T -Wert, desto weniger cDNA war in der Probe vorhanden.

Alle Primer-Sonden-Lösungen wurden von Applied Biosystems (Darmstadt) erworben.

2.2.6 Microarrayanalysen

Innerhalb einer früheren Kooperation wurde ein Genexpressionsprofil der 25 Tumormodelle mit Hilfe der Genechips[®] HGU133 Plus2.0 erstellt. Die generierten ‚probe cell intensity files‘ (Cel-Dateien) wurden für die weiteren Analysen verwendet. Der eingesetzte Genechip[®] HGU133 Plus2.0 enthält 54.675 Probesets und umfasst ca. 47.400 Transkripte bzw. 38.500 gut charakterisierte humane Gene basierend auf den GenBank[®]-, dbEST- und RefSeq-Datenbanken. Dabei wurden jedem Gen meist mehrere Probesets zugeordnet. Zur Verfügung standen 131 Cel-Dateien von 25 Tumormodellen, die jeweils durch 2-5 unbehandelte Tumore repräsentiert wurden. Die nachfolgend beschriebenen Genexpressionsanalysen wurden mit der Software GeneSpring GX11.0.2 von Agilent-Technologies[©] durchgeführt. Zuerst wurden die Cel-Dateien mit dem MAS5.0-Algorithmus von Affymetrix[®] normalisiert, wobei die Standardeinstellungen von Genespring verwendet wurden.

Für den Vergleich der Primärtumore mit den abgeleiteten Xenografts wurden die Cel-Dateien gruppiert und anschließend mit Hilfe des Mann-Whitney Tests und der Benjamini-Hochberg Methode gefiltert. Letztere kontrolliert die Falsch-Positiv-Rate, indem ein geeigneter Kompromiss zwischen zu vielen falsch positiven und zu wenig signifikanten Ergebnissen eingegangen wird. Die verwendeten Filterkriterien waren ein FoldChange von $> |1,5|$ und eine Signifikanzschwelle von $p < 0,05$. Die differenziell exprimierten Gene wurden einer ‚Gene Ontology‘ (GO)-Analyse zugeführt ($p < 0,05$). Diese verknüpft die Gene mit funktionellen Kategorien (GO-Terms) und berechnet anschließend, ob im Vergleich zur Gesamtheit der Gene einzelne GO-Termini signifikant überrepräsentiert waren.

Die anschließende Cluster-Analyse sollte ermöglichen Proben, aufgrund eines ähnlichen Genexpressionsverhaltens, in Gruppen einzuteilen und Muster in der Expression zu erkennen. Das

unüberwachte hierarchische Clustering ermittelte die Ähnlichkeitsabstände mit der Berechnung ‚Complete Euclidean‘.

Bei der Identifizierung differenziell exprimierter Gene zwischen Respondern und Non-Respondern wurde der ‚Detection call‘ genutzt, um die Probesets entsprechend ihrer ‚present‘ (= detektierbar), ‚marginal‘ (= grenzwertig) oder ‚absent‘ (= nicht detektierbar) Markierung zu filtern. Dabei war die Bedingung, dass in mindestens 1 der 25 Modelle das Probeset ‚present‘ oder ‚marginal‘ sein sollte und gleichzeitig in diesem Modell 75% der zur Verfügung stehenden Cel-Dateien das Probeset exprimieren. Unter diesen Bedingungen sollten auch die Gene in der anschließenden Analyse berücksichtigt werden, die in nur einem Modell differenziell exprimiert wurden. Mit der generierten Liste von Probesets wurden die statistischen Analysen durchgeführt. Anwendung fanden dabei der Mann-Whitney Test mit einem p-Wert < 0,005 und die Benjamini-Hochberg Methode. Es wurden nur Probesets akzeptiert, die mindestens einen FoldChange von $|1,5|$ zwischen Respondern und Non-Respondern aufwiesen.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Zu Tumorproben einer Größe 3x3x3 mm wurde Lysispuffer von Cell Signaling® oder RIPA-Lysispuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren hinzugefügt. Die Tumore wurden mit einem Pistill homogenisiert, eingefroren und bei 4 °C über Nacht im Lysispuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für 15-60 min bei 4000-40000 g, die Abnahme des Überstandes und die Lagerung bei -80 °C.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BioRad Protein Assay nach der Bradford-Methode durchgeführt und die Konzentrationen wurden mit Hilfe einer BSA-Standardreihe berechnet.

RIPA Lysispuffer	150 mM NaCl 20 mM Tris 1% Triton X-100 0,5% Sodiumdesoxycholate 0,5% SDS 2 mM EDTA 2,5 mM Sodumpyrophosphate 1 mM β -Glycerophosphat pH 7,7
------------------	---

2.3.2 Immunhistochemie/Immunfluoreszenz

2.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit Hilfe des Kryostaten wurden 3- 4 µm dünne Schnitte angefertigt, deren Lagerung bei -20 °C stattfand. Das Gewebe wurde 5 min in Ethanol fixiert und mit Hämatoxylin angefärbt. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Inkubation in Eosin. Mit 70%igem Alkohol wurde der Schnitt differenziert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Den Abschluss bildete eine Einbettung in Kanadabalsam.

2.3.2.2 Einfache Immunhistologie bzw. -fluoreszenz

3- 4 µm dünne Gefrierschnitte wurden 15 min mit Paraform- bzw. Glutaraldehyd fixiert und 20-60 min bei Raumtemperatur (Rt) mit Ziegenserum bzw. NAG-Medium blockiert. Anschließend wurden der primäre und sekundäre HRP- bzw. Cy-gekoppelte Antikörper für jeweils 1-2 h aufgetragen. Bei der immunhistologischen Färbung wurde abschließend mit der AEC-Chromogenlösung inkubiert und die Kerne gegengefärbt. Zwischen jedem Blockierungs- oder Inkubationsschritt wurden die Schnitte 5 min im PBS- Pufferbad gespült.

Die Auswertung der immunhistologischen Färbungen erfolgte indem drei repräsentative Areale der Schnitte ausgewählt wurden und die Anzahl der positiven Zellen ausgezählt oder die Intensität und die Flächenverteilung der Färbung beurteilt wurden.

Paraformaldehydlösung	4% Paraformaldehyd 10% PBS Lösung mit 1 N Natronlauge klären pH 7,3, filtrieren
Blocklösung	20% Ziegenserum in PBS
NAG-Medium	1% NaN ₃ 500 mM Hepes-Puffer 0,25% Gelatine 0,2% Rinderserumalbumin in Natrium-Kalium-Hepes-Puffer
Natrium-Kalium-Hepes Puffer	138 mM NaCl 29,6 mM KCl 10 mM Hepes-Puffer
Einbettmedium	50% PBS 50% Glycerol 0,2 µg/mL DAPI

2.3.2.3 Doppelfärbung Immunfluoreszenz

Eine gleichzeitige Anfärbung von zwei Proteinen sollte mit einer Doppelfärbung erreicht werden. Im Anschluss an den ersten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wurden die Schnitte erneut mit Ziegen Serum blockiert. Der zweite Primär- und Sekundärantikörper wurde für jeweils 1 h inkubiert, bevor die Kerne mit DAPI gegengefärbt und die Schnitte eingedeckelt wurden.

2.3.2.4 Biotinylierte Primärantikörper aus der Maus

Unspezifische Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers auf murinem Gewebe sind häufig, wenn der Primärantikörper aus der Maus stammt und auf murinen Gewebeschnitten inkubiert wird. Um dies zu vermeiden, wurde der Primärantikörper mit dem „Animal Research KIT“ (DAKO) biotinyliert. Nachfolgend konnte auf den Gebrauch des Anti-Maus Sekundärantikörpers verzichtet werden. Die Anwendung des Kits erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.3.3 ELISA

Vorversuche

Mit Hilfe der Recovery-Versuche sollte sichergestellt werden, dass der gewählte Verdünnungspuffer für das jeweilige Assay geeignet war. In Proben mit einer bekannten Konzentration wurde das Zielmolekül hinzugefügt. Bei Recovery-Werten zwischen 80% und 95% wurde die Methode als validiert angesehen.

Des Weiteren erfolgte die Testung unterschiedlicher Konzentrationen der ‚Capture‘-, Detektions- und sekundären Antikörper sowie Blockierungspuffer und deren Inkubationszeiten.

2.3.3.1 EGF-ELISA

96-Well-Platten wurden mit 4 µg/ml des ‚Capture‘-Antikörpers über Nacht beschichtet. Unspezifische Bindungen wurden mit 300 µl Blockierungspuffer für mindestens 1 h blockiert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde auf 2 mg Gesamtprotein/ml (mgGp/ml) eingestellt und 100 µl pro Well, parallel mit den Standards aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Detektionsantikörper für 2 h und der sekundäre Antikörper für 1 h inkubiert. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurde die Platte mit PBST gewaschen. Nach der Zugabe des Substrates für 30 min wurde die Absorption bei 490 nm gemessen.

Mit Hilfe der Verdünnungsreihe wurde eine Eichgerade nach der 4-Parameter-Gleichung angefertigt. Die Berechnung erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Dabei wurden Absorptionswerte, die unterhalb des ‚CutOff‘-Wertes lagen, als negativ bewertet.

() ‚CutOff‘ = μ Nullwerte + $3 \cdot \sigma$ (Nullwerte) μ = Mittelwert, σ = Standardabweichung

Blockpuffer für EGF-ELISA	1% BSA 5% Sucrose in PBS
Verdünnungspuffer für EGF-ELISA	0,1% BSA 0,05% Tween20 in TBS

2.3.3.2 AREG, TGFA, EREG, EGFR und VEGFA ELISA

Für diese Messungen wurden käufliche Kits verwendet.

Kit	Nr.	Hersteller
DuoSet ELISA, human AREG	DY262	R&D Systems
DuoSet ELISA, human TGFA	DY239	R&D Systems
DuoSet ELISA, human EGFR	DY231	R&D Systems
ELISA for Epiregulin	E91945Hu	USCN Life Science
VEGFA ELISA	900-K10	Preprotech

Tab. 6: Übersicht der verwendeten käuflichen Kits für die ELISA-Analysen.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit dem Lysispuffer auf 5 $\mu\text{g}_{\text{Gp}}/\text{ml}$ eingestellt. Im VEGFA ELISA wurden die Proben unverdünnt eingesetzt. Für das EREG-Assay wurden die Proben mit dem Diluent 1:2,5 verdünnt, für die AREG- und TGFA-Assays 1:5 und für das EGFR-Assay 1:100 verdünnt. Diese Verdünnungen ergaben sich aus Vorversuchen, die sicherstellten, dass die Messwerte im dynamischen Bereich der vom Hersteller vorgeschlagenen Eichgeraden lagen.

Die Anwendung des Kits wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und ein Korrekturwert bei 540 nm wurde mitgeführt. Die Auswertung wurde analog zu dem EGF ELISA durchgeführt.

2.3.4 Gelelektrophorese und Immunoblot

20-30 μg Gesamtprotein wurden mit Laemmlipuffer versetzt und 2 min im 100 °C heißen Wasserbad denaturiert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese bei 160 V, 200 mA für 1,5-2 h aufgetrennt. Die Proteine wurden mit dem Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (15 V, 0,57 mA) transferiert und zur Kontrolle des Transfers wurde mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Die Membran wurde mit 5%iger Milchlösung für 1 h bei Rt blockiert, bevor der Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert wurde. Nach einem Waschschrift fand eine einstündige Inkubation mit dem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper statt. Die Entwicklung wurde mit Hilfe des ECL Kits durchgeführt. Zur Ladekontrolle wurden die Blots gestrippt und erneut mit β -Aktin markiert.

Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS pH 8,3
Transferpuffer I	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol pH 8,3
Transferpuffer II	25 mM Tris 192 mM Glycin 10% Methanol 0,1% SDS pH 8,3
Ponceau S Lösung	0,1% Ponceau S (w/v) in 5% Essigsäure
Blocklösung	5% Magermilchpulver in TBS-T
TBS-(T)	20 mM Tris 138 mM NaCl pH 7,6 (0,1% Tween 20)

2.3.5 Durchflusszytometrie

Der Tumor wurde nach der Entnahme mit einer Schere zerkleinert. Die Tumorstücke wurden über ein 70 µm Zellsieb gestrichen, um eine homogene Einzelzellsuspension herzustellen. Anschließend wurden unspezifische Bindungen mit 20%igem Ziegen Serum (30 min, Rt) blockiert. Zwischen jedem Inkubationsschritt erfolgte ein Waschschriff mit PBS und eine 5 min Zentrifugation bei 200 g. Der Primärantikörper und der Sekundärantikörper wurden jeweils für 1 h bei 4 °C inkubiert. Eine Isotypkontrolle und eine Probe ohne Primärantikörper wurden ebenfalls mitgeführt, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Abschließend wurden die Proben mit dem FACS Calibur gemessen und der Software QuantiQuest ausgewertet.

2.4 Statistische Analysen

Die Auswertung der pharmakologischen Versuche sowie die Analyse der Korrelationen und Kontingenztabellen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism, Version 5.02 (GraphPad Software, San Diego California, USA). Weitere statistische Analysen wurden mit der Software

SPSS 15.0 (IBM) berechnet. Die statistische Auswertung der Microarrayanalysen war in der Software GeneSpring GX11.0.2 integriert.

2.4.1 Auswertung der pharmakologischen Experimente

Neben der Ermittlung der T/C-Werte wurde auch die Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und der/(n) behandelten Gruppe/(n) überprüft.

Zur Testung der Signifikanz bei mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet, da die Daten aufgrund ihrer biologischen Variabilität keine Gaußsche Verteilung zeigten. Als Post Test wurde der Test von Dunn durchgeführt und das Signifikanzlevel wurde bei 0,05 festgelegt.

Die Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde ermittelt, indem der Mann-Whitney Test angewandt wurde. Dieser ist ein parameterfreier Test zum Vergleich der Mediane zweier Stichproben auf einem ordinalen Skalenniveau. Er setzt voraus, dass die beiden Stichproben derselben Verteilungsform unterliegen, die jedoch nicht der Gaußschen Verteilung folgen muss.

2.4.2 Korrelationsanalysen

Die Korrelationsanalysen sollten einen Zusammenhang zwischen der Expression eines Gens oder Proteins und dem Ansprechen auf ein Medikament aufzeigen. Dazu wurde der T/C-Wert als Maß für das Ansprechen der Gen- oder Proteinexpression gegenübergestellt.

Der Spearman-Korrelationskoeffizient (r) gibt die Stärke des Zusammenhanges bei ordinalen Daten wieder, während der Pearson-Koeffizient bei metrischen Daten angewandt wird. Beide Koeffizienten können Werte zwischen -1 und 1 annehmen, wobei 1 (-1) auf eine starke positive (negative) Relation hinweist und Werte um 0 keine Abhängigkeit der beiden Merkmale anzeigen. Der ermittelte Koeffizient wurde jedoch nur berücksichtigt, wenn das Signifikanzlevel von $p = 0,05$ unterschritten wurde.

2.4.3 Analyse der Kontingenztafeln

Die Ergebnisse der SNP-Experimente wurden mit dem Exakt-Fisher Test ausgewertet, um die Unabhängigkeit in der Kontingenztafel auf Signifikanz zu überprüfen. Dieser Test liefert auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate.

3. ERGEBNISSE

Teile dieser Dissertation wurden im Rahmen von Diplom- und Bachelorarbeiten angefertigt. Die Daten der Liganden wurden von M. Rivera (Arbeitstitel: Liganden des EGF-Rezeptors als mögliche Biomarker beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom) erstellt und die Untersuchungen der ERBB-Rezeptoren wurden von F. Kunze (Arbeitstitel: Expression of ErbB family proteins in patient derived non small cell lung cancer xenografts) durchgeführt. Diese Arbeiten wurden von mir intensiv betreut und maßgeblich beeinflusst.

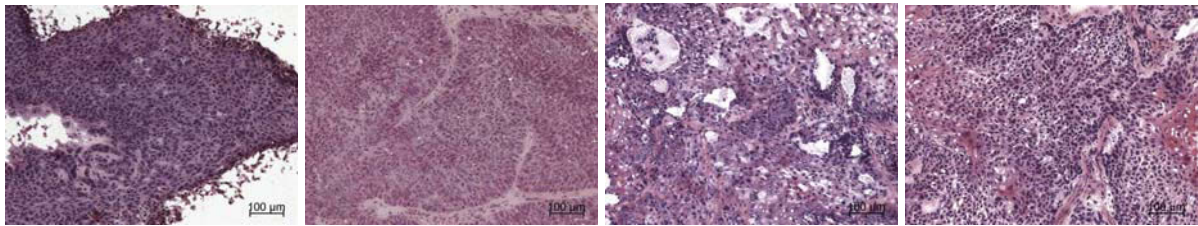
3.1 Allgemeine Charakteristika der Modelle

3.1.1 Histologischer Vergleich der Patiententumore und ihrer abgeleiteten Xenografts

Das Ziel dieser Analyse war eine Überprüfung des Engraftments von ausschließlich humanen Tumorzellen. Die Pathomorphologie des Patienten war bereits aus der Klinik bekannt und sollte mit den etablierten Xenografts verglichen werden. Dazu wurden Gefrierschnitte angefertigt und mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt.

Der Gegenüberstellung der Patiententumore und ihrer korrespondierenden Xenografts zeigte eine Übereinstimmung der Histologie, die auch von einem Pathologen bestätigt wurde. Dabei wurde bei den Adeno- und Plattenepithelkarzinomen jeweils eine der Histologie entsprechende Morphologie im Xenograft vorgefunden. Während die Xenografts vom histologischen Plattenepithel-Subtyp eher in von Mausstroma umgebenden Tumorinseln wuchsen, wurde bei den Adenokarzinomen eine gleichmäßigere Verteilung von Tumorzellen und Mausstroma beobachtet. Innerhalb der ersten Passage(n) ersetzte das murine Stroma das humane Stroma [191]. In den Patiententumoren variierte der Anteil an tumorigenen Zellen noch zwischen 5-85% unterdessen in den Xenografts ein Anstieg auf 70-95% stattfand.

Plattenepithelkarzinome



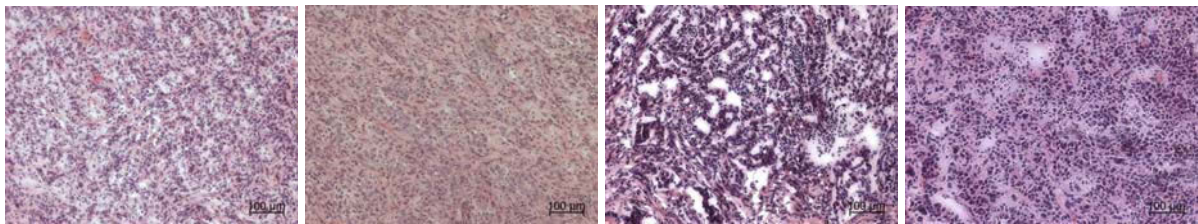
7433 Patient

7433 P2

7612 Patient

7612 P1

Adenokarzinome



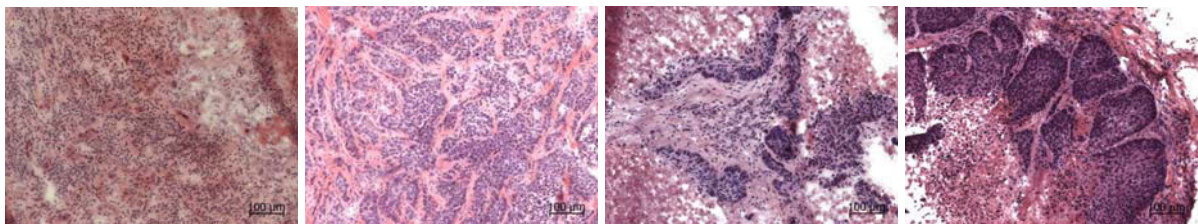
7198 Patient

7198 P4

7462 Patient

7462 P2

Pleomorphe Karzinome



7064 Patient

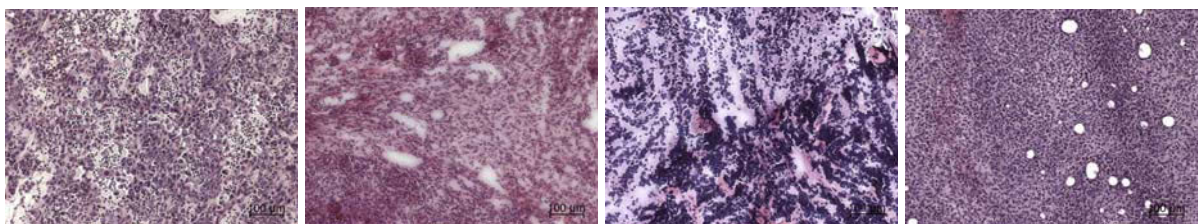
7064 P3

7558 Patient

7558 P5

Dedifferenziertes Karzinom

Kleinzelliges Lungenkarzinom



7668 Patient

7668 P5

7530 Patient

7530 P8

Abb. 8: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Patienten- und ihrer Xenograftumore von repräsentativen Modellen. Vergrößerung: 100x

3.1.2 Wachstumsverhalten der Modelle

Nach der erfolgreichen Etablierung der Modelle sollte das Wachstumsverhalten näher untersucht werden. Die Proliferation der Tumore wurde mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki67 und der Wachstumsgeschwindigkeit (WG) bewertet. Schon während der Etablierung der Xenografts fand eine Dokumentation des Zeitraums statt, den der Tumor benötigt, um erneut das Volumen x zu

erreichen. Danach wurden die Tumore in drei Kategorien eingeteilt. Tumore mit einem langsamen Wachstum benötigten mehr als 35 Tage, während schnell wachsende in weniger als 21 Tagen das Volumen x annahmen. Der Proliferationsmarker Ki67 wurde mittels der Immunhistochemie untersucht. Ki67 ist ausschließlich während des Zellzyklus in der Interphase aktiv und markiert demzufolge Zellen, die sich in der Teilung befinden. Zur Beurteilung wurde jeweils der immunhistologische Schnitt des Xenografts dem des entsprechenden Patienten gegenübergestellt. In dem nur begrenzt zur Verfügung stehenden Patientenmaterial der Modelle 7126, 7166 und 7298 konnten keine Tumore identifiziert werden und folglich fand keine Auswertung von Ki67 statt. Die fünf NSCLC Modelle 7387, 7406, 7466, 7462 und 7612 enthielten ungefähr die gleiche Anzahl Ki67-positiver Zellen (Unterschied < 1,2-fach) in den Tumoren der Patienten und der Xenografts. In 13 NSCLC Modellen fand eine höhere Expression von Ki67 in den Xenografts im Vergleich zu dem Patiententumor statt. Eine 1,3-fache Erhöhung der Ki67-positiven Zellen wurde in der Passage von 7336 beobachtet und eine 5-fache höhere Expression in der Passage des Modells 7187. Im Gegensatz dazu hatten die drei NSCLC 7198, 7668 und 7700 in den Passagentumoren eine geringere Anzahl proliferierender Zellen, mit einem ca. 2-fachen Unterschied. In dem Tumor des Patienten und dem Xenograft des SCLC 7530 wurde ein ähnlicher Anteil Ki67-positiver Zellen nachgewiesen.

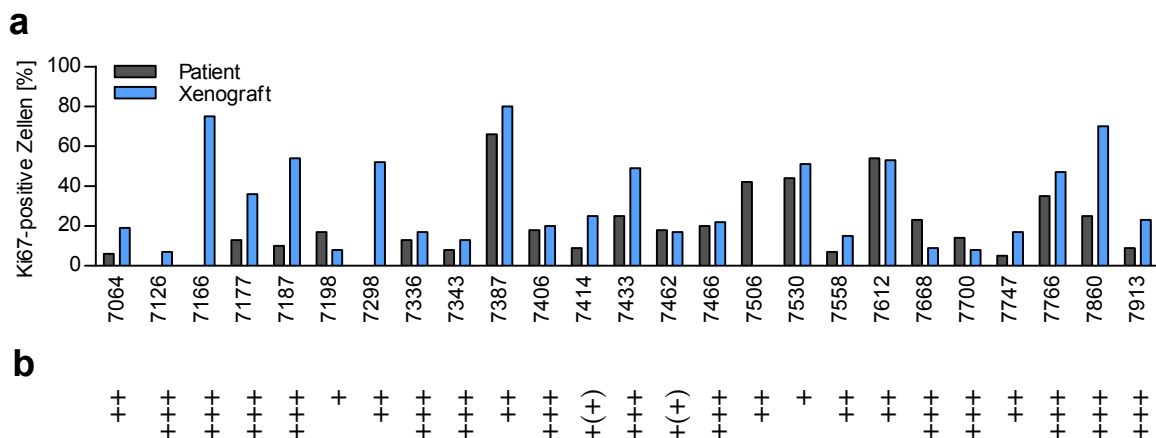
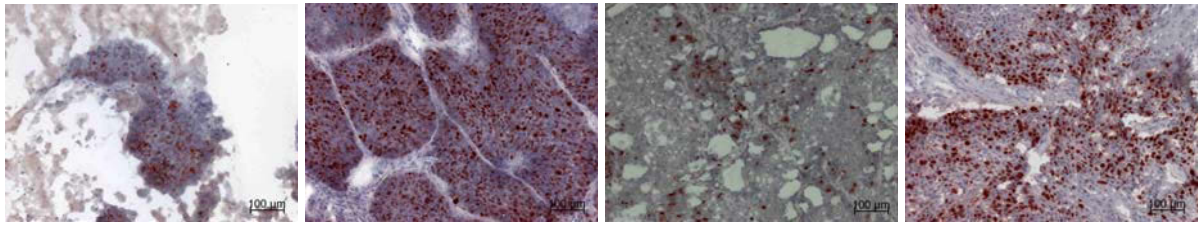


Abb. 9: **Expression von Ki67 und Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit.** (a) In der Grafik ist der mittlere Anteil Ki67-positiver Zellen (%) dargestellt, nachgewiesen in der IHC. (b) Die Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit erfolgte in drei Kategorien: + langsames ($d > 35$), ++ mittleres ($d 22-34$), +++ schnelles Wachstum ($d < 21$).

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore zeigte ein sehr heterogenes Muster. Während das NSCLC 7198 und das SCLC 7530 eher langsam wuchsen, wurde bei der Hälfte der Modelle (14) ein schnelles Wachstum beobachtet.

Die folgenden Abbildungen zeigen repräsentative Ki67-Färbungen.

Plattenepithelkarzinome



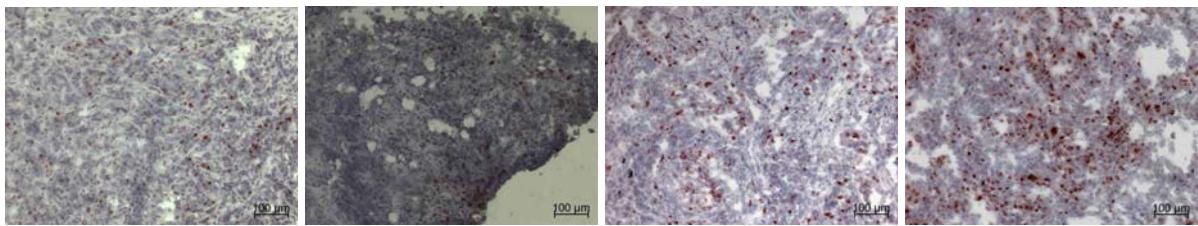
7433 Patient

7433 P2

7612 Patient

7612 P1

Adenokarzinome



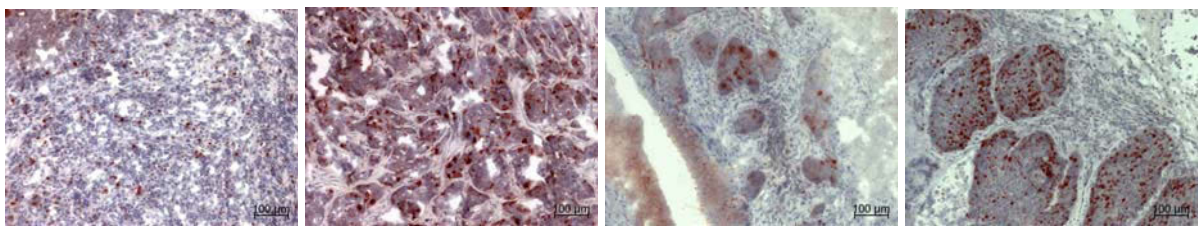
7198 Patient

7198 P4

7462 Patient

7462 P2

Pleomorphe Karzinome



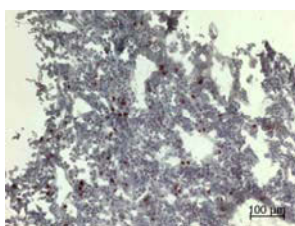
7064 Patient

7064 P3

7558 Patient

7558 P5

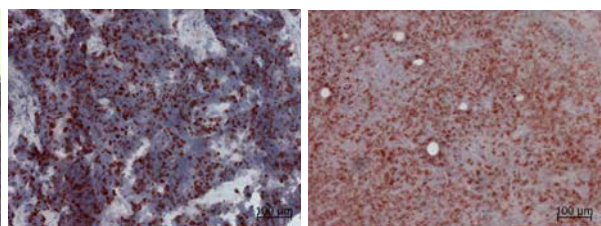
Dedifferenziertes Karzinom



7668 Patient

7668 P4

Kleinzelliges Lungenkarzinom



7530 Patient

7530 P6

Abb. 10: **Ki67-Färbung der Patienten- und ihrer abgeleiteten Xenograftumore** in repräsentativen Modellen. Vergrößerung: 100x

Fazit: Mehrheitlich fand eine Intensivierung der Proliferation statt. Die Wachstumsgeschwindigkeit war nicht an die Ki67-Proteinexpression gebunden.

3.1.3 Analyse der Phänotypen der Patiententumore und der Xenografts

In der weiteren Analyse sollten eventuelle phänotypische Veränderungen, hervorgerufen z.B. durch die Selektion einzelner Tumorzellpopulationen und durch das Wachstum im murinen Milieu, erfasst werden. Das Patientenkollektiv setzte sich ausschließlich aus Karzinomen mit einem epithelialen Ursprung zusammen. Demnach sollten die etablierten Xenografts epitheliale Tumormarker aufweisen. Die beiden Proteine E-Cadherin und EPCAM sind gut untersuchte Zell-Zell-Adhäsionsproteine und wurden als diagnostische Marker für epitheliale Zellen ausgewählt. Die angefertigten Gefrierschnitte der Tumore wurden immunhistologisch auf die Expression der beiden Proteine untersucht. Die mRNA-Expressionsdaten wurde mit Hilfe der Affymetrix® Genechips® erstellt.

3.1.3.1 Analyse von EPCAM

Alle Tumore der Patienten sowie ihre korrespondieren Xenografts exprimierten *EPCAM*-mRNA. In nahezu allen Modellen wurde die mRNA auf einem ähnlichen Expressionsniveau detektiert. Eine Ausnahme stellten der Patienten- und Xenografftumor des Modells 7668 und der Xenografftumor des Modells 7530 dar, die ein schwächeres Expressionslevel zeigten.

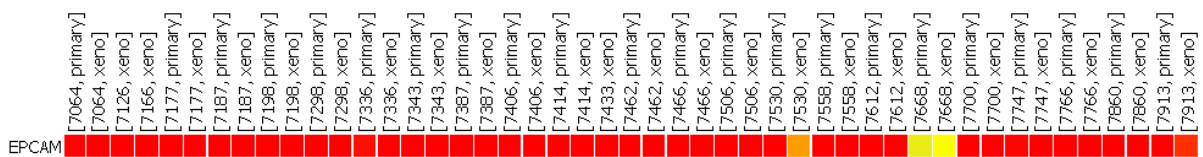
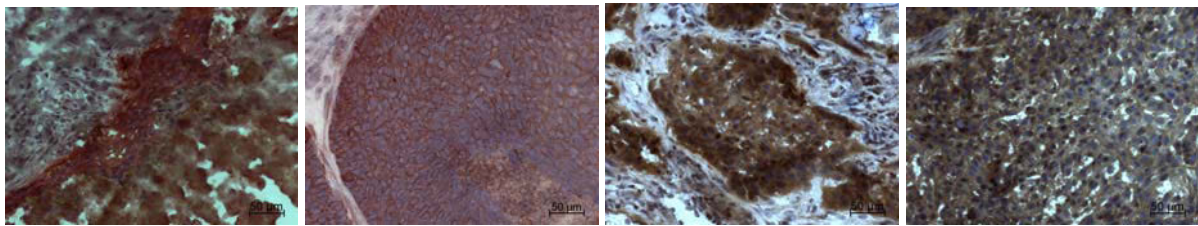


Abb. 11: mRNA-Expression von *EPCAM* in den Patienten- (primary) und Xenografftumoren (xeno). Die mRNA-Expression wurde aus den Analysen der Affymetrix® Genechips® extrahiert. Farbskala: rot-hohes, gelb-mittleres Expressionsniveau

Das EPCAM-Protein konnte in allen NSCLCs und dem SCLC 7530 mit einer mittleren bis starken Intensität detektiert werden. Eine Ausnahme bildete das Modell 7668, das eine sehr geringe Proteinexpression aufwies. Die analysierte Patientenprobe des Modells 7177 enthielt kein Tumorgewebe und demzufolge war eine Bewertung des EPCAM-Proteins nicht möglich. Der EPCAM-Antikörper markierte ausschließlich die humanen Tumorzellen im Patienten als auch im Xenograft. Dadurch ließen sich die Tumorzellen im Patienten leichter identifizieren. Eine positive Markierung des Normalgewebes im Patienten und des murinen Stromas fand nicht statt. Das Färbungsprofil der Zellen war überwiegend membranständig mit zytoplasmatischen Anteilen. Die folgenden Abbildungen zeigen repräsentative Färbungen.

Plattenepithelkarzinome



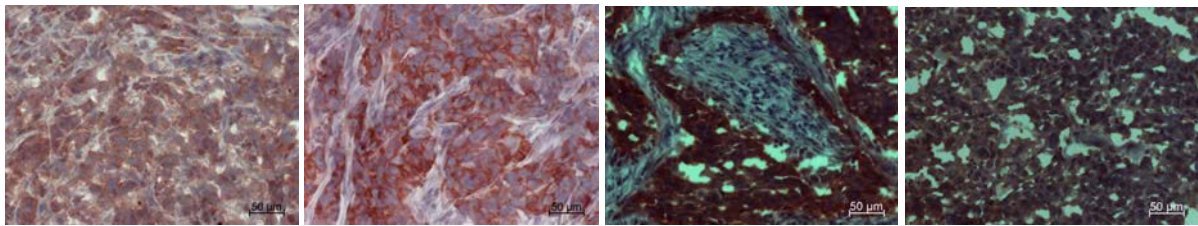
7433 Patient

7433 P2

7612 Patient

7612 P1

Adenokarzinome



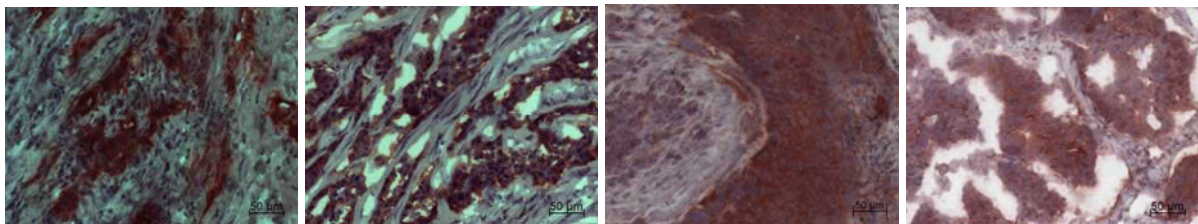
7198 Patient

7198 P4

7462 Patient

7462 P2

Pleomorphe Karzinome



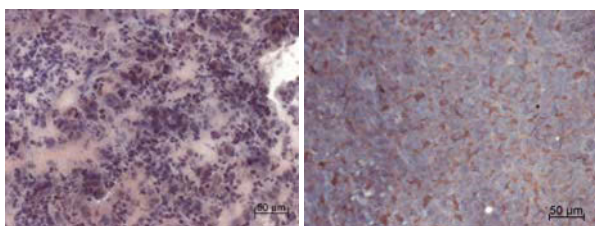
7064 Patient

7064 P3

7558 Patient

7558 P5

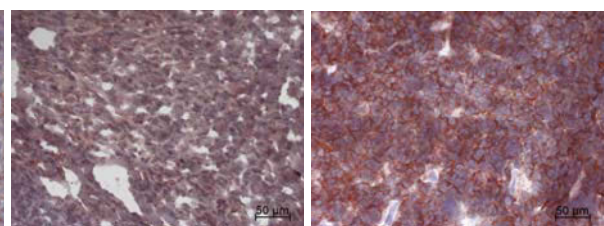
Dedifferenziertes Karzinom



7668 Patient

7668 P4

Kleinzelliges Lungenkarzinom



7530 Patient

7530 P6

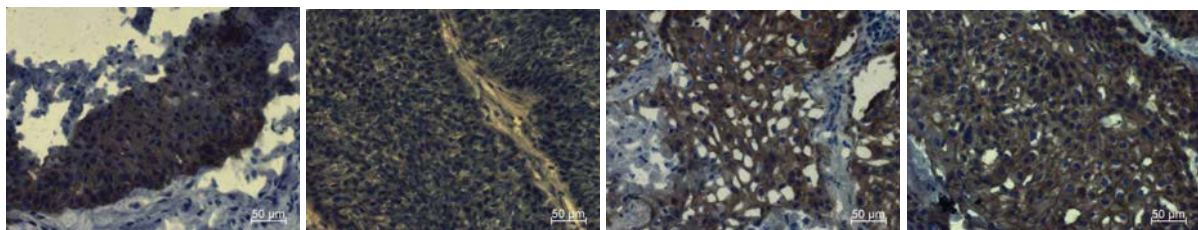
Abb. 12: **EPCAM-Färbung in den Patienten- und ihren abgeleiteten Xenograftumoren** in repräsentativen Modellen. Vergrößerung: 200x

Fazit: In allen Modellen konnte EPCAM auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den anderen Modellen enthielt das Modell 7668 weniger mRNA und Protein und das SCLC 7530 weniger mRNA.

3.1.3.2 Analyse von E-Cadherin

Mit Ausnahme des Modells 7668 konnte E-Cadherin in den weiteren NSCLC Modellen immunhistologisch nachgewiesen werden. Die Patientenprobe des Modells 7166 enthielt kein Tumorgewebe und demzufolge war eine Bewertung des Proteins E-Cadherin nicht möglich. Wie in den Abbildungen ersichtlich, zeigte das Modell 7198 eine geringere Proteinmenge. Die Intensität E-Cadherins in den übrigen Modellen ließ sich von moderat bis stark einstufen. In den Tumoren der Xenografts als auch der Patienten waren im Fall einer positiven Färbung alle humanen Zellen markiert, wodurch die Tumoreale im Patientengewebe besonders gut wahrnehmbar waren. Wie zu erwarten, waren die Färbungen membranständig, teilweise mit einem zytoplasmatischen Anteil. In der IHC des SCLC 7530 wurden einzelne Zellen, die nicht die sonst übliche membranständige Färbung aufwiesen, angefärbt. Da das Färbemuster eher atypisch war, wurde das Modell als negativ beurteilt.

Plattenepithelkarzinome



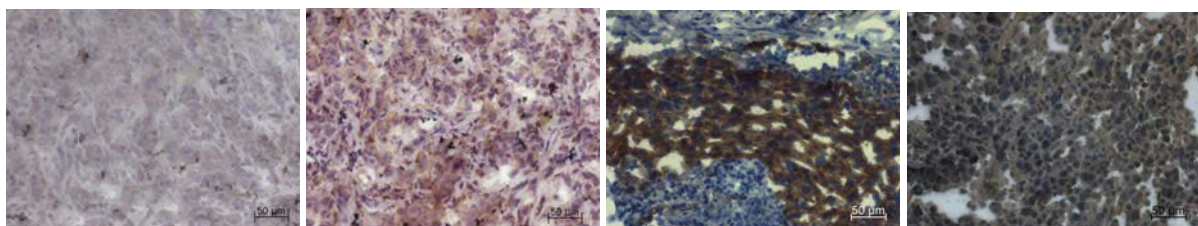
7433 Patient

7433 P2

7612 Patient

7612 P1

Adenokarzinome



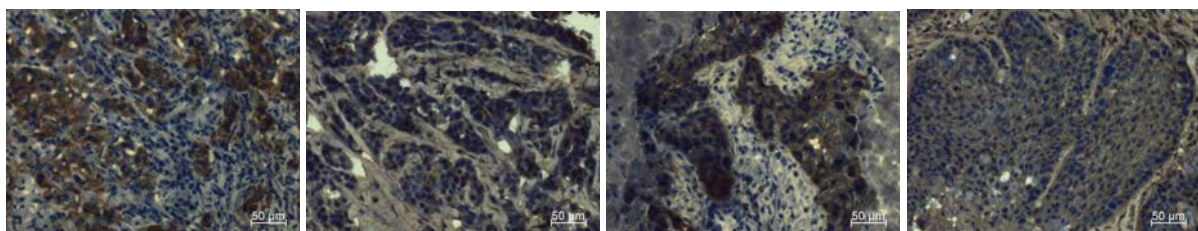
7198 Patient

7198 P4

7462 Patient

7462 P2

Pleomorphe Karzinome



7064 Patient

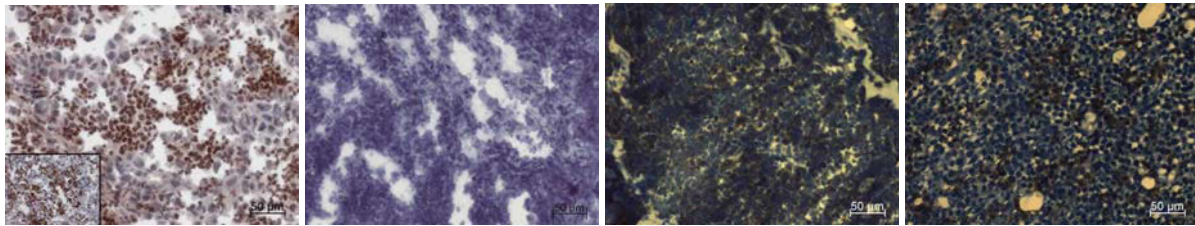
7064 P3

7558 Patient

7558 P5

Dedifferenziertes Karzinom

Kleinzelliges Lungenkarzinom



7668 Patient

7668 P4

7530 Patient

7530 P6

Abb. 13: **E-Cadherin-Färbung in den Patienten- und ihren abgeleiteten Xenograftumoren** in repräsentativen Modellen. Bei der Färbung des Patiententumors 7668 wurde zusätzlich eine Abbildung der Negativkontrolle zum Vergleich eingefügt. Vergrößerung: 200x

Fazit: Das Protein von E-Cadherin wurde mit Ausnahme der Modelle 7668 und 7530 in allen Xenografts erfolgreich detektiert.

3.1.3.3 Der Prozess der epithelialen mesenchymalen Transition in den Modellen

Eine Überprüfung der epithelialen mesenchymalen Transition fand in den Xenografts statt, da in drei Modellen kein bzw. nur wenig E-Cadherin-Protein nachgewiesen wurde. Bei diesem Prozess nehmen die epithelialen Marker ab, während die mesenchymalen Marker ansteigen. Mit der Zunahme der mesenchymalen Eigenschaften steigt das Metastasierungspotenzial der Tumorzelle. Als weiterer Marker für epitheliale Zellen wurde γ -Catenin analysiert und als mesenchymale Marker wurden Vimentin, Fibronectin und Snail untersucht. Von den Markern wurde ein mRNA- und Proteinexpressionsprofil erstellt.

Die epithelialen und mesenchymalen assoziierten Marker wurden auf mRNA-Ebene mit Hilfe der Affymetrix® Genechips® analysiert. Die Modelle exprimierten die mRNA der epithelialen Marker *E-Cadherin* (CDH1) und γ -*Catenin* (JUP) auf einem höheren Niveau als die der mesenchymalen Marker *Fibronectin* (FN1) und *Snail* (SNAI1). Dagegen zeigte *Vimentin* (VIM) eine ähnlich hohe Expression wie γ -*Catenin*. Das NSCLC 7668 enthielt die geringste Menge an *E-Cadherin*- und γ -*Catenin*-mRNA, während in den restlichen Modellen ein ähnliches Expressionsniveau vorgefunden wurde. Ein für jeden Tumor individuelles Genexpressionsprofil ergab die Analyse von *Fibronectin* und *Snail*. Auf Grundlage der mRNA-Expression können die NSCLC Modelle, mit Ausnahme von 7668, dem epithelialen Phänotyp zugeordnet werden. Das SCLC 7530 wies eine leicht verringerte Menge an E-Cadherin auf, exprimierte γ -Catenin jedoch auf einem ähnlichen Niveau wie die NSCLC.

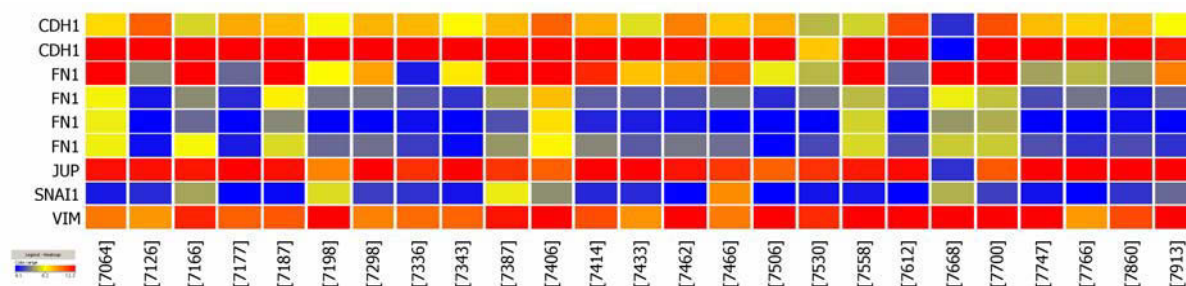


Abb. 14: : mRNA-Expression EMT-assoziierter Marker: *CDH1*, *FN1*, *JUP*, *SNAI1* und *VIM*. Die mRNA-Expression wurde aus den Analysen der Affymetrix® Genechips® extrahiert.

Anschließend wurden die EMT assoziierten Marker auch auf Proteinebene mit Hilfe des Immunoblots untersucht.

LuCa	Histologie	Epitheliale Marker		Mesenchymale Marker		
		E-Cadherin	β-Catenin	Vimentin	Fibronektin	Snail
7064	PLC	++	++	-	+++	+
7126	SCC	++	++	-	+	+
7166	LCC	++	++	-	+	++
7177	SCC	+++	++	-	-	-
7187	PLC	++	+	-	++	-
7198	ADC	+	+	++	(+)	++
7298	SCC	+++	++	-	(+)	+
7336	PLC	+++	+++	-	-	-
7343	SCC	+++	++	-	-	-
7387	ADC	++	++	-	+	++
7406	ADC	+++	+	++	+++	+
7414	SCC	+	+	+	+	++
7433	SCC	+++	+++	-	+	+
7462	ADC	++	+	+	+	+
7466	ADC	++	++	-	-	+++
7506	SCC	++	++	-	-	-
7530	SCLC	-(+)	-(+)	+	+	-
7558	PLC	+	+++	-	+	+
7612	SCC	+++	+++	-	+	-
7668	DCC	-	-(+)	+	++	+
7700	ADC	++	+++	-	+++	+
7747	SCC	++	+++	-	++	-
7766	SCC	++	+++	-	-	-
7860	SCC	++	+++	+	(+)	+
7913	SCC	++	+++	-	(+)	+

Tab. 7: **Nachweis der mesenchymalen und epithelialen Proteine.** Histologie: ADC-Adenokarzinom, SCC-Plattenepithelkarzinom, PLC-pleomorphes Karzinom, LCC-großzelliges Karzinom, DCC-dedifferenziertes Karzinom, SCLC-kleinzelliges Lungenkarzinom. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe von drei Kategorien beurteilt: +++ starke, ++ mäßige, + schwache, - keine Proteinexpression.

Die Modelle 7198, 7414, 7668 und das SCLC 7530 zeigten (wiederholt) keine bzw. eine schwache Proteinexpression. In den übrigen Modellen wurde eine mittlere bis starke Proteinkonzentration

von E-Cadherin beobachtet. Das Protein γ -Catenin konnte ebenfalls im gesamten Xenograftpanel detektiert werden. Die NSCLC Modelle 7187, 7198, 7406, 7414, 7462, 7668 sowie das SCLC 7530 enthielten weniger γ -Catenin als die restlichen Xenografts.

Im Vergleich zu den epithelialen Markern wurden die mesenchymalen Proteine Vimentin, Fibronectin und Snail auf einem insgesamt schwächeren Niveau detektiert. Auch die Anzahl der Modelle, die die drei Proteine enthielten, nahm ab. Vimentin konnte in sechs NSCLCs (7198, 7406, 7414, 7462, 7668, 7860) und dem SCLC 7530 nachgewiesen werden. Bei Fibronectin wurde ein heterogenes Proteinexpressionsprofil bezüglich der Proteinmenge und des Expressionsprofils gefunden. In sechs Modellen ließ sich kein Protein detektieren. In den übrigen Xenografts trat eine sehr schwache (7198, 7298, 7860, 7913) bis starke Proteinexpression (7064, 7406, 7700) auf. Snail konnte in 16 Modellen nachgewiesen werden, wobei das Modell 7466 die höchste und 7187 die niedrigste Proteinmenge enthielten.

Grundsätzlich zeigten fast alle Modelle einen epithelialen Phänotyp, indes auch mesenchymale Marker nachgewiesen wurden. Letztere waren jedoch nicht auf einem entsprechend hohen Niveau, das eine eindeutige mesenchymale Zuordnung erlaubte. Besonders deutlich wurde dies in dem NSCLC 7668 und dem SCLC 7530, die trotz niedriger epithelialer Marker keine deutlich erhöhte Expression der mesenchymalen Marker zeigten. Somit weist das Proteinexpressionsprofil Parallelen zu den Ergebnissen der mRNA-Expression auf.

Innerhalb der Proteine wurde eine inverse Korrelation zwischen Vimentin und den beiden epithelialen Markern E-Cadherin ($r = -0,418$, $p = 0,03$) und γ -Catenin vorgefunden ($r = -0,615$, $p = 0,001$). Modelle, die eine geringe Menge von E-Cadherin und γ -Catenin enthielten, wiesen tendenziell mehr Vimentin auf. Zwischen den weiteren Proteinen war eine Expression der mesenchymalen Proteine nicht an eine verringerte Expression der epithelialen Marker gebunden.

Fazit: Die Analyse ergab, dass 23 Xenograftmodelle dem epithelialen Phänotyp zugeordnet werden konnten. Die Modelle 7530 und 7668 wiesen sowohl mesenchymale als auch epitheliale Marker auf, die keine eindeutige Zuordnung erlaubten.

3.1.4 Vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen Primär- und Xenografttumor

Die Affymetrix® Genechips® kamen für eine vergleichende Genexpressionsstudie der Primär- und Xenografttumore zur Anwendung.

Die Microarraydaten wurden entsprechend der im Kapitel 2.2.6 beschriebenen Methoden ausgewertet. Aufgrund der angewendeten Filter wurden 7647 Probesets als signifikant und differenziell exprimiert identifiziert. Diese repräsentierten 4152 Gene, wobei offene Leserahmen, hypothetische Gene und Probesets ohne Gensymbol nicht weiter berücksichtigt wurden. Eine anschließende GO-Analyse zeigte, dass 4152 Gene mit 352 überrepräsentierten GO-Termini annotiert wurden. Eine Vielzahl dieser GO-Termini ließen sich mit dem „Immunsystem“ oder der „Extrazellulären Matrix“ in Verbindung bringen. GO-Termini, die dem „Immunsystem“ zugeordnet wurden, waren u. a. MHC-Komplexe, Zytokin- und Chemokinbindung. Auch die GO-Termini Aktivierung, Entwicklung und Antwort des Immunsystems sowie die Antigenprozessierung, -präsentation ließen sich dem „Immunsystem“ zuschreiben. Veränderungen, die die „Extrazelluläre Matrix“ betrafen, waren durch die GO-Termini Extrazelluläre Matrix, Kollagen, Plasmamembran sowie Zelladhäsion vertreten.



Abb. 15: : **Stammbau der GO-Analysen**, aus 7647 Probesets der differentiellen Genexpressionsanalyse. 352 GO-Termini waren signifikant unterschiedlich für $p < 0,05$, blau dargestellt.

Im Vergleich von Primärtumoren und Xenografts wurden 5647 Probesets gefunden, die eine signifikant verminderte Expression zeigten. Eine geringere Anzahl an Probesets (2000) war in den Xenografts höher exprimiert. Nachfolgend sind die zehn Gene mit dem höchsten FoldChange (höher und niedriger) in den Tabellen 8 und 9 dargestellt.

Probeset ID	FoldChange	Gensymbol	Probeset ID	FoldChange	Gensymbol
217683_at	244,23	<i>HBE1</i>	217022_s_at	-2779,87	<i>IGH@</i>
224344_at	142,99	<i>COX6A1</i>	214677_x_at	-1435,42	<i>IGL@</i>
216018_at	6,81	<i>RNF5</i>	216834_at	-1390,40	<i>RGS1</i>
217562_at	6,56	<i>FAM5C</i>	211161_s_at	-929,50	<i>COL3A1</i>
217279_x_at	5,33	<i>MMP14</i>	213975_s_at	-843,41	<i>LYZ</i>
231749_at	5,14	<i>TIMM13</i>	212592_at	-741,81	<i>IGJ</i>
213240_s_at	4,78	<i>KRT4</i>	211430_s_at	-597,30	<i>IGH@</i>
221309_at	4,56	<i>RBM17</i>	221671_x_at	-538,93	<i>IGK@</i>
211204_at	4,15	<i>ME1</i>	202404_s_at	-439,31	<i>COL1A2</i>
239439_at	3,74	<i>IGFL1</i>	209138_x_at	-385,79	<i>IGL@</i>

Tab. 8 und 9: **Die zehn am stärksten differenziell exprimierten Probesets in den Xenografts im Vergleich zu den Primärtumoren.** Die Microarraydaten wurden nach Primär- und Xenografftumoren gruppiert und mit einem Mann-Whitney Test ($p < 0,05$) und der Benjamini-Hochberg Methode gefiltert.

Die hoch regulierten Gene stammten aus verschiedenen Funktionskreisen wie „Blut“, „Mitochondriale Atmungskette“ oder „RNA-bindende Proteine“. Drei dieser Gene (*RNF5*, *MMP14*, *KRT4*) konnten im weitesten Sinne der extrazellulären Matrix zugeordnet werden. Das Protein RNF5 kann einerseits Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und andererseits auch die Zellmotilität regulieren [192]. MMP14 ist in den Abbau der extrazellulären Matrix beim Gewebeumbau involviert und KRT4 ist an der Differenzierung von Epithelzellen beteiligt [193;194].

Innerhalb der zehn am stärksten herunter regulierten Gene waren sechs Immunglobuline und konnten somit dem Funktionskreis „Immunsystem“ zugeordnet werden. RGS1 reguliert die Signalübertragung des G-Proteins, kann aber auch die B-Zell-Aktivierung und -Proliferation steuern [195;196]. Das Gen *LYZ* kodiert das Protein Lysozym, das am Abbau der bakteriellen Zellwand beteiligt ist [197]. Aufgrund der immunsupprimierten Mäuse, die keine bakteriellen Infektionen haben sollten, war es herunter reguliert. Die zwei Kollagene sind am Aufbau der Extrazellulären Matrix beteiligt und waren durch Änderungen des Zellmilieus differenziell exprimiert.

Bereits bei der Betrachtung der zehn am stärksten regulierten Genen deutete sich an, dass Gene des „Immunsystems“ und der „Extrazellulären Matrix“ schwächer in den Xenografts exprimiert wurden. Eine weitere GO-Analyse bestätigte dies. In den hoch regulierten Genen dominierten GO-Termini, die der Zellteilung und dem Zellzyklus zuzuordnen waren. Andere Gene waren in die DNA-Replikation involviert (Tab. 10). Häufig, aber schwach exprimierte Gene wurden der funktionellen Klassifikation „Immunsystem“ mit einer Vielzahl an Regulationen und der „Extrazellulären Region/ Matrix“ zugewiesen (Tab. 11).

Hoch

GO ACCESSION	GO Term	korrigierter p-Wert	Häufigkeit	% Häufigkeit
GO:0000279	M phase	1,313E-26	73	7,57
GO:0007067	Mitosis	1,496E-25	69	7,15
GO:0000280	nuclear division	1,496E-25	69	7,15
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	3,046E-25	70	7,25
GO:0022403	cell cycle phase	3,881E-25	75	7,77
GO:0048285	organelle fission	1,407E-24	69	7,15
GO:0005622	Intracellular	4,880E-24	854	88,50
GO:0051301	cell division	5,134E-24	78	8,08
GO:0007049	cell cycle	2,412E-22	125	12,95
GO:0000278	mitotic cell cycle	3,237E-22	72	7,46

Tab. 10: **Die zehn GO-Termini mit den höchsten korrigierten p-Werten in den hoch regulierten Genen.** Differenziell regulierte Gene nach dem Mann-Whitney Test mit einem FoldChange > |1,5| und p < 0.05 wurden einer GO-Analyse zugeführt.

Herunter

GO ACCESSION	GO Term	korrigierter p-Wert	Häufigkeit	% Häufigkeit
GO:0006952	defense response	0,0	239	9,27
GO:0002217				
GO:0042829				
GO:0044421	extracellular region part	0,0	343	13,31
GO:0005576	extracellular region	0,0	649	25,18
GO:0023060	signal transmission	0,0	823	31,94
GO:0044459	plasma membrane part	0,0	418	16,22
GO:0023052	Signaling	0,0	907	35,20
GO:0023046	signaling process	0,0	823	31,94
GO:0007165	signal transduction	0,0	823	31,94
GO:0002376	immune system process	0,0	434	16,84
GO:0004872	receptor activity	0,0	503	19,51
GO:0019041				

Tab. 11: **Die zehn GO-Termini mit den höchsten korrigierten p-Werten in den herunter regulierten Genen.** Differenziell regulierte Gene nach dem Mann-Whitney Test mit einem FoldChange > |1,5| und p < 0.05 wurden einer GO-Analyse zugeführt.

Mit einer unüberwachten hierarchischen Cluster-Analyse sollte geprüft werden, inwieweit die globalen Genexpressionsprofile der Patiententumore mit den korrespondierenden Xenografts übereinstimmen. Das Clustering ermöglicht Proben aufgrund eines ähnlichen Genexpressionsverhaltens in Gruppen einzuteilen. Da die differenziell exprimierten Gene zwischen Patient und Xenograft fast vollständig dem Wechsel in das murine Milieu zugeordnet werden konnten, wurden diese Gene von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Mit den verbleibenden 43701 Probesets wurde ein hierarchisches Clustering durchgeführt (Abb. 16). In 14 Modellen clusterten die Primärtumore zusammen mit den korrespondierenden Xenografttumoren. Die Primärtumore der fünf Modelle 7177, 7747, 7860, 7336 und 7913 wurden gemeinsam gruppiert und nicht mit den entsprechenden Xenografts. Zu den drei Modellen 7126, 7166 und 7433 waren

keine Cel-Dateien der Primärproben vorhanden und die Xenografts der jeweiligen Modelle gruppierten sich zusammen. Von den drei Modellen 7187, 7198 und 7298 standen Cel-Dateien aus zwei verschiedenen Hybridisierungsansätzen zur Verfügung. Die Replikate der Cel-Dateien dieser Modelle wurden jedoch nicht gemeinsam gruppiert. Dies kann mit der schlechten RNA-Qualität der Tumorproben aus dem ersten Hybridisierungsansatz erklärt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Cel-Dateien der ersten Hybridisierung von weiteren statistischen Analysen ausgeschlossen.

Fazit: Aufgrund der hier erhobenen Daten lässt sich feststellen, dass die Mehrzahl der Modelle keine grundlegenden Unterschiede in der Genexpression zwischen den Primärtumoren und den Xenografts aufweisen.

3.1.5 Analyse von lungenkrebsassoziierten Genen

Zahlreiche Mutationen werden im Zusammenhang mit Lungenkrebs gesehen. Mutationen im *KRAS*-Gen sind in ca. 30% aller Lungenkarzinome präsent und werden als prognostische und/oder prädiktive Faktoren diskutiert. Der Tumorsuppressor TP53 und das Onkoprotein MDM2 interagieren eng miteinander und ihre Deregulation kann die Entstehung von Lungenkrebs fördern. Ähnliches ist auch vom EGFR bekannt, der häufig in Tumoren der Lunge überexprimiert wird. Eine Mutations- und SNP-Analyse der ausgewählten Gene sollte klären, inwieweit sie in den Modellen von Bedeutung sind.

Mutationen

In dem Gen *KRAS* wurden das Codon 12, 13 und 61 analysiert. Die Mehrzahl der Modelle wiesen im Codon 12 und 13 keine Mutationen auf. Die sechs Modelle 7187, 7198, 7462, 7466, 7668 und 7700 enthielten im Codon 12 eine Mutation und in dem Codon 13 war das Modell 7700 mutiert. In allen Modellen wurde der *KRAS61*-Wildtyp-Genotyp detektiert.

Gen	Wildtyp	Mutation
<i>KRAS12</i>	17/1	6
<i>KRAS13</i>	23/1	1
<i>KRAS61</i>	24/1	0

Tab. 12: **Mutationsanalyse von *KRAS***. Zahl/Zahl: Daten der NSCLC/ Daten des SCLC.

Einzelnukleotidpolymorphismen

Die Analyse vom *TP53* SNP 72 ergab, dass die Mehrzahl der Modelle Variante1 aufwiesen. In den Modellen 7126 und 7343 wurde Variante2 und in den Modellen 7433, 7462 und 7766 die Variante3 gefunden.

Die Variante1 des SNPs 309 im Gen *MDM2* ließ sich in 18 NSCLCs und dem SCLC detektieren. Acht Modelle enthielten die Variante2 und das Modell 7343 die einzige Variante3.

In dem *EGFR497* wurden die Variante1 in vier Modellen und die Variante2 in acht Modellen nachgewiesen. Zwölf NSCLC Modelle und das SCLC exprimierten Variante3.

Gen	Variante1	Variante2	Variante3
<i>TP53</i>	19/1	2	3
<i>MDM2</i>	15/1	8	1
<i>EGFR497</i>	4	8	12/1

Tab. 13: **SNP-Analysen der Gene *TP53*, *MDM2* und *EGFR497***. Zahl/Zahl: Daten der NSCLC/ Daten des SCLC.

Fazit: Es wurden heterogene Mutationsprofile für *KRAS* und heterogene SNP-Profile für *TP53*, *MDM2* und *EGFR* gefunden, die keine Korrelationen zum Ansprechen zeigten.

3.1.6 Sensitivitätsprofile der Xenograftmodelle

Zur Beurteilung der individuellen Sensitivität der Xenograftmodelle wurden diese mit sieben Medikamenten behandelt. Es wurden die vier Zytostatika Carboplatin, Paclitaxel, Gemcitabin und Etoposid ausgewählt, um die aktuell in der Klinik verwendete Chemotherapie zu repräsentieren. Der Wirkungsmechanismus dieser klassischen Medikamente beruht u. a. auf einer Hemmung der DNA-Replikation oder der Zytokinese. Der Tyrosinkinasehemmer Erlotinib und der monoklonale Antikörper Cetuximab vertraten die neueren zielgerichteten Therapien gegen Wachstumsfaktoren oder -rezeptoren. Die ebenfalls zielgerichtete Hemmung der Angiogenese wurde durch eine Behandlung mit dem VEGFA-Antikörper Bevacizumab untersucht.

Eine Beurteilung der Chemosensitivität fand mit Hilfe des T/C-Wertes [%] statt. In Anlehnung an die RECIST Kriterien, die in der der Klinik Anwendung finden, wurden Modelle mit T/C-Werten $\leq 30\%$ als sensitiv bewertet.

3.1.6.1 Klassische Chemotherapeutika

Allgemein wiesen die NSCLC Modelle ein individuelles Chemosensitivitätsprofil gegenüber den klassischen Zytostatika auf. 2 Modelle (7414, 7668) waren gegenüber drei Zytostatika sensitiv, 13 Modelle gegenüber zwei Zytostatika und 8 sprachen auf nur ein Medikament an. Als einziges war Modell 7198 resistent gegenüber jedem der hier verwendeten Zytostatika. Das SCLC 7530 wurde als sensitiv gegenüber drei Therapeutika beurteilt, es traten jedoch toxische Nebenwirkungen unter der Gemcitabin-Behandlung auf.

Carboplatin

Eine Ansprechrage von 42% wurde in den NSCLCs ermittelt. Die zehn NSCLC Xenografts 7506, 7612, 7558, 7668, 7766, 7343, 7433, 7166, 7414 und 7747 sowie das SCLC 7530 waren sensitiv gegenüber Carboplatin mit einem T/C $\leq 30\%$. Dabei zeigten drei Modelle 7126, 7466 und 7860 die größte Hemmung des Tumorwachstums (T/C < 5%). Entgegengesetzt reagierte das Xenograft 7466, das durch die Behandlung mit Carboplatin ein stimuliertes Wachstum aufwies (T/C = 148%).

Paclitaxel

Paclitaxel war das Medikament mit der höchsten Ansprechrate (70%). Die Mehrzahl der NSCLC Modelle (17) und das SCLC 7530 hatten ein Tumorwachstum von weniger als 30%. Dagegen sprachen sieben Xenografts nicht auf eine Behandlung mit Paclitaxel an.

Gemcitabin

Die höchste Heterogenität des Chemosensitivitätsprofils wurde bei dem Pyrimidinanalogon Gemcitabin beobachtet. Je elf Modelle waren sensitiv bzw. resistent gegenüber Gemcitabin. Dies entsprach einem Ansprechen von 46%. Bei der Untersuchung des NSCLC Modells 7466 und des SCLC Modells 7530 traten toxische Nebenwirkungen unter der Therapie auf.

Etoposid

Die schlechteste Ansprechrate (4%) der Modelle wurden gegenüber dem Topoisomerasehemmer Etoposid ermittelt. Nur das NSCLC 7166 sprach auf die Therapie an (T/C = 29%). Das Tumorwachstum des SCLC betrug 3% und folglich war es das sensitivste Modell. Im Gegensatz dazu war das Xenograft 7466 resistent und zeigte ein verstärktes Wachstum (T/C = 104%).

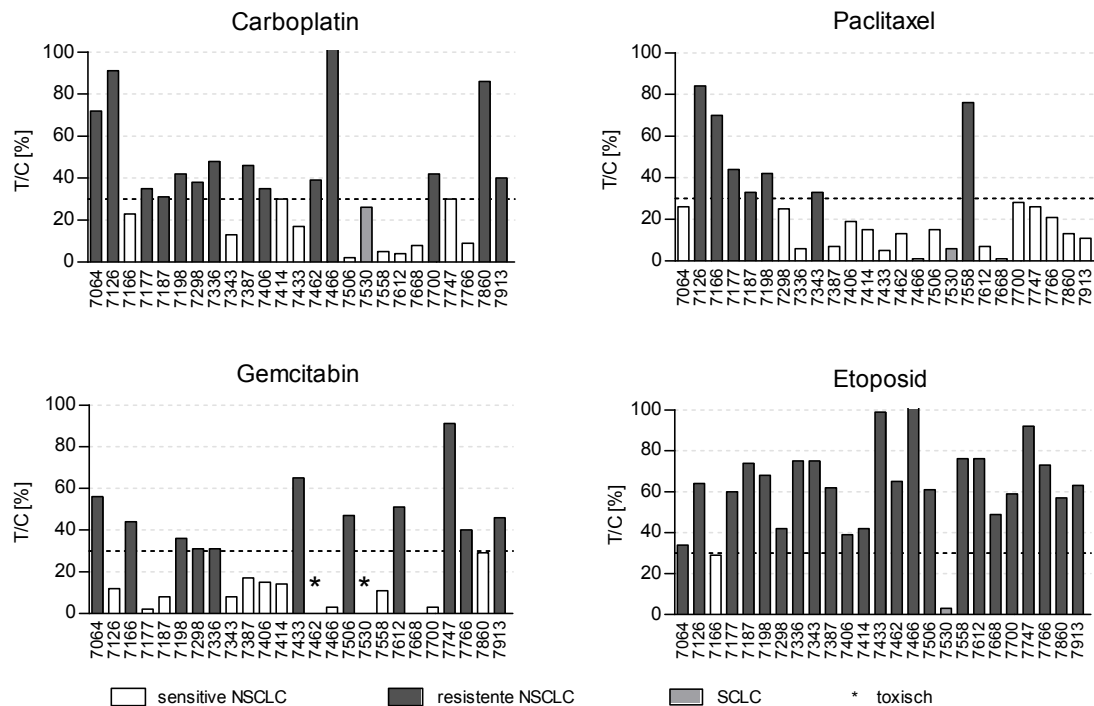


Abb. 17: Chemosensitivität der Modelle gegenüber den Zytostatika Carboplatin, Paclitaxel, Gemcitabin und Etoposid. Das Ansprechen wurde mit Hilfe der T/C-Werte beurteilt, wobei Modelle mit $T/C \leq 30\%$ als sensitiv (weiße Säulen) und $T/C > 30\%$ als resistent (schwarze Säulen) bewertet wurden. Die gestrichelte Linie ($T/C = 30\%$) zeigt die Grenze zwischen den sensitiven und resistenten Modellen. Das SCLC Modell 7530 wurde farblich separat dargestellt.

3.1.6.2 Zielgerichtete Therapien

Anti-EGFR-Therapien

Die ermittelten Sensitivitätsprofile des Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib und des EGFR-Antikörpers Cetuximab wiesen Gemeinsamkeiten auf.

Erlotinib

Unter einer Erlotinib-Behandlung sprachen 13% der Modelle auf die Therapie an. Bei den drei sensitiven Modellen 7064, 7177 und 7466 wurde das Tumorwachstum unter einer Erlotinib-Behandlung um ca. 70% gehemmt.

Cetuximab

Acht NSCLC Modelle waren gegenüber Cetuximab sensitiv, wobei die drei Xenografts 7462, 7466 und 7668 besonders gut auf die Behandlung ansprachen (T/C < 2%). Dies entspricht einem Anteil von 33%. Die anderen 16 NSCLCs und das SCLC 7530 waren resistent.

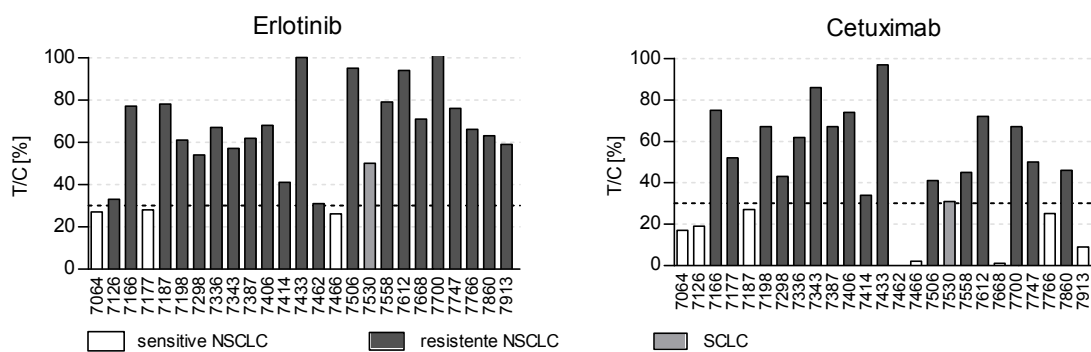


Abb. 18: **Sensitivität der Modelle gegenüber den EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Cetuximab.** Das Ansprechen wurde mit Hilfe der T/C-Werte beurteilt, wobei Modelle mit $T/C \leq 30\%$ als sensitiv (weiße Säulen) und $T/C > 30\%$ als resistent (schwarze Säulen) bewertet wurden. Die gestrichelte Linie ($T/C = 30\%$) zeigt die Grenze zwischen sensitiven und resistenten Modellen. Das SCLC Modell 7530 wurde farblich separat dargestellt.

Anti-angiogene Therapie

Bevacizumab

Der Angiogenesehemmer Bevacizumab führte in 5 von 20 NSCLC Modellen (7126, 7177, 7187, 7433, 7612) zu einer Hemmung des Tumorwachstums von 70% bis 88%. Die restlichen Modelle sprachen nicht auf die Therapie an.

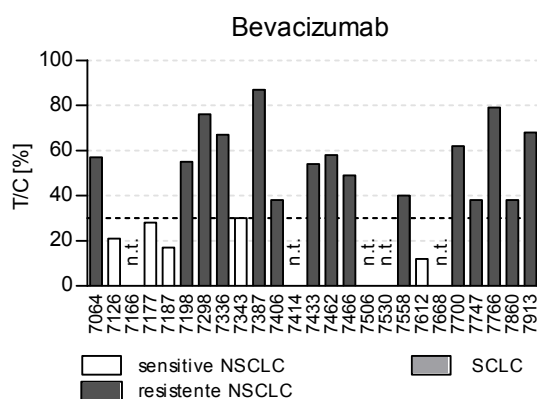


Abb. 19: **Sensitivität der Modelle gegenüber dem Angiogeneseinhibitor Bevacizumab.** Das Ansprechen wurde mit T/C-Werten beurteilt, wobei Modelle mit $T/C \leq 30\%$ als sensitiv (weiße Säulen) und $T/C > 30\%$ als resistent (schwarze Säulen) bewertet wurden. Die gestrichelte Linie ($T/C = 30\%$) zeigt die Grenze zwischen sensitiven und resistenten Modellen. Das SCLC Modell 7530 wurde farblich separat dargestellt. n.t. - keine Behandlung durchgeführt.

Fazit: Die ermittelten Daten machten deutlich, dass jedes Xenograftmodell ein individuelles Sensitivitätsprofil gegenüber den klassischen Zytostatika als auch den neueren zielgerichteten Therapien aufwies.

3.2 Marker für die klassische Chemotherapie

3.2.1 Intrinsische Expression resistenzassoziierter Marker

Die Chemotherapie ist nach wie vor ein unverzichtbarer Bestandteil bei der Behandlung des Bronchialkarzinoms. Der Wirkungsmechanismus der Medikamente beruht u. a. auf der Hemmung der DNA-Replikation oder der Zytokinese. Allerdings spricht ein Teil der Patienten nicht oder nur ungenügend auf eine Therapie an. Eine Ursache dieser Resistenz kann in der Reduktion der intrazellulären Zytostatikakonzentration durch Änderungen des Influx und Efflux liegen. Verantwortlich dafür können ATP-abhängige, membranständige Proteinpumpen wie MDR1, MRP1 und ABCG2 sein. Das Ziel der Untersuchung war es zu prüfen, ob dieser Mechanismus auch in den Xenografts eine Rolle spielt. Dazu wurde ein mRNA- und Proteinexpressionsprofil der bekanntesten Transporter MDR1, MRP1, ABCG2 und LRP mit Hilfe der TaqMan-PCR und der FACS-Analyse oder des Immunoblots erstellt.

3.2.1.1 ‚Multidrug resistance protein 1‘

Die mRNA des Gens *MDR1* konnte in 19 der 24 NSCLC und dem SCLC 7530 nachgewiesen werden. Dabei ließ sich in dem Modell 7462 der niedrigste ΔC_T (9) ermitteln und somit die höchste mRNA-Menge. Die Kontrolle MT3/ADR wurde ebenfalls untersucht, da sie eine bereits bekannte Resistenz gegenüber Doxorubicin entwickelt hatte. MT3/ADR enthielt eine sehr hohe Konzentration an mRNA, was auch der $\Delta C_T = 4$ zeigte. Der Vergleich der Kontrolle mit dem mittleren ΔC_T (13) der 25 Modelle machte deutlich, dass eine ca. 1000-fach verringerte mRNA Menge in den Xenografts vorhanden war.

Dieses niedrige Niveau wurde auch auf der Proteinebene beobachtet. In der FACS Analyse waren in 16 Modellen weniger als 20% der Zellen positiv für MDR1 markiert. Die Modelle 7506 und 7747 hatten mit über 60% den höchsten Anteil an MDR1-positiven Zellen.

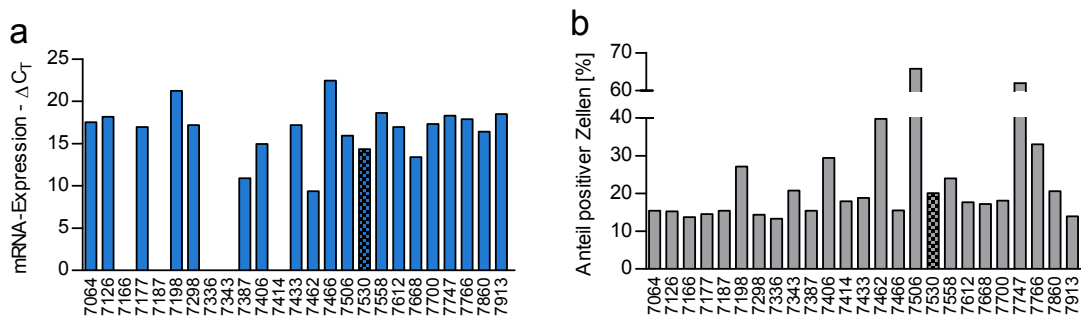


Abb. 20: mRNA- und Proteinexpression von MDR1. Die mRNA-Expression (a) wurde mit TaqMan-PCR untersucht und die MDR1-Proteinkonzentration (b) wurde in einer FACS-Analyse ermittelt.

3.2.1.2 ‚Multidrug resistance-associated protein 1‘

In allen Modellen wurde die *MRP1*-mRNA nachgewiesen. Dabei schwankten die ΔC_T -Werte zwischen 2 (7177) und 8 (7466). Die Kontrolle A549 exprimierte die mRNA mit einem ΔC_T von 5. Dieser Wert war damit nur geringfügig niedriger als der mittlere ΔC_T (6) aller 25 Modelle.

Das Protein MRP1 konnte in allen NSCLCs und dem SCLC nachgewiesen werden. Die FACS Analyse ergab einen Anteil an positiven Zellen, der zwischen 10% und 30% lag.

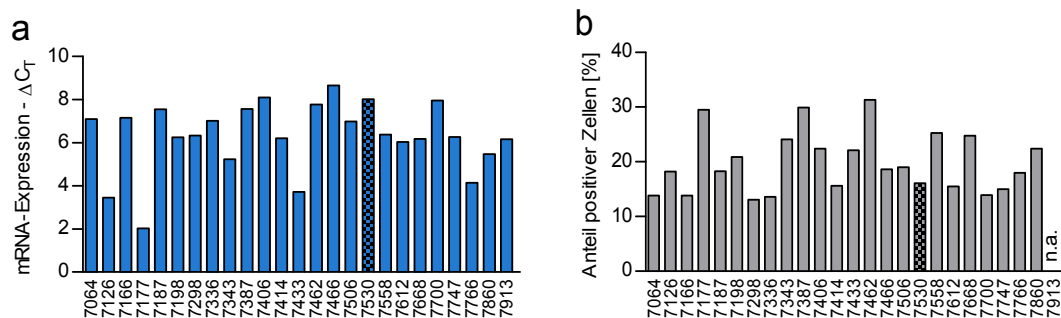


Abb. 21: mRNA- und Proteinexpression von MRP1. Die mRNA-Expression (a) wurde mit TaqMan-PCR untersucht und die MRP1-Proteinkonzentration (b) wurde in einer FACS-Analyse ermittelt.

3.2.1.3 ABC-Transporter G2

Die *ABCG2*-mRNA wurde in allen Proben exprimiert. In den Modellen 7166, 7298, 7406, 7558, 7700 und 7747 wurde ein ΔC_T von ~ 15 ermittelt, somit enthielten diese Modelle die geringste Menge an mRNA. In dem Modell 7126 ließ sich ein $\Delta C_T = 4$ messen. Dieser Wert befand sich damit in einem ähnlichen Messbereich wie die Positivkontrolle. In der mit *ABCG2*-transfizierten Zelllinie MDA-MB-431 wurde ein ΔC_T von 3 vorgefunden.

Das Protein ABCG2 wurde in allen NSCLC Modellen und dem SCLC 7530 detektiert und wies ein heterogenes Muster auf. Dabei besaßen 15 Modelle eine schwache und 10 eine mittlere Proteinmenge.

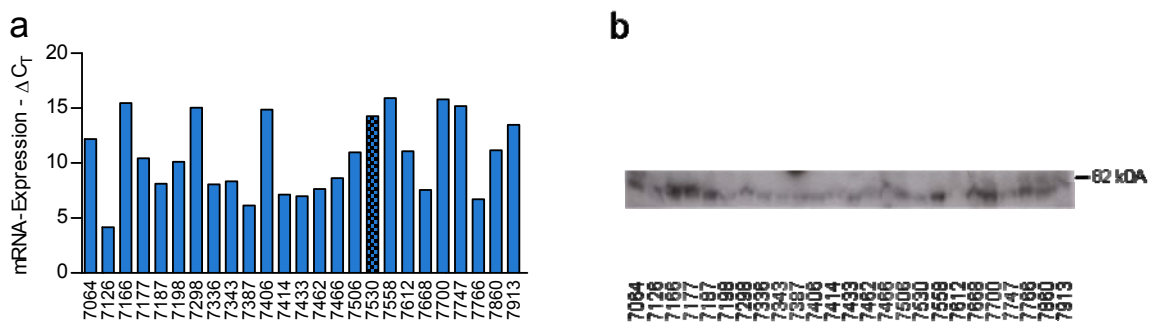


Abb. 22: **mRNA- und Proteinexpression von ABCG2**. Die mRNA-Expression (a) wurde mit TaqMan-PCR untersucht und die ABCG2-Proteinmenge (b) wurde mit Hilfe eines Immunoblots dargestellt.

3.2.1.4 ,Lung resistance related Protein'

Die mRNA und das Protein LRP wurde in allen Modellen nachgewiesen. Dabei schwankten die ΔC_T -Werte von 5 (7126) bis 8 (7064). Das SCLC 7530 wies einen ΔC_T von 8 auf. Die Gegenüberstellung zur Positivkontrolle A549 ($\Delta C_T = 10$) zeigte, dass die Modelle die *LRP*-mRNA auf einem vergleichbaren Level exprimierten.

Mit Hilfe des Immunoblots ließ sich das LRP-Protein im gesamten Probenkollektiv detektieren. In elf Modellen wurde eine mittlere Proteinkonzentration ermittelt, während in den restlichen Modellen eine starke Expression stattfand.

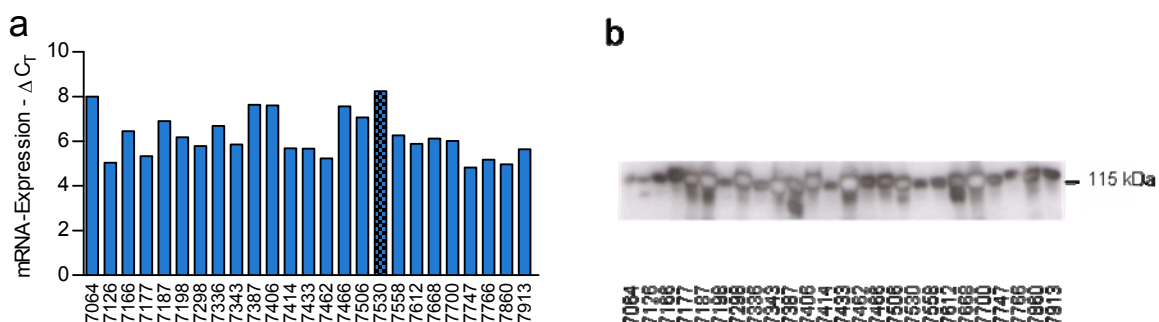


Abb. 23: **mRNA- und Proteinexpression des LRP**. Die mRNA-Expression (a) wurde mit TaqMan-PCR untersucht und die LRP-Proteinmenge (b) wurde mit Hilfe eines Immunoblots dargestellt.

3.2.1.5 Korrelationen zwischen den resistenzassoziierten Markern

Mögliche Zusammenhänge zwischen der mRNA-Expression und der Proteinkonzentration sollte eine Spearman-Korrelationsanalyse klären. Die verschiedenen resistenzassoziierten Marker wurden auf mRNA- und Proteinebene untereinander korreliert.

Es wurden keine Korrelationen zwischen der mRNA und dem korrespondierenden Protein gefunden. Ein mäßig starker Zusammenhang ließ sich auf mRNA-Ebene zwischen *LRP* und dem *MRP1* ($r = 0,675$, $p = 0,0003$) nachweisen. In Modellen, die viel *LRP*-mRNA exprimierten, konnte tendenziell auch mehr *MRP1*-mRNA detektiert werden.

3.2.1.6 Korrelationen der resistenzassoziierten Marker mit dem Ansprechen

Mit Hilfe einer Spearman-Korrelationsanalyse sollte eine Wechselbeziehung zwischen der mRNA-Expression oder der Proteinkonzentration eines resistenzassoziierten Markers und dem Ansprechen auf eine Chemotherapie überprüft werden.

Die Analyse der 24 NSCLCs ergab als einziges eine schwache Korrelation zwischen der *MRP1*-Proteinexpression und der Sensitivität gegenüber Gemcitabin. In Modellen, die ein verringertes Tumorwachstum unter Gemcitabin-Behandlung zeigten, wurde tendenziell mehr *MRP1*-Protein nachgewiesen.

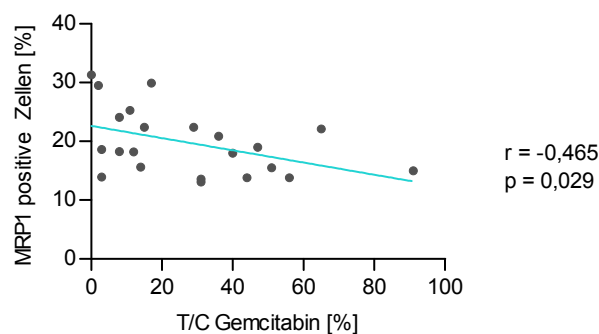


Abb. 24: **Spearman-Korrelation zwischen *MRP1*-Proteinexpression und Gemcitabin-Sensitivität.** Die Korrelationsanalyse ergab einen schwachen Zusammenhang ($r = 0,465$, $p = 0,029$) zwischen *MRP1*-positiven Zellen, ermittelt im FACS, und dem Ansprechen auf Gemcitabin, dargestellt als T/C-Werte.

Fazit: Zusammenfassend ist festzustellen, dass die mRNA- und Proteinexpression von *MDR1* eher niedrig war wie auch in dem Vergleich mit der Positivkontrolle deutlich wurde. *MDR1*-mRNA wurde in 20 Modellen nachgewiesen und ca. 1/5 der Tumorzellen waren in der FACS-Analyse positiv. *MRP1*-mRNA und -Protein wurde, mit einem der Positivkontrolle ähnlichen Level, in allen Modellen detektiert. Die Analyse ergab auch vergleichbare Ergebnisse bei der *ABCG2*-mRNA und dem -Protein. *LRP*-mRNA und -Protein konnte ebenfalls in allen Modellen gefunden werden.

Die Korrelationsanalyse ergab einen Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von *LRP* und *MRP1*. Das Ansprechen auf Gemcitabin korrelierte mit dem *MRP1*-Protein.

3.2.2 Resistenzassoziierte Marker nach einer Zytostatikatherapie

Der Mechanismus der Chemoresistenz kann bereits intrinsisch vorhanden sein oder während einer Therapie entwickelt und/ oder verstärkt werden. In dieser Analyse sollte überprüft werden, ob eine Veränderung der Resistenz durch eine differenzielle Expression der ATP-Transporter in ausgewählten Modellen stattfand. Es wurden die vier Modelle 7406, 7433, 7700 und 7747 nach ihrem Chemosensitivitätsprofil gegen die Zytostatika Carboplatin, Etoposid, Gemcitabin und Paclitaxel ausgewählt. Die Bedingung war ein Ansprechen auf zwei Zytostatika mit unterschiedlichen T/C-Werten.

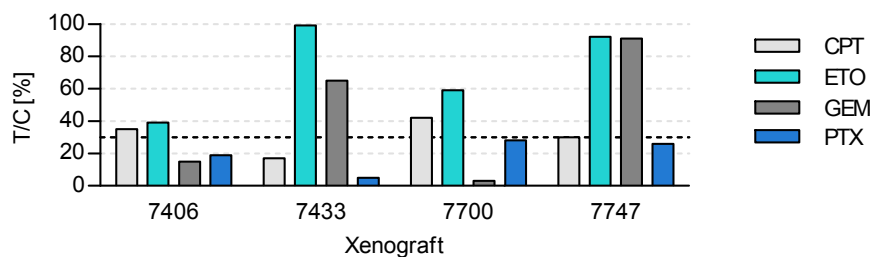


Abb. 25: **Chemosensitivität der Xenografts 7406, 7433, 7700 und 7747** gegenüber den Zytostatika Carboplatin (CPT), Etoposid (ETO), Gemcitabin (GEM) und Paclitaxel (PTX). Das Ansprechen wurde mit T/C-Werten [%] beurteilt, wobei Werte < 30% als sensitiv bewertet wurden.

Jeweils drei Tiere pro Gruppe erhielten eine 3-tägige Therapie und 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tumore konserviert. Anschließend fand eine Untersuchung der resistenzassoziierten ATP-Transporter MDR1, MRP1, ABCG2 und LRP auf Gen- und Proteinebene statt.

Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe der TaqMan-PCR analysiert.

Die Behandlung induzierte eine Veränderung der mRNA-Expression von *MDR1* in dem Modell 7406. Der Dunns Post Test ermittelte in der Gemcitabin behandelten Gruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine signifikante Erhöhung der *MDR1*-mRNA-Expression. Zwischen den beiden Gruppen wurde ein ca. 8-facher Unterschied an mRNA gemessen. Innerhalb der drei anderen Gene ließen sich nur geringfügige Veränderungen in der Expression beobachten.

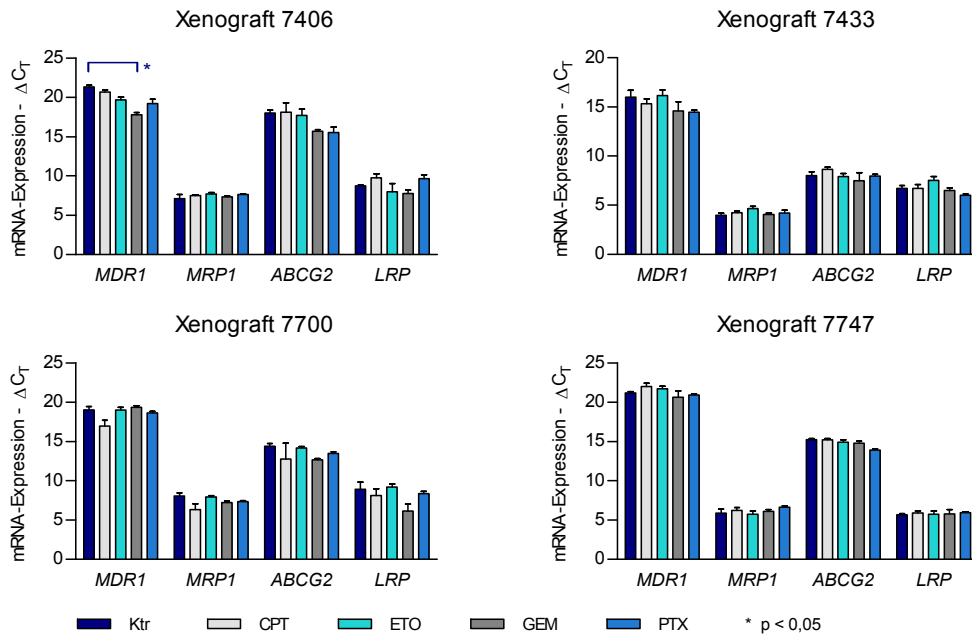


Abb. 26: mRNA-Expression von MDR1, MRP1, ABCG2 und LRP in den Modellen 7406, 7433, 7700 und 7747 nach Zytostatikatherapie. Tumortragende Tiere erhielten eine 3-tägige Behandlung, anschließend wurde die mRNA-Expression mittels TaqMan-PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Ktr - Kontrolle, CPT - Carboplatin, ETO - Etoposid, GEM - Gemcitabin, PTX - Paclitaxel.

Der Proteinnachweis von MDR1, MRP1, ABCG2 und LRP wurde mit Hilfe eines Immunoblots durchgeführt. Das MDR1-Protein ließ sich in keinem Modell nachweisen, da es unter der Nachweisgrenze lag. Eine Regulation von MRP1 durch die Therapie wurde nicht beobachtet. Die ABCG2-Proteinmenge war in den vier untersuchten Modellen ähnlich und es fand keine Regulation statt. Die höchste Proteinexpression aller Modelle wurde bei LRP gefunden. Die Behandlung induzierte jedoch keine Veränderung, die im Immunoblot nachweisbar war.

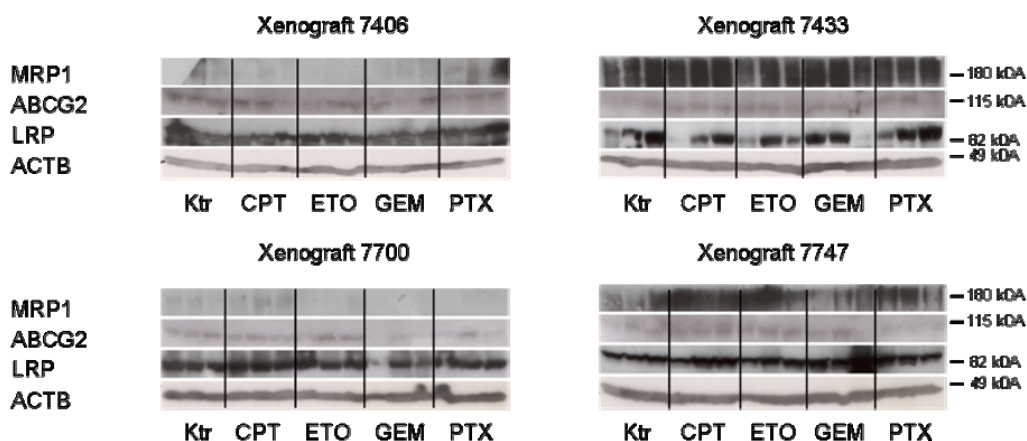


Abb. 27: Proteinnachweis von MRP1, ABCG2 und LRP in den Modellen 7406, 7433, 7700 und 7747 nach Zytostatikatherapie. Tumortragende Tier erhielten eine 3-tägige Behandlung, anschließend wurde die Proteinexpression mittels eines Immunoblots analysiert. Ktr - Kontrolle, CPT - Carboplatin, ETO - Etoposid, GEM - Gemcitabin, PTX - Paclitaxel.

Fazit: Die Behandlung ausgewählter Xenograftmodelle mit klassischen Zytostatika führte in einem von vier Modellen zu einer differentiellen mRNA-Expression des Resistenzmarkers *MDR1*.

3.2.3 Analyse resistenzassoziierter Einzelnukleotidpolymorphismen

Neben dem Resistenzmechanismus durch Medikamenten-Efflux mittels ATP-abhängiger membranständiger Proteinpumpen kann auch eine erhöhte intrazelluläre Entgiftung von Zytostatika oder eine gesteigerte Reparatur von DNA-Schäden die Wirksamkeit der Medikamente verringern. SNPs in den entsprechenden Genen können zu einer erhöhten/ verringerten Expression und Aktivität führen. Aus diesem Grund wurde die DNA aller Modelle mit der RFLP oder einer Pyrosequenzierung auf die Existenz von SNPs überprüft.

XRCC1 wurde in 17 NSCLCs und dem SCLC 7530 als Variante1 und in sieben Modellen als Variante2 detektiert. Die Analyse ergab, dass kein Modell die Variante3 exprimiert. In *XRCC3* ließ sich 4x Variante1 und 6x Variante2 nachweisen. In 14 NSCLC Modellen und dem SCLC konnte die Variante3 detektiert werden. In dem Gen *ERCC1* befand sich die Variante2 in der Mehrzahl der Modelle (11). Eine nahezu gleiche Verteilung von Variante1 und Variante3 (6 vs. 7) wurde in den restlichen Modellen beobachtet. Zwölf Modelle exprimierten im Gen *ERCC2* die Variante1 und vier die Variante2 (7343, 7558, 7860, 7913). In sieben Modellen wurde die Variante3 vorgefunden. Die Untersuchung ergab, dass die Mehrheit der NSCLC Modelle und das SCLC Variante1 in dem Gen *ERCC5* aufwies. In zwei Modellen wurde die Variante2 (7177, 7187) und in drei Modellen die Variante3 (7406, 7506, 7558) detektiert. In dem Gen *GSTP1* besaßen die Mehrzahl der Modelle Variante1. Vier NSCLC Modelle (7433, 7466, 7506, 7558) und das SCLC exprimierten Variante2. In drei Modellen trat die Variante3 (7198, 7612, 7913) auf. In Kapitel 7 (Datentabellen) wurden die Ergebnisse detailliert und tabellarisch aufgelistet.

Gen	Variante1	Variante2	Variante3
<i>XRCC1</i>	17/1	7	0
<i>XRCC3</i>	4	6	14/1
<i>ERCC1</i>	6/1	11	7
<i>ERCC2</i>	12/1	4	7
<i>ERCC5</i>	19/1	2	3
<i>GSTP1</i>	17	4/1	3

Tab. 14: **Zusammenfassung der SNP-Analyse.** Zahl/Zahl: Daten der NSCLC/ Daten des SCLC.

Fazit: Es bestanden keine Zusammenhänge zwischen der heterogenen Verteilung der SNPs und der Chemosensitivität der Modelle.

3.3 Marker für die anti-EGFR-Therapie

3.3.1 Die ERBB-Rezeptoren

Der EGF-Rezeptor gehört zur Proteinfamilie der ERBB-Rezeptoren und ist das Zielprotein der Medikamente Erlotinib und Cetuximab. Eine Analyse seiner (Über-)Expression auf mRNA- und Proteinebene, sowie seiner Genamplifikation könnte für das Verständnis des heterogenen Sensitivitätsprofil gegenüber den zielgerichteten Therapien von Bedeutung sein. Parallel dazu wurden die als Partner für die Bildung von Hetero- oder Homodimeren auftretenden ERBB-Rezeptoren ERBB2, ERBB3 und ERBB4 in die Untersuchung auf mRNA- und Proteinebene einbezogen. Die Proteinanalysen des EGFR wurden zuerst mit Hilfe des ELISAs durchgeführt, während die anderen Mitglieder der ERBB-Proteinfamilie mit dem Immunoblot untersucht wurden.

3.3.1.1 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor

Genkopienzahl des EGFR

Mit Hilfe des ‚Gene copy assays‘ von Applied Biosystems fand eine Untersuchung der Kopienzahl des EGFR statt. Die Analyse ergab, dass zwei Modelle weniger als 2 Kopien besaßen und zehn Modelle mehr als 4 Kopien enthielten. In den Modellen 7466 und 7668 wurde der höchste Wert (> 8) bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass eine Kopienzahl > 4 nicht mehr exakt berechnet werden kann.

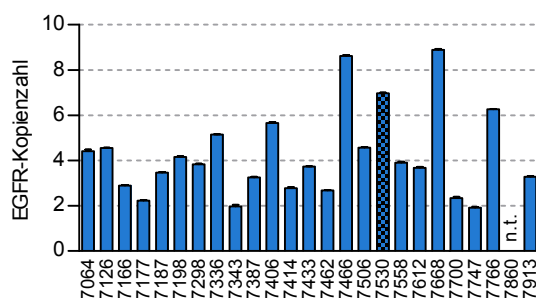


Abb. 28: Genkopienzahl des EGFR. n.t.-nicht analysiert.

mRNA-Expression und Proteinkonzentration

Die *EGFR*-mRNA wurde in allen Tumorproben nachgewiesen. In den NSCLCs lagen die ΔC_T -Werte zwischen 2 und 10. Der höchste ΔC_T -Wert und folglich eine schwache Expression wurde in 7166 detektiert und der niedrigste ΔC_T in dem Xenograft 7766. Das niedrige Expressionslevel im SCLC 7530 wird durch einen ΔC_T von 13 widerspiegelt. Als Referenz wurde die Zelllinie A431 mitgeführt, die einen negativen Wert einnahm ($\Delta C_T = -0,88$).

Die Analyse ergab, dass die NSCLC Modelle ein sehr heterogenes EGFR-Proteinexpressionsprofil bei der ELISA Analyse zeigten. Die mittlere EGFR-Konzentration betrug 14 $\mu\text{g}/\mu\text{g}_{\text{Cp}}$. Im Modell

7166 wurde die geringste Menge an EGFR-Protein ermittelt (1 pg/ μg_{Gp}) und das Xenograft 7766 wies mit 34 pg/ μg_{Gp} die höchste EGFR-Proteinkonzentration auf. Das SCLC 7530 enthielt eine EGFR-Konzentration von 1 pg/ μg_{Gp} . Die Zelllinie A431 wurde als Referenz mitgeführt und zeigte eine ca. 30-fach höhere EGFR-Konzentration (1351 pg/ μg_{Gp}) als das NSCLC Modell 7766 mit der höchsten Proteinmenge.

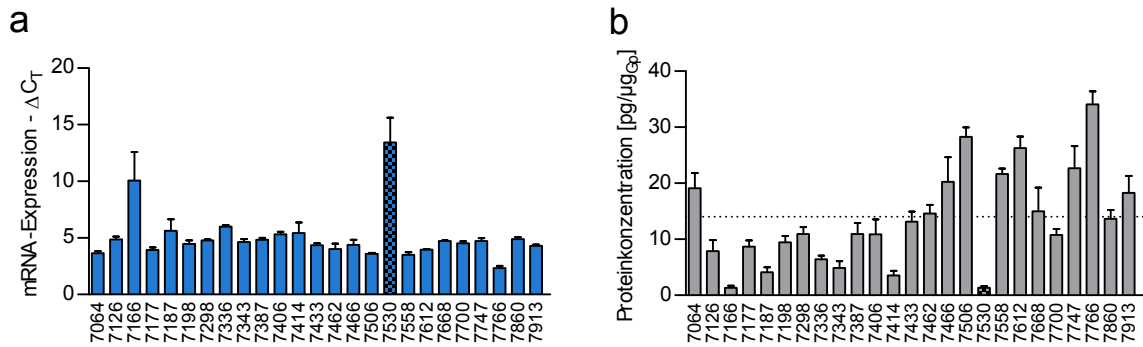


Abb. 29: **mRNA- und Proteinexpression des EGFR.** Die mRNA-Expression (a) wurde mit TaqMan-PCR untersucht und die EGFR-Proteinkonzentration (b) wurde in einem ELISA gemessen. Die gepunktete Linie markiert die mittlere Proteinkonzentration. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Die Analyse des EGFR-Proteins im Immunoblot zeigte eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ELISA-Untersuchung, was auch durch den Spearman-Koeffizienten: $r = 0,664$ ($p = 0,0003$) deutlich wurde.

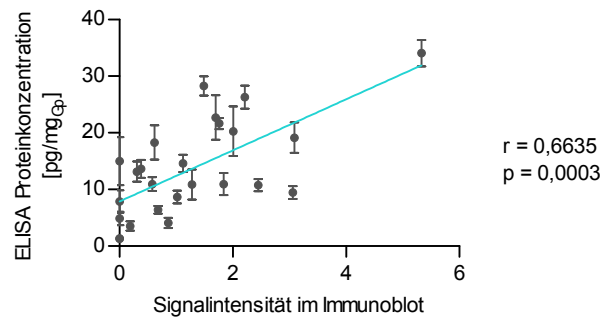


Abb. 30: **Spearman-Korrelation des EGFR.**

3.3.1.2 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2

Die *ERBB2*-mRNA konnte in allen Modellen detektiert werden. Das Modell 7187 wies einen $\Delta C_T = 3$ auf. In dem Modell 7668 sowie in dem SCLC 7530 wurden hohe ΔC_T -Werte von 11 und 13 gemessen. Die restlichen Modelle zeigten ein relativ ähnliches mRNA-Expressionsprofil.

Ein heterogenes Expressionsprofil wurde für ERBB2 in 16 der 25 Modelle beobachtet. Das Modell 7913 enthielt die höchste ERBB2-Signalintensität (0,77).

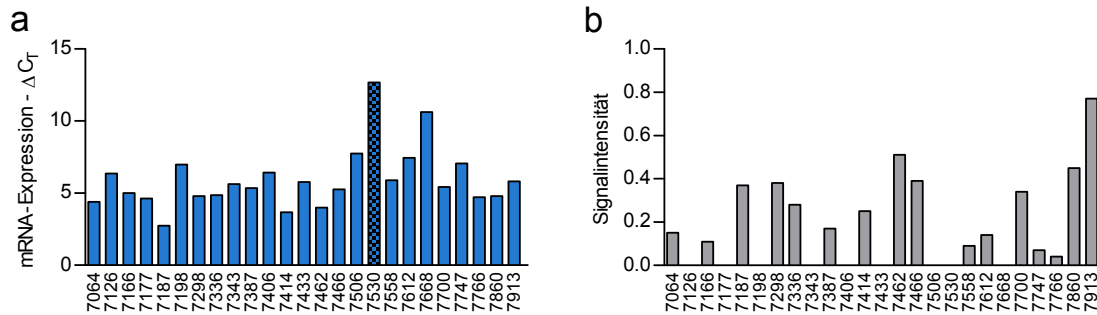


Abb. 31: mRNA- und Proteinexpression des ERBB2. Die mRNA-Expression (a) wurde mit der TaqMan-PCR untersucht. Die Analyse der Proteinexpression (b) wurde mittels Immunoblot durchgeführt und anschließend die Signalintensität der Banden erfasst.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab einen mäßigen inversen Zusammenhang zwischen der mRNA- und Proteinexpression des ERBB2 ($r = -0,531$, $p = 0,008$). Modelle mit einem hohen mRNA-Gehalt exprimierten tendenziell mehr ERBB2 Protein.

3.3.1.3 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 3

Das mRNA-Expressionsprofil des *ERBB3* kann als heterogen beschrieben werden. In den Modellen 7177, 7187 und 7414 wurde ein $\Delta C_T < 2,5$ gemessen, während die Mehrzahl der Modelle Werte zwischen 5 und 7 einnahmen. Bei dem NSCLC 7668 und dem SCLC 7530 wurden Werte von 11 und 16 beobachtet.

In elf Modellen wurde der ERBB3 nachgewiesen. Die übrigen Modelle exprimierten kein ERBB3-Protein.

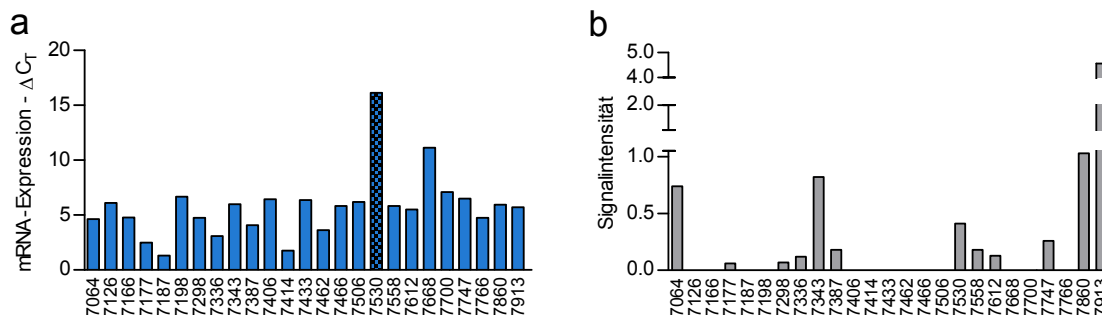


Abb. 32: mRNA- und Proteinexpression des ERBB3. Die mRNA-Expression (a) wurde mit der TaqMan-PCR untersucht. Die Analyse der Proteinexpression (b) wurde mittels Immunoblot durchgeführt und anschließend die Signalintensität der Banden erfasst.

3.3.1.4 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 4

ERBB4-mRNA konnte in 16 von 25 Modellen detektiert werden. Die Modelle exprimierten den *ERBB4* mit ΔC_T Werten zwischen 8 (7166) und 20 (7387).

Die Proteinanalyse ermittelte einzig in dem Modell 7166 eine sehr geringe *ERBB4*-Proteinexpression. Alle übrigen Xenografts waren negativ für den Rezeptor. Nachfolgend wurde auf die Abbildung verzichtet.

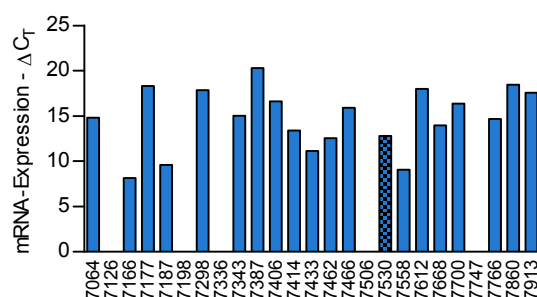


Abb. 33: mRNA-Expression des *ERBB4*. Die Expression wurde mit der TaqMan-PCR analysiert.

3.3.1.5 Korrelationen zwischen den ERBB-Rezeptoren

Abhängigkeiten zwischen der mRNA-Expression und der Proteinkonzentration sollten in einer Korrelationsanalyse aufgezeigt werden. Die einzelnen Mitglieder der ERBB-Proteinfamilie wurden auf mRNA- und Proteinebene untereinander korreliert.

Die Analyse nach Spearman in den NSCLC ergab zwischen der Proteinexpression des *ERBB2* und der mRNA-Expression des *ERBB3* eine schwache inverse Wechselbeziehung ($r = -0,464$, $p = 0,02$). Ein starker Zusammenhang ließ sich auf mRNA-Ebene zwischen dem *ERBB3* und dem *ERBB2* ($r = 0,808$) beobachten. Modelle mit hohen *ERBB2* ΔC_T -Werten exprimierten die mRNA des *ERBB3* auf einem ähnlich hohen Level.

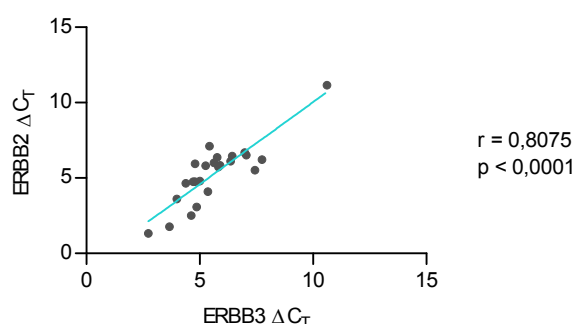


Abb. 34: Spearman-Korrelation der *ERBB3*- und *ERBB2*-mRNA-Expression. Die Korrelationsanalyse der ΔC_T -Werte ergab einen Koeffizienten $r = 0,8075$ mit $p < 0,0001$.

3.3.1.6 Korrelationen der ERBB-Rezeptoren mit dem Ansprechen

Eine Spearman-Korrelationsanalyse sollte zur Bewertung der Wechselbeziehung zwischen der Genkopienzahl, der mRNA-Expression oder der Proteinkonzentration der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und dem Ansprechen auf eine Therapie führen.

Die Auswertung der Gen- und Proteinexpression der ERBB-Rezeptoren in den 24 NSCLCs im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Cetuximab ergab eine schwache Korrelation zwischen Erlotinib und dem mRNA-Level des *ERBB2* sowie des *ERBB3*.

Erlotinib – <i>ERBB2</i> ΔC_T	Erlotinib – <i>ERBB3</i> ΔC_T
r = 0,467	r = 0,42
p = 0,02	p = 0,04

Fazit: Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Genkopienzahl des EGFR in den Modellen Werte zwischen 2 und 9 annahm. Die Expression des EGFR konnte auf mRNA- und Proteinebene in allen Modellen nachgewiesen werden. Er war jedoch weder auf Gen- noch auf Proteinebene überexprimiert, wie der Vergleich zur EGFR-überexprimierenden Kontrolle A431 deutlich machte. Die mRNA-Expression des *ERBB2* und *ERBB3* lag auf einem ähnlichen Level wie die *EGFR*-mRNA. *ERBB4*-mRNA ließ sich in neun Xenografts nicht nachweisen und auch die anderen Modelle besaßen nur ein schwaches Expressionsniveau. Ebenso ließen sich die anderen ERBB-Rezeptoren *ERBB2*, *ERBB3* und *ERBB4* auf einem eher geringen Proteinlevel detektieren. Der Einsatz einer 5-fach höheren Gesamtproteinmenge als normal führte nicht zu einem Nachweis der Rezeptoren in einigen Modellen. Besonders deutlich wurde dies beim *ERBB4*-Protein, das von nur einem Xenograft gebildet wurde. Aufgrund der allgemein schwachen Proteinexpression konnte die Bildung von Homo- oder Heterodimeren nicht beurteilt werden.

Die statistische Analyse der Daten ergab eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *ERBB2* und *ERBB3*. Des Weiteren korrelierte das Ansprechen auf Erlotinib mit dem mRNA-Level von *ERBB2* als auch *ERBB3*.

3.3.2 Liganden des EGFR

Verschiedene Liganden binden an den EGFR oder weitere Mitglieder der ERBB-Proteinfamilie, aktivieren diese durch Phosphorylierung, was die nachfolgenden Signalkaskaden auslöst. Die Liganden werden vom normalen Gewebe ständig produziert, können aber auch vom Tumor selbst u. a. mit Hilfe eines autokrinen Loops überexprimiert und ausgeschüttet werden. Um eine Abhängigkeit des Tumorwachstums und/ oder -überlebens und daraus resultierende

Medikamentenresistenzen bewerten zu können, wurde ein mRNA- und Proteinexpressionsprofil der Liganden EGF, TGFA, AREG und EREG erstellt. Die Immunfluoreszenz wurde primär genutzt, um eine Aussage über die Verteilung der Liganden in den Zellen und im Gewebe zu treffen.

3.3.2.1 Epidermaler Wachstumsfaktor

Die mRNA des *EGF* konnte in allen Proben nachgewiesen werden. In dem Modell 7187 wurde der niedrigste ΔC_T -Wert ($\Delta C_T = 8$) beobachtet. Im Gegensatz dazu, zeigte das Modell 7466 eine geringere mRNA-Menge, was durch einen $\Delta C_T = 20$ deutlich wurde. In dem SCLC 7530 ließ sich ebenfalls ein hoher $\Delta C_T = 18$ detektieren.

Die EGF-Proteinkonzentration in den NSCLC Xenografts betrug im Mittel 26 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Gp}}$. In dem Modell 7187 wurde die höchste Konzentration mit 196 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Gp}}$ detektiert. In 10 der 24 NSCLC Modelle wurden Werte unter 10 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Gp}}$ gemessen. Mit einer Proteinmenge von 4 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Gp}}$ enthielt das Xenograft 7558 fast 57-fach weniger Protein als das Modell 7187. Das SCLC 7530 exprimiert ebenfalls nur wenig Protein (5 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Gp}}$).

Die Immunfluoreszenz ergab eine EGF-Markierung im gesamten Zytoplasma der Zellen mit einer unterschiedlichen Signalintensität.

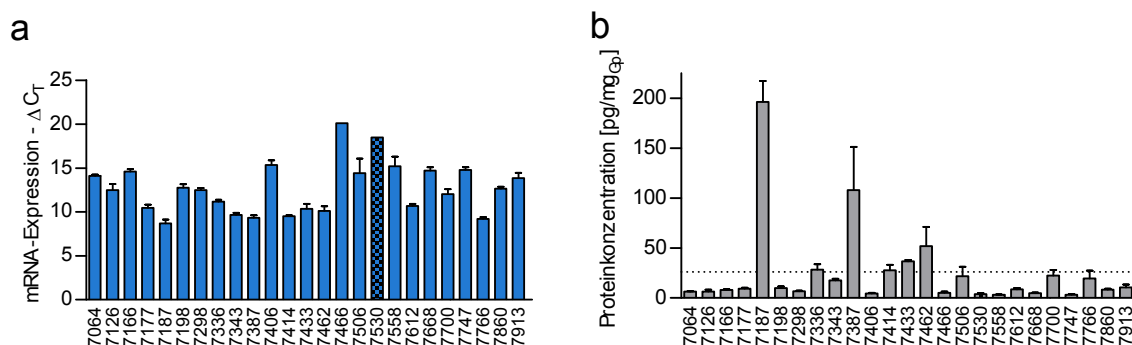


Abb. 35: **mRNA- und Proteinexpression von EGF.** Die mRNA-Expression (a) wurde mittels TaqMan-PCR und die Proteinexpression (b) mittels ELISA gemessen. Die gepunktete Linie markiert die mittlere Proteinkonzentration. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Die Auswertung der ΔC_T -Werte und der Proteinkonzentration des EGF ergab eine eindeutige inverse Korrelationen, was durch den Spearman-Koeffizienten $r = -0,81$ ($p < 0,0001$) ausgedrückt wurde.

3.3.2.2 Transformierender Wachstumsfaktor A

Das mRNA-Expressionsprofil von *TGFA* war relativ homogen. 22 Modelle wiesen einen $\Delta C_T < 10$ auf. Der niedrigste Wert ($\Delta C_T = 6$) wurde in dem Xenograft 7343 gemessen. In den Xenografts 7462 und 7198 wurden die beiden höchsten ΔC_T -Werte (14 bzw. 10) detektiert. Das SCLC 7530 enthielt einen ähnlichen Wert mit $\Delta C_T = 14$.

In den NSCLC Modellen betrug die durchschnittliche TGFA-Proteinkonzentration 16 pg/mg_{Gp}. Eine geringe Proteinmenge mit nur 3 pg/mg_{Gp} wurde in dem Modell 7462 gefunden. Eine ca. 20-fach höhere Konzentration ließ sich in dem Xenograft 7913 mit 51 pg/mg_{Gp} messen. Das SCLC 7530 wies mit nur 1 pg/mg_{Gp} die geringste Proteinkonzentration auf.

TGFA wurde mit Hilfe der IF positiv im Zellplasma markiert, jedoch wurde ein stärkeres Signal an der Zellmembran beobachtet.

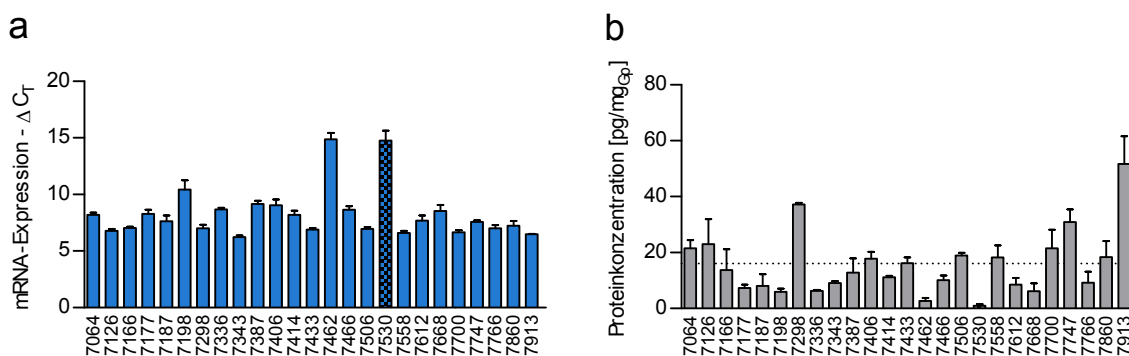


Abb. 36: **mRNA- und Proteinexpression von TGFA.** Die mRNA-Expression (a) wurde mittels TaqMan-PCR und die Proteinexpression (b) mittels ELISA analysiert. Die gepunktete Linie markiert die mittlere Proteinkonzentration. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman ermittelte einen inversen Zusammenhang zwischen der mRNA- und Proteinkonzentration des TGFA. Der Koeffizient war -0,60 mit $p = 0,0019$.

3.3.2.3 Amphiregulin

Die ΔC_T -Werte der NSCLC Proben lagen zwischen 5 (7387) und 11 (7343). Annähernd die Hälfte der Modelle wiesen einen $\Delta C_T < 10$ auf. Die geringste *AREG*-mRNA-Menge wurde in dem SCLC 7530 beobachtet ($\Delta C_T = 17$).

Die NSCLC Modelle enthielten eine mittlere *AREG*-Proteinkonzentration von 561 pg/mg_{Gp} auf. Die beiden höchsten Konzentrationen wurden in dem Xenograft 7387 (3802 pg/mg_{Gp}) und dem Xenograft 7700 (3632 pg/mg_{Gp}) detektiert. Im Vergleich dazu zeigte das Modell 7766 eine ca. 100-fach geringere Expression (37 pg/mg_{Gp}). In dem SCLC 7530 wurde mit 10 pg/mg_{Gp} die geringste *AREG*-Menge gemessen.

Die IF ergab eine diffuse Färbung des Zytoplasmas mit stärkeren Signalen in Nähe der Zellmembranen.

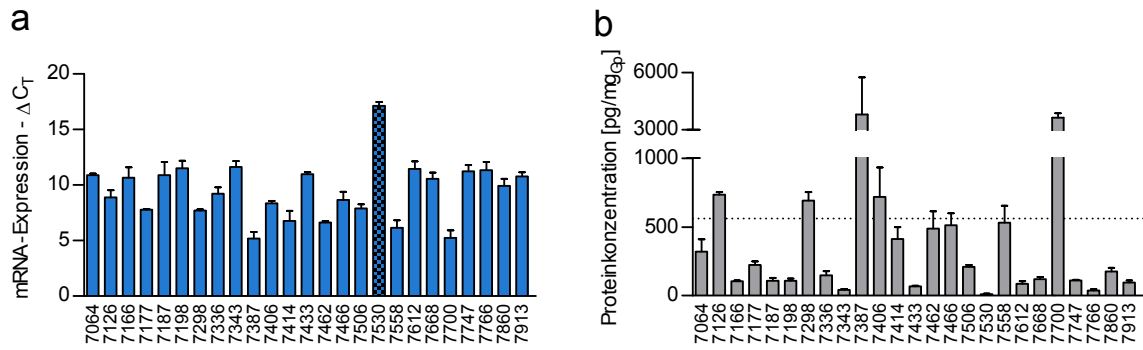


Abb. 37: **mRNA- und Proteinexpression von AREG.** Die mRNA-Expression (a) wurde mittels TaqMan-PCR und die Proteinexpression (b) mittels ELISA analysiert. Die gepunktete Linie markiert die mittlere Proteinkonzentration. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Zwischen der mRNA- und Proteinexpression von AREG wurde ein Spearman-Koeffizient $r = -0,85$ ($p < 0,0001$) ermittelt. Somit war zwischen der mRNA- und der Proteinmenge ein starker positiver Zusammenhang vorhanden, d.h. das Proben mit viel mRNA auch viel Protein aufwiesen.

3.3.2.4 Epiregulin

EREG-mRNA konnte in 22/24 NSCLC nachgewiesen werden. Die Modelle 7166 und 7766 exprimierten keine mRNA. Der höchste ΔC_T (18) befand sich in dem Modell 7198 und der niedrigste in dem Lysat von 7700 (5). Für das SCLC 7530 wurde ein ΔC_T -Wert von 17 ermittelt. Das EREG-Protein wurde in allen Modellen detektiert. Die mittlere Konzentration in den NSCLCs betrug 31 pg/mg_{Gp}. In dem Modell 7064 ließ sich die höchste Menge an Protein detektieren und die geringste Menge wurde in dem NSCLC 7166 gemessen. Das SCLC enthielt eine Proteinkonzentration von 29 pg/mg_{Gp}.

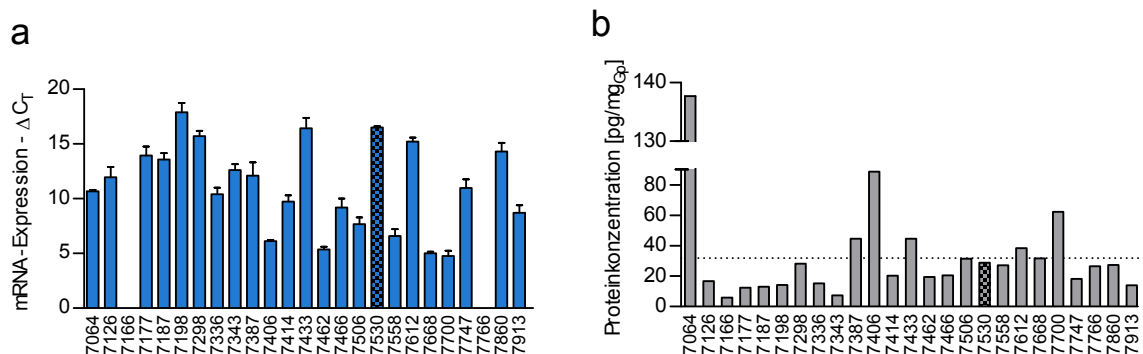


Abb. 38: **mRNA- und Proteinexpression von EREG.** Die mRNA-Expression (a) wurde mittels TaqMan- und die Proteinexpression (b) mittels ELISA analysiert. Die gepunktete Linie markiert die mittlere Proteinkonzentration. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

3.3.2.5 Korrelationen innerhalb der Liganden und mit dem EGFR

Mögliche Verknüpfungen zwischen der mRNA- und der Proteinexpression sollten in einer Korrelationsanalyse aufgezeigt werden. Dazu wurden die Liganden auf mRNA- und Proteinebene untereinander korreliert.

Eine Spearman-Korrelationsanalyse in den NSCLCs ergab zwischen der mRNA-Expression der Liganden *AREG* und *EREG* eine schwache Wechselbeziehung ($r = 0,488$, $p = 0,02$). Xenograftmodelle mit einer geringen *AREG*-mRNA-Menge enthielten wenig *EREG*-mRNA.

Eine weitere schwache Korrelation ($r = 0,470$, $p = 0,02$) wurde auf Proteinebene zwischen dem EGFR und seinem Liganden EREG beobachtet. In Modellen mit einer hohen EGFR-Konzentration wurde mehr EREG-Protein nachgewiesen.

Fazit: Grundsätzlich ließen sich die Liganden EGF, TGFA und AREG in allen Modellen auf Gen- und Proteinebene nachweisen. Ein homogenes Genexpressionsprofil verbunden mit der durchschnittlich höchsten mRNA-Menge wurde bei *TGFA* beobachtet. Die Modelle enthielten eine mittlere *AREG*-mRNA-Menge mit einem heterogenen Profil und eine geringe *EGF*-mRNA-Konzentration. EREG besaß das heterogenste mRNA-Profil und ließ sich in zwei Modellen nicht nachweisen, während das Protein in allen Xenografts detektiert wurde. Bei dem Vergleich der weiteren Proteinprofile wurde eine starke Heterogenität deutlich. Innerhalb der Modelle waren Konzentrationsunterschiede der Proteine von 57-fach bei EGF, 20-fach bei TGFA, 100-fach bei AREG und 23-fach bei EREG vorhanden.

Eine Korrelationsanalyse ergab einen Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression der Liganden *AREG* und *EREG*. Des Weiteren war die EGFR-Proteinkonzentration mit der EREG-Proteinmenge assoziiert.

3.3.3 Ausgewählte EGFR-,Downstream'-Signalwege

Nach der Aktivierung und der Phosphorylierung des EGFR bzw. anderer Mitglieder der ERBB-Proteinfamilie können die Signale durch unterschiedliche Kaskaden weitergeleitet werden. Eine fortwährende intrinsische Aktivierung oder auch Hemmung eines Signalweges könnte das Überleben oder Wachstum der Tumorzellen (besonders unter Therapie) beeinflussen. Die in diesem Zusammenhang drei häufigsten in der Literatur diskutierten Signalwege, JAK-STAT, MAPK und AKT wurden ausgewählt und einzelne Proteine dieser Wege mit Hilfe des Immunoblots analysiert.

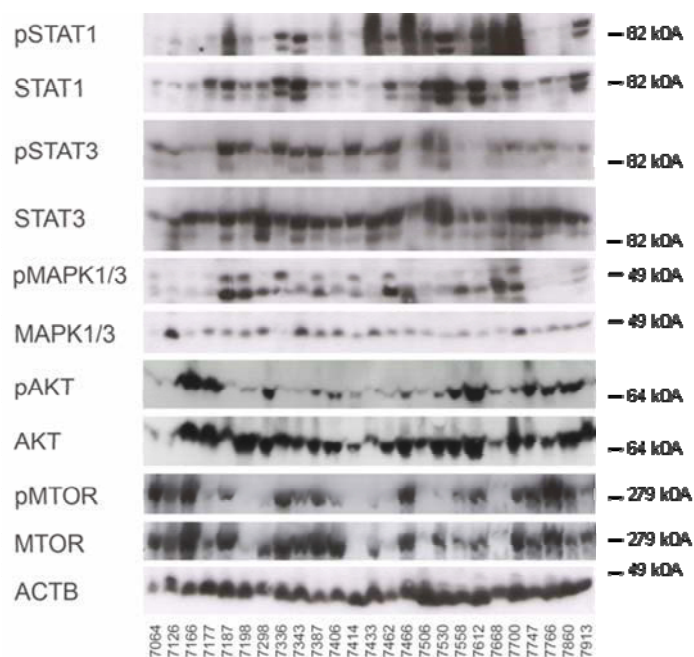


Abb. 39: **Proteinexpression von STAT1, STAT3, MAPK1/3, AKT und MTOR sowie deren phosphorylierte Formen.** Die Proteinexpression wurde mit Hilfe eines Immunoblots analysiert.

Die Nachweise der Proteine STAT, STAT3, MAPK1/3, AKT und MTOR sowie deren phosphorylierte Formen erlaubten keine Erstellung eindeutiger Profile. Die phosphorylierten Formen von STAT1 und STAT3 zeigten jeweils individuelle Profile. Die Expression von STAT1 war in den Modellen relativ heterogen, während STAT3 auf einem ähnlichen Intensitätsniveau in allen Modellen nachgewiesen wurde. Analog verhielt es sich bei der Proteinexpression der MAPK1/3. Bei der phosphorylierten Form wurde in elf Modellen eine schwache und in sieben Modellen eine starke Expression festgestellt. Mit Ausnahme der Modelle 7126, 7343 und 7700, die eine etwas höhere Proteinkonzentration aufwiesen, war die Bandenstärke von MAPK1/3 in den übrigen Xenografts vergleichbar. Eine Expression von pAKT und AKT fand in allen Modellen statt, wobei phosphoryliertes AKT in zehn Modellen nur schwach exprimiert wurde und AKT eine mäßige bis starke Expression aufwies. Der Nachweis von pMTOR war in 23 Modellen und von MTOR in 24 Modellen erfolgreich. Das Modell 7414 enthielt weder MTOR noch deren phosphorylierte Form.

Zwischen der Proteinexpression und dem Ansprechen auf die EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Cetuximab wurden keine Zusammenhänge gefunden, da sich keine gruppenübergreifenden Signalwege identifizieren ließen, die vermehrt aktiviert oder inhibiert waren.

3.3.4 EGFR-,Downstream'-Signalwege nach einer anti-EGFR-Therapie

Die Proteinexpression nach einer anti-EGFR-Behandlung wurde in zehn NSCLC Modellen untersucht, um mögliche Regulationsmechanismen nach einer Therapie bewerten zu können.

Hierzu wurden Modelle ausgewählt, die sensitiv gegenüber Erlotinib *und* Cetuximab waren (7064, 7466) sowie Modelle, die nur auf Cetuximab ansprachen (7126, 7462). Das Panel wurde durch sechs weitere Modelle (7166, 7343, 7406, 7433, 7612, 7700) ergänzt, die resistent gegenüber beiden Medikamenten waren.

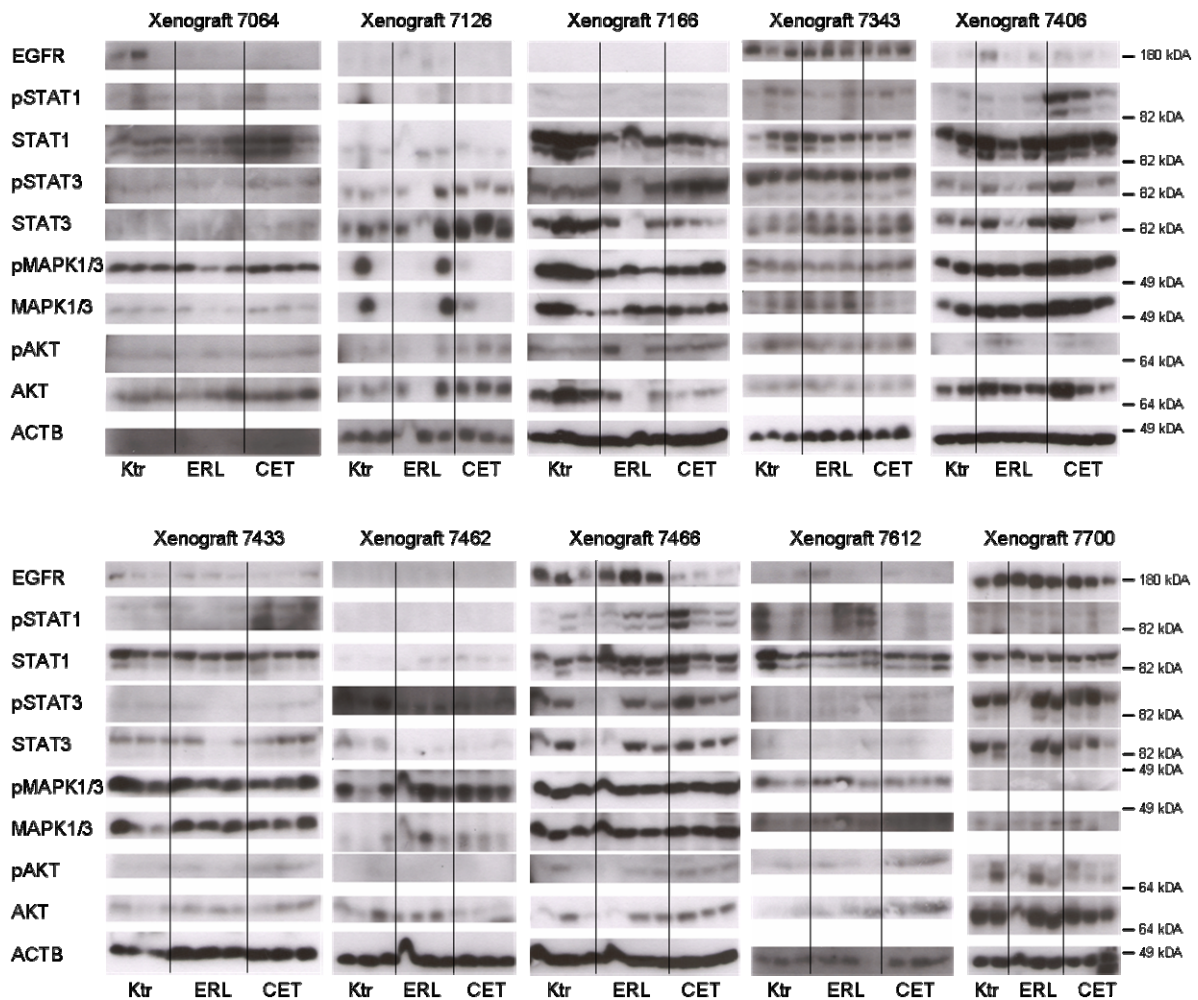


Abb. 40: Proteinnachweis von EGFR, STAT1, STAT3, MAPK1/3 und AKT in zehn NSCLC Modellen nach Therapie. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe eines Immunoblots analysiert. Ktr - Kontrolle, ERL - Erlotinib, CET - Cetuximab

Eine durch die Behandlung induzierte veränderte Proteinmenge des EGFR ließ sich in den sensitiven Modellen 7064, 7126 und 7466 beobachten. In dem Modell 7064 wurde eine verringerte Menge an Protein in der Erlotinib und in der Cetuximab behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert. Cetuximab induzierte eine verringerte Proteinkonzentration des EGFR in den Modellen 7126 und 7466. Es fand keine Änderung der Proteinkonzentration in den anderen sieben Modellen statt.

Mit einer erhöhten Expression in der Cetuximab Gruppe wurde pSTAT1 nur in dem Modell 7406 reguliert. Die übrigen neun Modelle zeigten keine Veränderungen. Die Proteinkonzentration von STAT1 blieb in allen Modellen, unabhängig von der Behandlung unverändert. Das phosphorylierte

und unphosphorylierte Protein STAT3 wurde in dem Modell 7126 geringfügig höher nach einer Cetuximab-Therapie exprimiert. Dagegen wurde STAT3 in den Modellen 7166 und 7700 geringfügig niedriger in der Cetuximab behandelten Gruppe nachgewiesen. In dem Modell 7166 ließ sich eine leicht verringerte Proteinexpression von pMAPK1/3 und MAPK1/3 durch die Therapie beobachten. Die Proteinanalyse ergab, dass pAKT und AKT in keinem Modell differenziell exprimiert war.

Fazit: Die ausgewählten Modelle zeigten individuelle Proteinexpressionsprofile. Das Ansprechen auf eine EGFR-Therapie kann nicht durch eine allgemeingültige Aktivierung bzw. Hemmung der hier untersuchten Signalwege oder der intrinsischen Proteinexpression erklärt werden.

3.3.5 Genexpressionsstudien zur Therapieoptimierung in Erlotinib Non-Respondern

Ein Teil der Patienten profitiert nicht von den neuen und viel versprechenden anti-EGFR-Therapien durch eine Erlotinib- oder Cetuximab-Behandlung. Unter Umständen sind bestimmte Signalwege in diesen Patienten aktiviert oder inhibiert, die einen Vorteil durch eine Kombinationsbehandlung erfahren können. Signalwege oder einzelne Gene aus Funktionskreisen, für die eine Zusatztherapie empfohlen werden kann, sollten identifiziert werden.

Es wurde eine vergleichende Genexpressionsstudie mit den Affymetrix® Genechips® in Bezug auf das Ansprechen auf Erlotinib durchgeführt. Dazu wurden die NSCLC Modelle entsprechend ihrem T/C-Wert in Responder (T/C < 30%; n=3) und Non-Responder (T/C > 30%; n=21) eingeteilt. Die eingesetzten Filterkriterien waren ein FoldChange > | 1,5 | und ein Signifikanzwert von $p < 0,005$. Die Analyse ergab, dass 3176 Probesets, die 2337 Gene repräsentierten, differenziell exprimiert wurden. Einige Gene ließen sich in einer Analyse Signalwegen unterschiedlichsten Funktionskreisen zuordnen, die z.B. in die Signalübertragung involviert waren: ‚PI3K/AKT signaling‘, ‚Androgen-mediated signaling‘, ‚CREB phosphorylation through the activation of Ras‘ und ‚eukaryotic protein translation‘. Es wurden auch Signalwege identifiziert, die einen Zusammenhang zur Apoptose aufwiesen: ‚opposing roles of aif in apoptosis and cell survival‘ und ‚induction of apoptosis through dr3 and dr4/5 death receptors‘. Veränderungen des Sauerstoffgehalts in den Zellen deuteten die Signalwege ‚HIF1A transcription factor network‘, ‚hypoxic and oxygen homeostasis regulation of HIF1A‘ und ‚EPHA2 forward signaling‘ an.

Bei der detaillierten Analyse wurde nach Genen aus Funktionskreisen gesucht, gegen die ein zugelassenes Medikament verfügbar war. Folgende Gene wurden identifiziert:

Gensymbol	Probeset ID	Korrigierter p-Wert	p-Wert	Regulation im Non-Responder	Fold-Change	Medikament
ERBB2	216836_s_at	4,97E-03	5,28E-04	↓	2,30	Trastuzumab
IL6	205207_at	9,56E-04	4,41E-05	↓	10,26	Tocilizumab
SRC	213324_at	1,33E-03	7,46E-05	↑	2,55	Dasatinib
TNFRSF12A	218368_s_at	1,51E-03	9,00E-05	↓	4,20	Golimumab
VEGFA	210512_s_at	1,22E-03	6,47E-05	↑	2,16	Bevacizumab
VEGFA	210513_s_at	4,29E-04	1,08E-05	↑	2,30	Bevacizumab
VEGFA	211527_x_at	2,04E-03	1,43E-04	↑	2,43	Bevacizumab
VEGFA	212171_x_at	1,69E-03	1,08E-04	↑	2,41	Bevacizumab

Tab. 15: **Differenziell exprimierte Gene aus Funktionskreisen**, gegen die zugelassene Medikamente zur Verfügung standen. Die Modelle wurden in Responder und Non-Responder gruppiert und in einer vergleichenden Analyse (Mann-Whitney Test, $p < 0,005$, $\text{FoldChange} > |1,5|$) wurden 3176 Probesets identifiziert.

Die Expression der Gene *ERBB2*, *IL6* und *TNFRSF12A* war in den Non-Respondern verringert. Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase SRC und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGFA) zeigten eine erhöhte Expression in den Non-Respondern und wurden einer weiteren Prüfung unterzogen. Das Medikament Dasatinib hemmt die Tyrosinkinaseaktivität der BCR-ABL-Fusionskinase sowie die der SRC-Kinase und wird zur Behandlung gegen chronische myeloische Leukämie und Philadelphia-Chromosom-positive akute lymphatische Leukämie eingesetzt [198-200]. Der Antikörper Bevacizumab bindet selektiv an VEGFA und hemmt die Angiogenese. Er erhielt bereits eine Zulassung zur Erstlinientherapie von metastasiertem und fortgeschrittenem Kolonkarzinom und inoperablem, fortgeschrittenem, metastasiertem oder rezidiviertem Lungenkarzinom (mit Ausnahme des Plattenepithelkarzinoms) in Kombination mit platinhaltigen Chemotherapeutika [14]. Aufgrund der unterschiedlichen Anwendungen und Einsatzgebiete der beiden Medikamente wurde Bevacizumab für eine Kombinationstherapie ausgewählt. Darauf aufbauend fand eine Initiation der Kombinationsversuche mit Erlotinib und Bevacizumab statt.

3.4 Anti-angiogene Therapie

3.4.1 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A

Die Hemmung der Angiogenese beruht auf der Bindung des Antikörpers Bevacizumab an den angiogenen Wachstumsfaktor VEGFA, wodurch die Neo-Angiogenese des Tumors unterbunden wird. Da VEGFA das Zielmolekül ist, wurde die intrinsische *VEGFA*-mRNA-Expression und das Protein VEGFA untersucht.

Es wurde eine *VEGFA*-mRNA-Expression mit ΔC_T -Werten zwischen 1 (7187) und 7 (7064) ermittelt, was einem 64-fachen Expressionsunterschied entspricht.

Die mittlere VEGFA-Proteinmenge betrug 0,7 pg/ μg_{Gp} in den NSCLC Modellen. Das Modell 7126 wies mit 0,1 pg/ μg_{Gp} die geringste und das Modell 7913 mit 1,8 pg/ μg_{Gp} die höchste Proteinkonzentration auf.

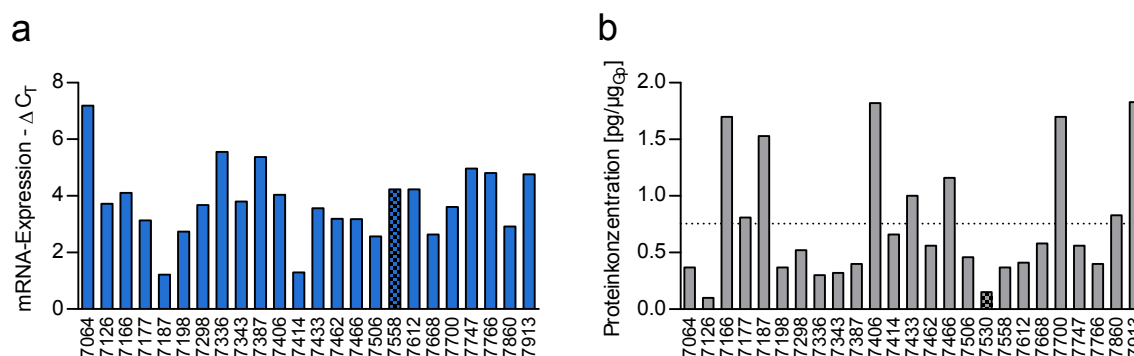


Abb. 41: **VEGFA-mRNA- und Proteinexpression.** Die mRNA-Expression (a) wurde mittels TaqMan-PCR und die Proteinexpression (b) mit einem ELISA analysiert. Die gepunktete Linie markiert die mittlere Proteinkonzentration.

Zwischen der mRNA- und Proteinexpression von VEGFA wurde eine schwache inverse Korrelation gefunden. Die Spearman-Korrelationsanalyse ergab einen Koeffizienten von $r = 0,442$ ($p = 0,03$).

3.4.2 Kombination von Erlotinib und Bevacizumab zur Therapieoptimierung

Aufgrund der Genexpressionsanalysen bezüglich des Erlotinib-Ansprechens wurde eine Kombinationsbehandlung mit Bevacizumab durchgeführt. Sechs Modelle mit unterschiedlichen Ansprechraten auf Erlotinib wurden ausgewählt und über einen Zeitraum von zwei Wochen mit Erlotinib, Bevacizumab und einer Kombination aus beiden Medikamenten behandelt. Eine erneute Behandlung der Tiere mit den jeweiligen Medikamenten 24 h vor dem Versuchsende sollte helfen, mögliche Regulationsmechanismen zu identifizieren.

3.4.2.1 Wachstumskurven der Kombinationsversuche

Drei der sechs Modelle zeigten ein nur minimal vermindertes Tumorwachstum unter einer Erlotinib-Therapie. Bevacizumab verlangsamte in allen Modellen das Tumorwachstum, von denen die drei Modelle 7126, 7462 und 7860 eine signifikante Hemmung zeigten. Eine weitere Reduktion des Tumolvolumens wurde durch die Kombination von Erlotinib und Bevacizumab in allen Modellen beobachtet. Diese Inhibition war in allen Modellen signifikant ($p < 0,05$).

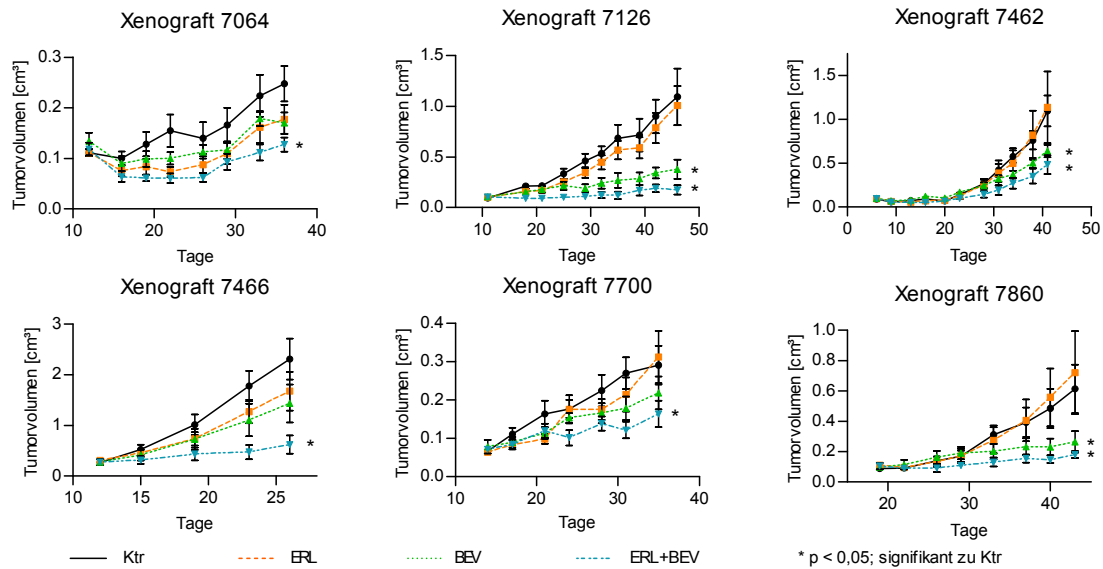


Abb. 42: **Wachstumskurven** von sechs NSCLC Modellen, die mit Erlotinib (ERL), Bevacizumab (BEV) und in Kombination (ERL+BEV) behandelt wurden. Das mediane Tumorzellen wurde gegen die Tage nach Beginn der Tumortransplantation aufgetragen.

3.4.2.2 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A nach Therapie

Zunächst wurde die mRNA- und Proteinexpression von VEGFA, als das Zielmolekül, nach einer Bevacizumab Therapie untersucht.

Die VEGFA-mRNA-Expression war in der Erlotinib behandelten Gruppe in vier Modellen (7064, 7126, 7462 und 7700) verringert, während sie in den zwei Modellen (7466 und 7860) leicht erhöht war. Mit Ausnahme von 7064 wurde in allen Modellen in der Bevacizumab-Gruppe eine Zunahme der VEGFA-mRNA-Menge beobachtet, die in dem Xenograft 7466 signifikant war. Dieser Trend wurde mit einer Kombinationsbehandlung in den Modellen 7126, 7700 und 7860 nochmals verstärkt. Die statistische Analyse bestätigte, dass eine signifikante Zunahme der mRNA in der Kombinationsgruppe der Modelle 7126, 7466, 7700 und 7860 stattfand. In den Modellen 7126, 7700 und 7860 war diese Steigerung auch im Vergleich zur Erlotinib-Gruppe signifikant.

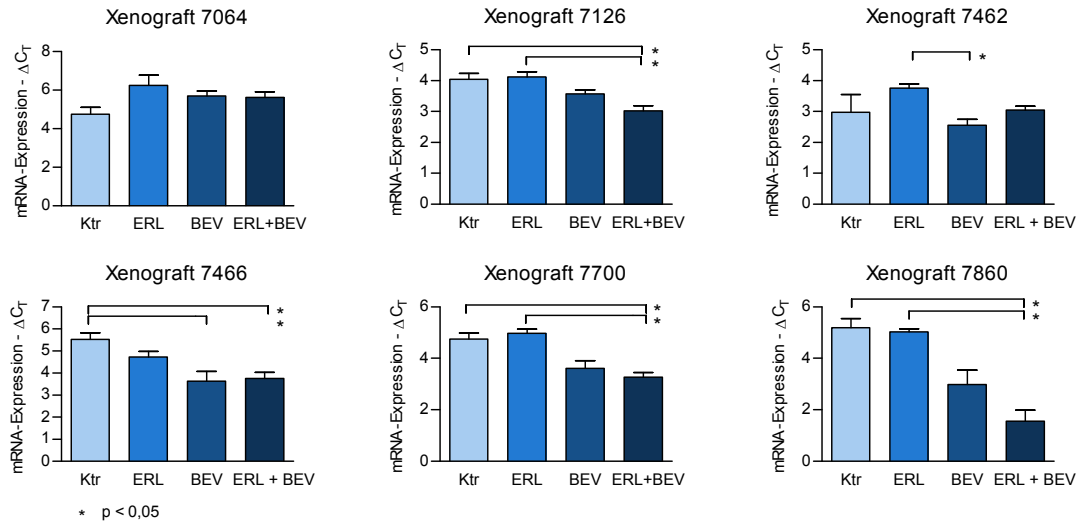


Abb. 43: **VEGFA-mRNA-Expression** in sechs NSCLC Modellen nach Erlotinib (ERL), Bevacizumab (BEV) und Kombinationstherapie (ERL+BEV). Die mRNA-Expression wurde mittels TaqMan-PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Mit Ausnahme des Modells 7126 nahm die Proteinkonzentration von VEGFA in den Modellen der Erlotinib und der Bevacizumab behandelten Gruppen ab. In den Xenografts 7462 und 7700 war diese für Bevacizumab signifikant. Eine weitere (signifikante) Reduktion der Proteinkonzentration durch die Kombinationsbehandlung wurde in den Modellen 7064 und 7466 beobachtet. In den Xenografts 7462, 7700 und 7860 wurde eine ähnliche oder leicht erhöhte Konzentration gemessen. Einzig das Modell 7126 zeigte eine leicht erhöhte Proteinexpression in der Erlotinib- und Bevacizumab-Gruppe sowie eine unveränderte VEGFA-Konzentration in der Kombinationsgruppe.

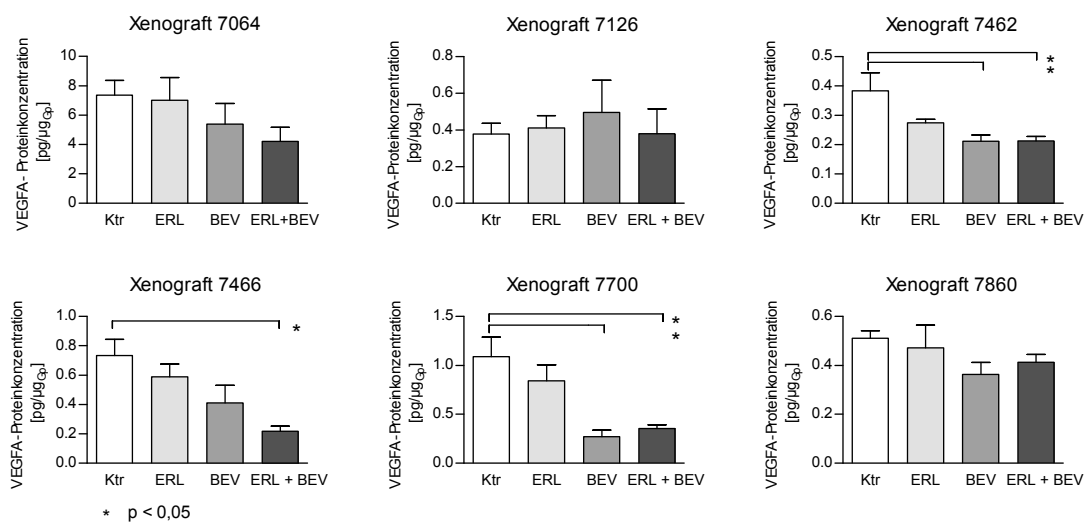


Abb. 44: **VEGFA-Protein nachweis** in sechs NSCLC Modellen nach Erlotinib (ERL), Bevacizumab (BEV) und Kombinationstherapie (ERL+BEV). Die Proteinkonzentration wurde in einem ELISA ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

3.4.2.3 Die Angiogenese nach Therapie

Da die Expression von VEGFA allein keine Rückschlüsse auf die Blutgefäßbildung und -anzahl zulässt, wurden immunhistochemisch die Blutgefäße mit einer CD31-Färbung analysiert. CD31 markiert die Endothelzellen der Blutgefäße positiv.

Der Vergleich zur Kontrolle zeigte in den Modellen 7064, 7126, 7462, 7700 und 7860 eine Verringerung der Blutgefäßzahl in der Erlotinib und stärker in der Bevacizumab behandelten Gruppe. Dagegen wurde in dem Modell 7466 eine Zunahme der Blutgefäße nach der Erlotinib-Behandlung beobachtet. Mehrheitlich, in 5/6 Modellen, konnte die Kombinationstherapie die Blutgefäßanzahl am stärksten reduzieren. In dem Modell 7064 war die Reduzierung signifikant. Das Modell 7462 wies in der Kombinationsgruppe eine ähnliche Blutgefäßanzahl wie die Bevacizumab-Gruppe auf.

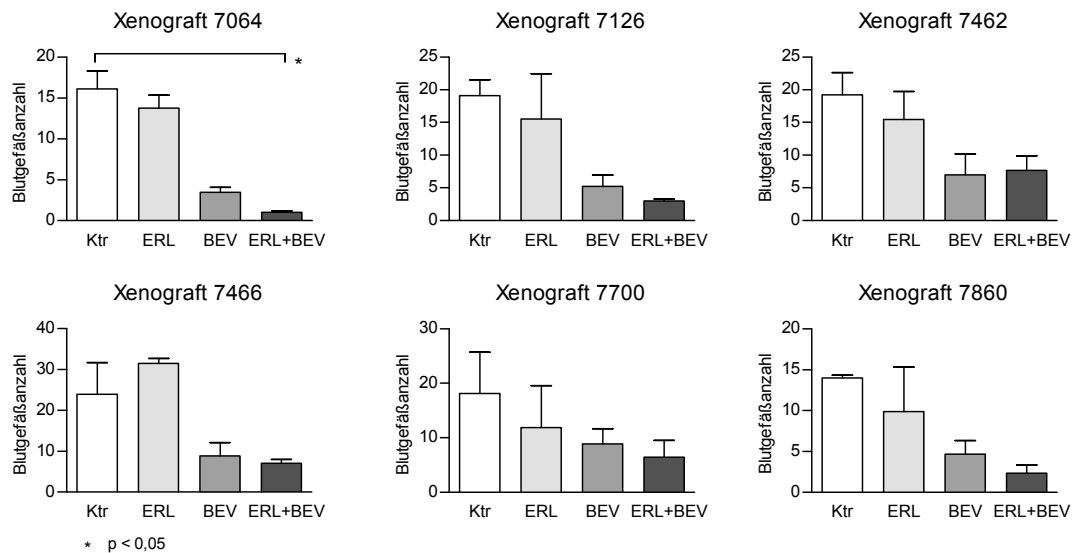


Abb. 45: **Anzahl der Blutgefäße** in sechs NSCLC Modellen nach Erlotinib (ERL), Bevacizumab (BEV) und Kombinationstherapie (ERL+BEV). Die Blutgefäßzahl im gesamten Tumor wurde durch eine CD31-Färbung in der IHC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

3.4.2.4 Analyse der Hypoxie nach Therapie

Die Behandlung mit Bevacizumab kann in dem Tumor die Entstehung einer Hypoxie durch eine Verminderung der Blutgefäß(bildung) fördern. Diese kann u. a. durch die Expression von HIF1A gekennzeichnet sein, das in der Lage ist, die Transkription von pro-angiogenen Faktoren wie VEGFA zu induzieren. Um die Aktivierung des Signalweges zu untersuchen, wurde **HIF1A** auf mRNA-Ebene analysiert.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte das Modell 7064 als einziges eine Abnahme des **HIF1A**-mRNA-Levels in allen Behandlungsgruppen. In dem Modell 7126 wurde ein leichte Zunahme der mRNA-

Menge unter der Mono- und der Kombinationstherapie beobachtet. In den Modellen 7462 und 7860 war die *HIF1A*-Expression in der Erlotinib-Gruppe leicht erhöht und in der Bevacizumab-Gruppe wurde minimal weniger mRNA gemessen. In der Kombinationsgruppe von 7860 wurde keine mRNA nachgewiesen, da möglicherweise ein zu geringer Anteil an vitalem Gewebe in den Tumoren vorhanden war. In den zwei Modellen 7466 und 7700 stieg die mRNA-Menge jeweils in allen drei Gruppen um eine ähnliche Menge an. Die gemessenen Veränderungen in den Modellen waren nicht signifikant.

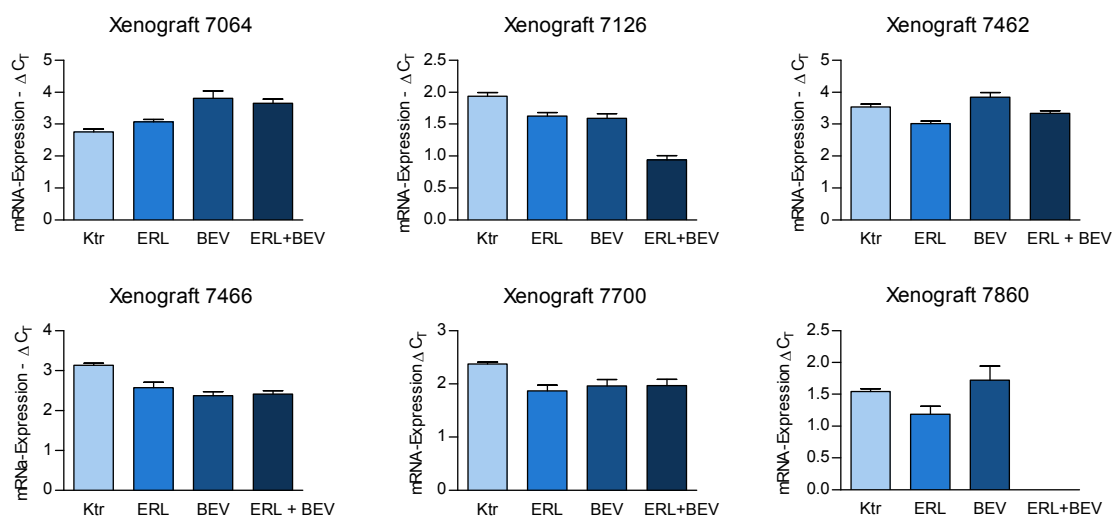


Abb. 46: **HIF1A-mRNA-Expression** in sechs NSCLC Modellen nach Erlotinib (ERL), Bevacizumab (BEV) und Kombinationstherapie (ERL+BEV). Die mRNA-Expression wurde mittels einer Realtime PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Die Transkription der **Carboanhydrase 9 (CA9)** und VEGFA werden beide durch HIF1A reguliert. Eine Analyse der CA9 sollte Aufschluss geben, ob VEGFA und CA9 mit einem ähnlichen Niveau transkribiert werden.

Die mRNA-Expression der *CA9* war für jedes Modell individuell. In Xenograft 7064 nahm die mRNA-Menge in allen drei behandelten Gruppen leicht ab. In dem Modell 7126 wurde weniger *CA9*-mRNA in der Erlotinib und Bevacizumab Gruppe gemessen, indes in der Kombinationsgruppe ein Anstieg stattfand. Die Behandlungsgruppen von 7462 zeigten ein ähnliches Expressionsniveau wie die Kontrolle. Gleichzeitig wies dieses Modell die niedrigste *CA9*-Expression auf. Das Modell 7466 zeigte eine erhöhte *CA9*-mRNA-Menge in der Erlotinib-Monotherapie und Kombinationsgruppe. Eine weitere Steigerung der mRNA wurde unter einer Bevacizumab-Behandlung beobachtet. Eine (stetige) Zunahme der *CA9*-mRNA ließ sich in allen drei Behandlungsgruppen des Modells 7700 nachweisen. Das Modell 7860 zeigte eine verminderte mRNA-Expression in den Monotherapien. In der Kombinationsgruppe konnte keine mRNA nachgewiesen werden, da wahrscheinlich ein zu wenig vitales Gewebe in den Tumoren

verfügbar war. Die ermittelten Unterschiede in den mRNA-Konzentrationen aller Modelle waren nicht signifikant.

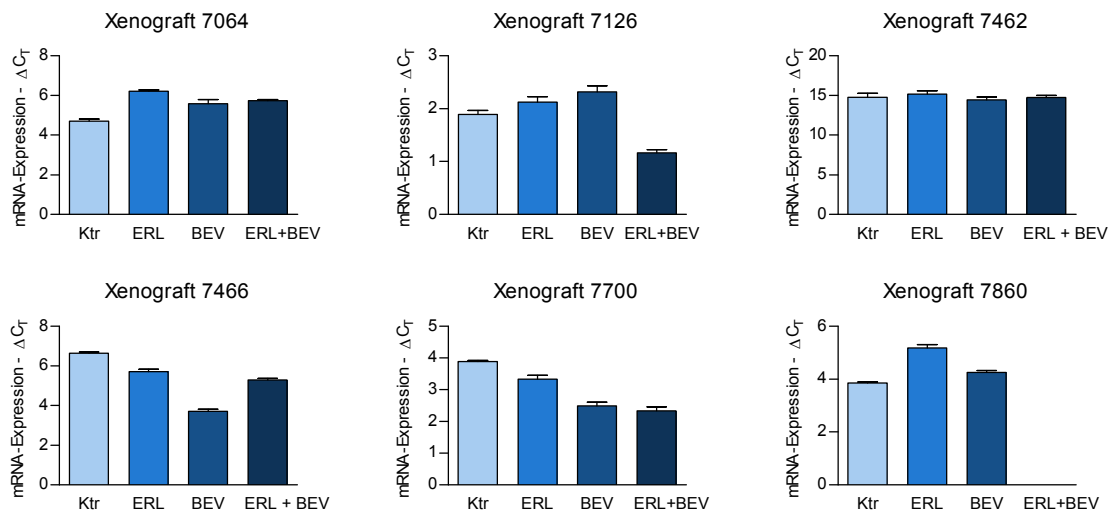


Abb. 47: **CA9-mRNA-Expression** in sechs NSCLC Modellen nach Erlotinib (ERL), Bevacizumab (BEV) und Kombinationstherapie (ERL+BEV). Die mRNA-Expression wurde mittels einer RealTime PCR analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Fazit: Die Kombinationstherapie Erlotinib-Bevacizumab war in den sechs untersuchten Modellen der Monotherapie überlegen, was durch eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums deutlich wurde. Die Kombinationstherapie führte zu einer (signifikanten) Reduktion von VEGFA auf mRNA- und Proteinebene in den Modellen. Eine Reduktion der Blutgefäßzahl wurde in der Erlotinib und stärker in der Bevacizumab behandelten Gruppe beobachtet. Die geringste Anzahl an Blutgefäßen wurde nach einer Kombinationstherapie nachgewiesen. Die mRNA-Analysen von *HIF1A* und *CA9* ergaben, dass in den Tumoren keine Hypoxie durch die Mono- oder Kombinationstherapie induziert wurde.

4. DISKUSSION

4.1 Identitäts- und Repräsentationsanalyse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Teil verschiedene Ziele verfolgt: Zur Überprüfung der Identität sollten die etablierten Xenograftmodelle mit den korrespondierenden Patiententumoren verglichen werden. Dies sollte das Wachstumsverhalten und einen Vergleich der Phänotypen beinhalten, die auf mRNA- und Proteinebene analysiert wurden. Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit bestand darin, (lungen)krebsassoziierte Gene zu untersuchen und ein Sensitivitätsprofil der Modelle für die vier Zytostatika Carboplatin, Etoposid, Paclitaxel und Gemcitabin sowie für die drei zielgerichteten Therapien Erlotinib, Cetuximab und Bevacizumab zu erstellen, um die Repräsentation als klinische Modelle zu überprüfen.

In einer primären Beurteilung der Tumore wurde die **Histologie** der Patienten und der abgeleiteten Xenografts miteinander verglichen, um den engrafteten Zelltyp histologisch einzuordnen. Von früheren Arbeiten dieser Gruppe mit Kolonkarzinomen war bereits bekannt, dass die patientenabgeleiteten Xenografts gut in der Histologie mit den Originaltumoren übereinstimmen [201]. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modelle zeigten ebenfalls eine vollständige histologische Übereinstimmung zwischen den Tumoren der Patienten und den abgeleiteten Xenografts. Damit wurde belegt, dass die engrafteten Tumorzellen dem gleichen histologischen Subtyp angehören wie der ursprüngliche Patiententumor. Es zeigte sich, dass auch die Wachstumsmorphologie des jeweiligen Primärtumors im Xenograft erhalten blieb. Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen anderer Gruppen, die bereits patientenabgeleitete Xenografts etablierten [185;189;202].

Die **Proliferationsrate** der Tumore wurde mit Hilfe einer Ki67-Färbung und der Wachstumsgeschwindigkeit beurteilt. Es wurde keine Korrelation zwischen dem Ki67-Nachweis und der Wachstumsgeschwindigkeit gefunden. Im Vergleich zum Primärtumor war die Anzahl Ki67-exprimierender Zellen in den Xenografts ähnlich oder leicht erhöht. Dies wird erklärt durch optimale Wachstumsbedingungen im immunsupprimierten Tier, die zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen führen und mit der Beschreibung von Steel *et al.* übereinstimmt [185]. Daran beteiligt ist auch die tumorinduzierte Neo-Angiogenese, die den Tumor mit Sauerstoff und den notwendigen Nährstoffen versorgt. Die Modelle zeigten ein heterogenes und individuell verschiedenes Wachstumsverhalten. Dies war zu erwarten, da die abgeleiteten Xenografts aus einem heterogenen Patientenquerschnitt der Klinik etabliert wurden und

demzufolge auch die Wachstumsgeschwindigkeit als ein individuelles Tumorcharakteristikum auf das Tier übertragen wurde.

Die Analyse **karzinomkennzeichnender Marker** im Patienten- sowie im abgeleiteten Xenografttumor sollte die Tumorzellen phänotypisch charakterisieren. Die intensiv untersuchten epithelialen Marker EPCAM und E-Cadherin wurden immunhistologisch in den Tumoren nachgewiesen. EPCAM markierte in allen NSCLC Modellen und dem SCLC ausschließlich die Tumorinseln der Patiententumore und der korrespondierenden Xenografts positiv. Dabei wurde eine intensive membranständige Färbung in den Patienten und den Xenografts in der Mehrzahl der Modelle beobachtet. Das NSCLC 7668 zeigte eine vergleichsweise schwache Proteinkonzentration. Das Expressionsprofil der *EPCAM*-mRNA stimmte im Wesentlichen mit dem Protein überein. Die Analyse von E-Cadherin führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Mit Ausnahme des NSCLCs 7668 und des SCLCs 7530 wurde E-Cadherin in allen Modellen nachgewiesen. Diese Resultate zeigen, dass die individuellen Tumormarker des Patienten in den engrafteten Tumorzellen im abgeleiteten Xenograft erhalten bleiben. Das Fehlen von E-Cadherin im NSCLC 7668 und dem SCLC 7530 kann mit den histologischen Charakteristika der Modelle erklärt werden. Von SCLC wurde beschrieben, dass sie weniger E-Cadherin-Protein exprimieren als das NSCLC [203]. Dieser Befund konnte auch in den Xenografts beobachtet werden. Das NSCLC Modell 7668 wurde pathologisch als entdifferenziertes, nicht klassifizierbares Karzinom eingeordnet und hatte als einziges Modell ein Grading der Stufe 4. Sulzer *et al.* und andere beschrieben eine inverse Korrelation zwischen der E-Cadherin-Expression und dem Tumorigrad im NSCLC [204;205]. Von entdifferenzierten Tumoren ist auch bekannt, dass sie ein verändertes Metastasierungspotenzial besitzen können [203]. Der Prozess der Metastasierung ist u. a. durch eine verringerte Expression von E-Cadherin als epitheliale Marker gekennzeichnet [206]. Die Verschiebung des epithelialen Phänotyps zum mesenchymalen Phänotyp ist mit einem Verlust der epithelialen Marker, wie beispielsweise E-Cadherin, und einer verstärkten Expression der mesenchymalen Marker z.B. Vimentin oder Snail verbunden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Analyse **EMT-assoziiertes Marker** in den Xenografts klären, inwieweit dieser Prozess auch in den etablierten Modellen von Bedeutung ist. Die Untersuchung ergab, bis auf das NSCLC 7668 und das SCLC 7530, alle Modelle epitheliale Marker auf Protein- und mRNA-Ebene aufwiesen. In einem Teil der Xenografts wurden zugleich mesenchymale Proteine auf einem wesentlich niedrigeren Level beobachtet. Diese Modelle exprimierten die mRNA der mesenchymalen Marker ebenfalls auf einem niedrigen Niveau. Eine Spearman-Korrelationsanalyse ergab, dass Modelle, die eine geringere Menge des Proteins E-Cadherin und γ -Catenin enthielten, tendenziell mehr Vimentin-Protein aufwiesen. Dies ist ein Kennzeichen für eine EMT. Aufgrund des höheren Niveaus der epithelialen Marker werden die Ergebnisse dennoch dahingehend interpretiert, dass

die 23 Modelle dem epithelialen Phänotyp angehören und bei ihnen keine EMT stattfand. Der Phänotyp der zwei Modelle 7668 und 7530 konnte nicht eindeutig geklärt werden. Der Patient des Modells 7668 entwickelte in der Klinik zahlreiche Metastasenherde, die auf einen mesenchymalen Phänotyp hinweisen. Es ist nicht auszuschließen, dass sich zum Zeitpunkt des Engraftments in der Maus die Tumorzellen in einer (sehr) frühen Phase der EMT befunden haben. Im Patienten schritt die EMT weiter fort und führte zu einer Migration von Zellen und später zur Entwicklung von Metastasen. In den Versuchstieren wurde dieser Prozess nicht beobachtet, da möglicherweise ein Mangel an notwendigen Stimulationen durch Wachstumsfaktoren und das umliegende Normalgewebe vorlag. So ist der Prozess der Metastasierung eher in SCID als in Nacktmäusen zu beobachten [207]. Die übrigen Modelle entwickelten (bisher) ebenfalls keine Metastasen, was die Zuordnung dieser Xenografts zum epithelialen Phänotyp stützt.

Neben den histologischen und phänotypischen Analysen zum Vergleich der Patienten- und Xenografttumore fand auch eine Analyse des **Genexpressionsprofils** mittels Affymetrix® Genechips® statt. Es wurden 4152 Gene differenziell zwischen den Patienten und Xenografts exprimiert. Eine anschließende GO-Analyse gruppierte die Gene in 352 GO-Termini. Die GO-Termini der 2000 hoch regulierten Probesets ließen sich der „Zellteilung“, „Mitose“ und dem „Zellzyklus“ zuordnen. Die verringert exprimierten Probesets wurden der funktionellen Klassifikation „Immunsystem“ und „Extrazelluläre Matrix“ zugewiesen. Unter den am stärksten regulierten Gene waren sechs Immunglobuline. Die verringerte Expression von Genen des Immunsystems lässt sich durch das partiell fehlende Immunsystem in der Maus erklären. In humanen Tumorproben wurde eine Infiltration der Tumore mit inflammatorischen Zellen wie T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile und Leukozyten immunhistologisch nachgewiesen [208-212]. Diese humanen Immunzellen fehlen im murinen System, da sie innerhalb der ersten Passage(n) degradiert werden. Doch gerade das Fehlen von CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen, CD4⁺-T-Helferzellen und natürlichen Killerzellen kann das Tumorstadium zusätzlich beschleunigen [16]. Dass dieser Prozess auch in den Xenografts stattfindet, zeigt die hier ermittelte erhöhte Expression von Genen der Zellteilung und des Zellzyklus. Die Extrazelluläre Matrix gibt den Zellenverbänden Struktur und vermittelt den Kontakt zwischen den Tumorzellen und dem Stroma, das die Tumorzellen umgibt. In der Maus wurde das humane Stroma durch murines ersetzt, was sich auch auf die Extrazelluläre Matrix auswirkt. Ihre Neustrukturierung wurde in den Xenografts beobachtet. Belege dafür bietet die detaillierte Betrachtung der zehn am stärksten regulierten Gene: Die Kollagene *COL3A1* und *COL1A2* wurden 900- bzw. 400-fach verringert exprimiert. In den hoch regulierten Genen wurden *MMP14* und *KRT4* identifiziert, die in den Abbau der Extrazellulären Matrix und in die Differenzierung von Epithelzellen involviert sind [193;194].

In einem anschließenden Clustering wurden die globalen Expressionsprofile der Patienten- mit denen der korrespondierenden Xenografttumore verglichen. Die differenziell exprimierten Probesets aus der vorherigen Untersuchung wurden von der Analyse ausgeschlossen, da sie nur aufgrund des Wechsels des humanen Tumorgewebes in das murine Milieu einer Regulation unterlagen. Das Clustering gruppierte die Primärtumore mit ihren jeweils korrespondierenden Xenografts in 15 Modellen erfolgreich zusammen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von anderen Tumorentitäten, wie Brustkrebs und pädiatrischen Malignomen, die vor und nach der Transplantation in ein murines Milieu ein identisches Profil aufwiesen [213;214]. Für drei Modelle standen keine Microarraydaten der Primärtumore zur Verfügung. Eine Erklärung für die eindeutige Trennung von Primärproben und Xenografts bei fünf Modellen kann der Anteil an Tumor- versus Normalgewebe in den analysierten Proben bieten. Da es sich um klinische Proben handelt, ist neben dem Tumor auch immer ein Anteil an Normalgewebe vorhanden. Das normale Lungengewebe weist ein anderes Genexpressionsprofil als die Tumorzellen auf. Kommt es zu einer Überlagerung dieser beiden Profile werden die Übereinstimmungen mit den Xenografts geringer. Grundsätzlich konnten durch das Clustering die Xenografts ihren Primärtumoren zugeordnet werden, was ein jeweils ähnliches Genexpressionsprofil voraussetzt.

Mutationen im Onkogen *KRAS* treten in einer Vielzahl von Krebsarten auf. *KRAS*-Mutationen führen zu einer erhöhten GTPase-Aktivität, wodurch der nachgeschaltete Signalweg konstitutiv aktiviert wird. In Lungenkrebs ist *KRAS* in ca. 30% aller Tumore mutiert [215], was mit den Beobachtungen dieser Arbeit übereinstimmt. In den Xenografts wurde in 6 der 25 Modelle eine Mutation im Codon 12 und in einem Modell eine Mutation in Codon 13 nachgewiesen. In dem Codon 61 ließ sich nur die Wildtyp-Form des Gens detektieren. In Plattenepithelkarzinomen wurden *KRAS*-Mutationen bisher nur selten dokumentiert [23;216]. Die Analyse im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass ebenfalls keine Mutationen in Xenografts mit einem Plattenepithel-Subtyp vorhanden waren.

Neben der Mutationsanalyse wurden auch **(lungen)krebsassoziierte SNP** in den Xenografts untersucht. Der Tumorsuppressor TP53 und das Onkoprotein MDM2 stehen in einem eng kontrollierten Wechselspiel zueinander. TP53 aktiviert die Transkription und die Expression von MDM2, das wiederum in der Lage ist TP53 zu degradieren. Patienten mit Pro/Pro-Allel im *TP53* SNP 72 waren resistent gegenüber einer Erstlinienchemotherapie [50], während in einer anderen Studie diese sensitiver auf eine Chemotherapie reagierten [44]. In den Xenografts bestand keine Verbindung zwischen dem Ansprechen auf eine Therapie und dem SNP 72. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkrebs wurde der SNP 309 im Gen *MDM2* im Zusammenhang mit dem

Überleben erwähnt [50]. Bis dato konnte die Beobachtung in dem Xenograftset mit frühen Tumorstadien nicht gemacht werden. Die abschließenden Auswertungen der Überlebensdaten können erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen.

Laut der Literatur ist der *EGFR497* SNP mit einer verringerten Aktivität des EGFRs assoziiert [51]. In dieser Arbeit stand die Verteilung des SNP im *EGFR* weder in einer Relation zum Überleben noch zum Ansprechen auf eine Therapie.

Die hier erhobenen Daten machen deutlich, dass die untersuchten SNPs in *TP53*, *MDM2* und *EGFR* in den Xenografts von untergeordneter Bedeutung sind. Die Rolle des SNP als Biomarker bedarf weiterer Forschung und sollte kritisch diskutiert werden.

Die allgemeine Charakterisierung der Xenografts beinhaltete auch die Erstellung eines **Sensitivitätsprofils** gegenüber klassischen Zytostatika und zielgerichteten Therapien. Die Chemosensitivität der Modelle wurde als Monotherapie gegenüber den vier Zytostatika Carboplatin, Paclitaxel, Gemcitabin und Etoposid als Vertreter für die klinisch etablierten Medikamente bestimmt. Die höchste Ansprechrates in den Xenografts wurde für Paclitaxel mit 70% ermittelt. 41% bzw. 46% der Modelle waren sensitiv gegenüber den Medikamenten Carboplatin und Gemcitabin. Mit Ausnahme eines NSCLCs und des SCLCs sprachen die Xenografts nicht auf Etoposid an. In der Klinik liegen die Ansprechrates für Carboplatin, Paclitaxel und Gemcitabin zwischen 11% (CPT) und 27% (PTX) und somit deutlich niedriger [3]. Wie erwartet zeigt die hier ermittelte Chemosensitivität in den 24 NSCLC Modellen dennoch die gleiche Tendenz wie in der Klinik. Dagegen zeigt Etoposid in der Praxis mit nur 9% die schlechteste Remissionsrate, was auch in den Xenografts bestätigt wurde.

Die neueren anti-EGFR-Therapien wurden durch den Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib und den monoklonalen Antikörper Cetuximab repräsentiert. In dieser Arbeit sprachen je 13% bzw. 33% der Modelle auf Erlotinib bzw. Cetuximab an. Der Prozentsatz stimmt mit den Ergebnissen von Perez-Soler und der BR.21-Studie überein, in denen 12% und 9% der unselektierten Patienten sensitiv gegenüber Erlotinib waren [217;218]. Eine retrospektive Analyse der Studien ergab, dass eine Selektion der Patienten nach aktivierenden *EGFR*-Mutationen im Exon 18-21, Adenokarzinomen, weiblichem Geschlecht, Nie-Rauchern und asiatischer Herkunft das Ansprechen deutlich verbesserte [36;219]. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Xenografts setzten sich ausschließlich aus kaukasischen Patienten und Rauchern zusammen und wiesen, wie zu erwarten, keine aktivierenden *EGFR*-Mutationen auf. Das Ansprechen auf Cetuximab war in einer klinischen Phase I Studie 5% und war somit niedriger als die hier ermittelten 33% [220]. Die divergenten Ergebnisse zwischen den Xenografts und den klinischen Daten können verschiedene Ursachen haben. In der Klinik wird allein das Ansprechen des behandelten Tumors bewertet. Ein

Vorteil im Tiermodell ist, dass auch das Wachstum des unbehandelten Tumors miterfasst wird und in die Beurteilung der Sensitivität eingeht. Die maximal tolerierte Dosierung, die im Versuch eingesetzt wurde, kann über der in Klinik der verwendeten Medikamentenmenge liegen [221]. Ein weiterer Faktor ist, dass von den 102 Patientenproben aus der Klinik ca. 25% der Proben anwuchsen, was zu einer nicht kontrollierbaren Selektion der Patienten führte. So wurde von John *et al.* erst kürzlich beschrieben, dass *in vivo* engraftete NSCLC Tumore aggressivere biologische und klinische Charakteristika besitzen [222]. Ein Vergleich der Übereinstimmung des individuellen Ansprechens des Patienten mit dem Sensitivitätsprofil des Xenografts ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht bzw. nur partiell möglich. Ein Teil des Patientenkollektives ist bereits verstorben ohne eine weitere Therapie erhalten zu haben, während andere Patienten noch kein Rezidiv erlitten haben. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine Übereinstimmung der Xenograftsensitivität mit den klinischen Daten besteht [179;185;201].

Zusammengenommen zeigen die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Validierung der Xenografts, dass die individuellen Tumoreigenschaften im Xenografttumor erhalten bleiben. Das Genexpressionsprofil und die Expression diagnostischer Marker wurde von dem Patiententumor auf den Xenografttumor übertragen. Die Modelle wiesen bezüglich der Mutations- und Sensitivitätsprofile Übereinstimmungen zu klinischen Patientenkollektiven auf, jedoch sind die SNP-Daten kritisch zu bewerten. Infolgedessen repräsentieren die patientenabgeleiteten Xenografts einen Patientenquerschnitt aus der Klinik und können als Modelle für klinische Patientenkollektive angesehen werden.

4.2 Patientenabgeleitete Xenografts als Modelle zur Charakterisierung und Validierung von Markern der klassischen Chemotherapie

Die klassische Chemotherapie mit Medikamenten wie Carboplatin, Paclitaxel, Gemcitabin und Etoposid stellt nach wie vor die wichtigste systemische Behandlungsoption des NSCLC dar. Es scheint jedoch eine Plateauphase der Behandlung erreicht, da keine besseren Ansprechraten mehr erzielt werden. Die Meta-Studie LACE ergab, dass im Mittel nur ein einziger von 20 Patienten langfristig von einer Chemotherapie profitiert [223]. Die Patienten weisen intrinsische oder erworbene Resistenzen auf. Ursachen hierfür können u. a. in der Expression resistenzassoziierter Marker gesucht werden. Membranständige Transporter sind in der Lage, Therapeutika aktiv aus der Zelle zu transportieren und erniedrigen die Medikamentenkonzentration in der Zelle. Ein weiterer Resistenzmechanismus wird durch eine modifizierte DNA-Reparatur vermittelt, und erhöhte oder verringerte DNA-Reparaturmechanismen beeinflussen die Sensitivität gegenüber

platinbasierten Medikamenten. Einige Schlüsselmoleküle dieser Resistenzmechanismen werden als prädiktive Marker im NSCLC diskutiert. Diese sollten in den patientenabgeleiteten Xenografts charakterisiert werden und ihre Bedeutung als prädiktive Marker sollte validiert werden.

Ein Resistenzmechanismus wird durch die ABC-Transporter MDR1, MRP1, ABCG2 und dem ‚Vault‘ LRP vermittelt. Für diese Marker wurde ein umfassendes **mRNA- und Proteinexpressionsprofil** in den Xenografts erstellt. In einem Vergleich mit bereits publizierten Daten sollten die Xenografts als Modelle zur Charakterisierung von Markern bewertet werden, unter besonderer Diskussion einzelner Modelle.

Die *MDR1*-mRNA konnte in 19 der 24 NSCLC Modelle und dem SCLC nachgewiesen werden. Der Vergleich zur Positivkontrolle, die eine induzierte Resistenz gegenüber Doxorubicin entwickelt hatte, machte jedoch deutlich, dass die Expression auf einem sehr niedrigen Niveau stattfand. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von Shin *et al.* und anderen, die eine geringe *MDR1*-mRNA-Expression im Tumorgewebe nachwiesen [71;73;224]. Der Transporter MRP1 konnte ebenfalls auf mRNA- und auf Proteinebene in allen Xenografts detektiert werden. Im Vergleich zur Kontrolle A549 wurde deutlich, dass in den Modellen und der Zelllinie A549 ein ähnliches Level an mRNA vorhanden war. Gleichzeitig wurde eine Koexpression der *MRP1*-mRNA und *MDR1*-mRNA beobachtet, wobei sich *MRP1* auf einem höheren Level als *MDR1* nachweisen ließ. Roy *et al.* dokumentierten ähnliche Daten [72]. Der Nachweis des MDR1-Proteins in allen Xenografts stimmt mit der Studie von Doubre *et al.* überein, die mit Hilfe einer FACS-basierten Analyse das MRP1-Protein in allen untersuchten klinischen Proben detektierten [225]. Das heterogene mRNA-Expressionsprofil von *ABCG2* war ebenfalls vergleichbar mit Datensätzen von klinischen Proben [226]. In dem Modell 7126 war die *ABCG2*-mRNA-Expression ähnlich hoch wie in der Positivkontrolle, die mit *ABCG2*-transfiziert war. Somit lässt sich nur dieses Modell als überexprimiert einstufen und eine Vermittlung einer Resistenz gegenüber klassischen Chemotherapien über diesen Mechanismus ist möglich. Der Marker LRP wurde auf mRNA- und Proteinebene in allen Modellen detektiert, wobei die Proteinkonzentration als mittel bis stark bewertet wurde. Ähnliches wurde bei der Analyse von klinischen Proben beobachtet [227]. In Übereinstimmung zu unserem Xenograftpanel stammten diese Proben ebenfalls von einem Raucherkollektiv.

Dingemans *et al.* fanden in ihren Proben einen Unterschied in der Proteinkonzentration zwischen dem NSCLC und dem SCLC [228]. Eine schwache Proteinexpression von LRP und MRP1 wurde im SCLC beobachtet [229;230]. Dieses Analyse kann hier nicht bestätigt werden, da sich die SCLC-mRNA- und Proteinlevel innerhalb der NSCLC Modelle einordneten. Allerdings war nur eine SCLC Probe in den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Modellen vorhanden.

Die erhobenen mRNA- und Proteinexpressionsprofile der multimedikamentenresistenzassoziierten Marker in den patientenabgeleiteten Xenografts wiesen viele Gemeinsamkeiten mit klinischen Patientenkollektiven auf. Zum einen wurde somit erneut bestätigt, dass die individuellen Eigenschaften des Patienten im Xenograft erhalten bleiben. Zum anderen wurde deutlich, dass die patientenabgeleiteten Xenografts klinisch relevante Modelle zur Charakterisierung resistenzassoziierten Marker sind. Zur Identifizierung und Validierung neuer Marker sollten demzufolge patientenabgeleitete Xenografts bevorzugt gegenüber Zelllinien und aus ihnen abgeleitete Xenografts in der präklinischen Forschung eingesetzt werden.

Unter Berücksichtigung der vorherigen Resultate und den sich ergebenden Schlussfolgerungen, wurde mit Hilfe der Spearman-Analyse nach möglichen **Korrelationen zwischen** verschiedenen **resistenzassoziierten Markern** gesucht. Ein mäßig starker Zusammenhang ließ sich auf mRNA-Ebene zwischen *LRP* und *MRP1* ($r = 0,675$, $p = 0,0003$) beobachten. Diese Korrelation wurde bislang bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie [231] und bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie beschrieben [232]. In letzter Zeit häufen sich die Literaturdaten, dass diese Zusammenhänge in asiatischen Patientenkollektiven mit verschiedenen Tumorentitäten wie Neuroblastom, Retinoblastom und NSCLC eine Rolle spielen könnten [233;234], für kaukasische Patienten liegen keine entsprechenden Daten vor.

In einer **Korrelationsanalyse** wurden die mRNA- und Proteinexpressionsprofile der **resistenzassoziierten Marker** mit der **Sensitivität** verglichen. Die Analyse der 24 NSCLCs ergab eine schwache, inverse Korrelation ($r = -0,465$; $p = 0,029$) zwischen dem MRP1-Protein und dem Ansprechen auf Gemcitabin. In Modellen, die ein verringertes Tumorwachstum unter Gemcitabin-Behandlung zeigten, wurde tendenziell mehr MRP1-Protein detektiert. Gemcitabin ist kein Substrat von MRP1 und eine direkte Verbindung ist somit nicht ersichtlich. In publizierten Daten waren MRP1- und MDR1-überexprimierende Zellen sensitiver gegenüber Gemcitabin als ihre Parentallinie. Diese Sensitivität wurde durch die Deoxycytidin-Kinase vermittelt [235]. Zwar wurde in den Xenografts keine Resistenz erzeugt, trotzdem scheint eine Verbindung zwischen der MRP1-Proteinexpression und Gemcitabin zu existieren. Eine weitere Erklärung bietet die Vermittlung der Resistenz durch MRP5. MRP5 ist ein Mitglied der ABCC-Familie und transportiert Nukleotid- und Nukleosid-Analoga, wie Gemcitabin aus der Zelle. Eine gemeinsame Regulation von MRP1 und MRP5 wurde in einer Zelllinie beobachtet [236]. Denkbar ist, dass MRP1 und MRP5 gemeinsam reguliert werden, und MRP5 (das hier nicht analysiert wurde) für den Efflux von Gemcitabin aus der Zelle verantwortlich ist.

Die Korrelationsanalyse zwischen den anderen resistenzassoziierten Markern und dem Ansprechen auf eine Therapie ergaben keine weiteren Assoziationen. In der Literatur finden sich widersprüchliche Daten zur Bedeutung von MDR1, MRP1, BCRP und LRP als prädiktive Faktoren in NSCLC. Während MDR1 in der Mehrzahl der Studien nicht als Marker für das Ansprechen auf eine Chemotherapie gesehen wird [237], existieren auch gegensätzliche Daten [73;88;238]. Die Vermittlung der Resistenz durch MDR scheint in Lungenkrebs von geringfügiger Bedeutung zu sein [89], was auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde. Diskrepanzen in publizierten Daten finden sich ebenfalls für LRP [237;239-241] und MRP1 [83;88;242]. Die Ergebnisse der IALT-Studie sind stärker zu wichten, da sie ein größeres Patientenkollektiv untersuchte. Das Fazit der Analyse war, dass MRP1 keine Resistenz gegenüber Cisplatin vermittelte [243]. Die Beobachtungen in den Xenografts in Verbindung zur Carboplatin-Sensitivität stützen die publizierten Daten. Ein Zusammenhang zwischen der Chemosensitivität und ABCG2 wurde nicht gesehen, was sich ebenfalls mit Literaturdaten deckt [244]. In letzter Zeit wurde diskutiert, ob der ABCG2-Transporter das Ansprechen auf die EGFR-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib beeinflussen kann. Erlotinib ist ein Substrat von ABCG2 und kann in höheren Konzentrationen die Aktivität des Transporters inhibieren [245;246]. In allen Modellen wurde ABCG2 nachgewiesen und ein verringertes Ansprechen der Xenografts durch einen Efflux von Erlotinib ist nicht auszuschließen. Es kann jedoch keine Aussage getroffen werden, ob *in vivo* eine ausreichend hohe Erlotinib-Konzentration für eine Verringerung der ABCG2-Aktivität vorlag. Die Betrachtung der resistenzassoziierten Marker im Zusammenhang zu dem Therapieansprechen machte deutlich, dass sie im NSCLC keinen essentiellen prädiktiven Wert besitzen.

Die Resistenz gegenüber Medikamenten ist bereits intrinsisch in den Tumoren vorhanden oder wird während einer Therapie erworben oder verstärkt. Die bereits durchgeführten Analysen verdeutlichten, dass die intrinsischen Expressionslevel der resistenzassoziierten Marker keinen Einfluss auf die Resistenz nehmen. In einem anschließenden Experiment sollten die **Marker nach einer Therapie** analysiert werden. Es wurden vier Modelle (7406, 7433, 7700 und 7747) ausgewählt, die jeweils gegenüber zwei Zytostatika resistent und sensitiv waren. Nach einer 3-tägigen Behandlung wurde die mRNA- und Proteinexpression der resistenzassoziierten Marker untersucht mit der Zielsetzung, eine mögliche Induktion nachzuweisen.

Auf Proteinebene fanden keine Regulationen durch die Behandlung statt. Im Modell 7406 wurde auf mRNA-Ebene in der Gemcitabin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Expression von *MDR1* beobachtet. Gemcitabin gehört jedoch nicht zum Substratspektrum von MDR1, wodurch ein direkter Zusammenhang nicht erkennbar ist. Eine Erklärung bietet hier erneut der bereits beschriebene Mechanismus einer gemeinsamen Regulation von MRP5 und MRP1

sowie MDR1. Eine Verknüpfung von verschiedenen Signalwegen, an deren Anfang eine Aktivierung oder auch Hemmung durch Gemcitabin steht, könnte MDR1 hoch regulieren. MRP5 ist für den Efflux von Gemcitabin verantwortlich. MRP1 wird gemeinsam mit MRP5 vermehrt exprimiert und MDR1 unterliegt einer verstärkten Expression durch die Kopplung an MRP1.

In Patienten, die eine Chemotherapie vor der Operation erhielten, wurde eine erhöhte MDR1-Proteinkonzentration nachgewiesen [247]. In unserem Patientenkollektiv bekamen vier Patienten vor der Operation eine Chemotherapie. In den korrespondierenden Xenografts ließ sich keine erhöhte Proteinmenge von MDR1 oder den drei restlichen resistenzassoziierten Proteinen beobachten, die das Ansprechen hätte erklären können. Möglicherweise war der Behandlungszyklus zu kurz oder die Therapiepause vor der Operation zu lang, um eine Resistenz stabil zu entwickeln oder das Auswachsen einer resistenten Zellsubpopulation zu begünstigen. Mit Hilfe der Kurzzeitversuche wurde deutlich, dass die mRNA- und Proteinexpression unter einer Therapie nicht verändert wurde und somit das Ansprechen beeinflussen konnte. Eine Resistenz wird folglich eher durch das intrinsische Level eines anderen, hier nicht analysierten resistenzassoziierten Proteins oder Mechanismus vermittelt oder lässt sich mit einer nicht optimalen Bioverfügbarkeit der Medikamente erklären.

Als zusätzliche prädiktive Marker werden **SNP** in Genen, die in die intrazelluläre Entgiftung der Zytostatika oder die Reparatur von DNA-Schäden involviert sind, diskutiert. SNPs könnten zu einer erhöhten oder reduzierten Expression und Aktivität führen.

Die Proteine XRCC1 und XRCC3 sind an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. XRCC1 repariert DNA-Einzelstrangbrüche, die während einer Behandlung mit Carboplatin induziert wurden. XRCC3 vermittelt die Chromosomenstabilität und ist in die Reparatur von DNA-Brüchen involviert. In unseren Untersuchungen wurde keine Verbindung zwischen dem Vorkommen der SNP und dem Therapieansprechen nachgewiesen. Sun *et al.* beobachteten ebenfalls keine Korrelation zwischen dem *XRCC1* SNP 399 und dem Ansprechen auf Carboplatin in Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkrebs [248]. Die im Rahmen unserer Arbeit ermittelten *XRCC3*-Ergebnisse stimmen mit Daten von Zhou *et al.* überein, die keinen Zusammenhang zwischen der Carboplatin-Sensitivität und dem *XRCC3* SNP 241 fanden [106].

ERCC1, 2 und 5 sind an dem Prozess der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt. Das Ansprechen auf eine Therapie war unabhängig von der SNP-Verteilung in den Genen *ERCC1*, *ERCC2* und *ERCC5*. Die *ERCC1*-Ergebnisse werden durch verschiedene Daten aus der Literatur gestützt [249;250]. Sie stehen jedoch im Widerspruch zu der kürzlich veröffentlichten Meta-Analyse von Wei *et al.* [251]. *ERCC2* wurde in einer Studie als prognostischer Marker für das längere Überleben gesehen [252]. Als prädiktiver Marker für das Therapieansprechen wurde es dagegen

nicht identifiziert [253;254], was mit den eigenen Beobachtungen übereinstimmt. Die *ERCC5*-Resultate decken sich mit den publizierten Ergebnissen von Sun *et al.* [255;256].

Das *GSTP1*-Gen kodiert für die Glutathion-S-Transferase-Pi, die an der Entgiftung von DNA-reaktiven Zytostatika wie Carboplatin beteiligt ist. Der SNP 105 wurde mit einer reduzierten Enzymaktivität sowie Medikamentenresistenz und -toxizität in Verbindung gebracht [118;257;258]. In den Xenografts konnte kein Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Carboplatin gesehen werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Booton *et al.*, die in Übereinstimmung zu dieser Arbeit ein chemotherapienaives Patientenkollektiv untersuchten [259]. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass SNPs im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber den Zytostatika einen geringen Einfluss in den Xenografts besitzen und ihre Bedeutung als prädiktive Marker kritisch betrachtet werden sollte.

Die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die mRNA- und Proteinexpressionsprofile der multimedikamentenresistenzassoziierten Marker der Xenografts viele Gemeinsamkeiten mit klinischen Patientenkollektiven aufweisen. Die patientenabgeleiteten Xenografts stellen somit klinisch relevante Modelle zur Charakterisierung resistenzassoziiierter Marker dar.

4.3 Patientenabgeleitete Xenografts als Modelle zur Charakterisierung und Validierung von Markern der anti-EGFR-Therapie

Neuere zielgerichtete Therapien wie EGFR-Inhibitoren sind mittlerweile in den klinischen Alltag integriert. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib und Gefintib und der monoklonale Antikörper Cetuximab hemmen den EGFR. Es profitiert jedoch nur eine Subpopulation der Patienten von der Therapie. Aktivierende *EGFR*-Mutationen, Adenokarzinom, Nie-Raucher, weibliches Geschlecht und asiatische Herkunft sind Faktoren, die das Ansprechen auf eine Therapie mit Erlotinib positiv beeinflussen können [36;38]. Auch Mutationen in *KRAS* sind als prädiktiver Marker in der Diskussion, allerdings vorwiegend bei Kolonkarzinomen. Die Medikamente greifen in ein komplexes Regulationsnetzwerk mit Signalkaskaden der Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose ein, in das die Mitglieder die ERBB-Proteinfamilie ebenso wie die Liganden des EGFR involviert sind. Ein Vergleich mit publizierten Datensätzen sollte die Xenografts als Modelle zur Charakterisierung dieser Marker bewerten, unter besonderer Diskussion einzelner Modelle.

Als ein prädiktiver Marker wird eine **KRAS-Mutation** in Verbindung mit dem Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie diskutiert, da Patienten mit einer Mutation häufiger resistent gegenüber einer Behandlung waren [260]. Gleichzeitig schließen sich *KRAS*- und aktivierende *EGFR*-Mutationen gegenseitig aus [39]. Letzteres stimmt mit den Beobachtungen dieser Arbeit überein, während ersteres nicht bestätigt werden konnte. Das *KRAS*-mutierte Modell 7466 sprach auf eine Erlotinib- und Cetuximab-Behandlung an, während die ebenfalls *KRAS*-mutierten Xenografts 7187, 7462 und 7668 sensitiv gegenüber Cetuximab waren. Dies deckt sich mit den Daten von Ferté *et al.* und Zhu *et al.*, die trotz *KRAS*-Mutation einen Therapieerfolg in Patienten mit Lungenkarzinomen dokumentierten [261;262]. Die Aktivierung der EGFR nachgeschalteten Signalwege kann neben dem *KRAS*-Signalweg auch über PI3K/AKT, PLC, STAT und MEK2/3 (siehe Abb. 7) erfolgen. Ist das Überleben des Tumors von diesen Signalwegen abhängig, spricht er auf eine anti-EGFR-Therapie an, obwohl *KRAS* konstitutiv aktiviert ist. Singh *et al.* unterschieden mutierte Krebszelllinien in *KRAS*-unabhängige und *KRAS*-abhängige Gruppen [263]. Letztere waren durch einen gut differenzierten epithelialen Phänotyp gekennzeichnet. Der Vergleich mit den hier erhobenen Daten aus der EMT-Analyse ergab, dass E-Cadherin in allen *KRAS*-mutierten, anti-EGFR-sensitiven Modellen nachgewiesen wurde. In den sehr sensitiven Modellen 7466 und 7668 wurden zugleich auch die drei mesenchymalen Marker detektiert, was eine Tendenz zur *KRAS*-unabhängigen Gruppe vermuten lässt. Der Theorie von Singh *et al.* folgend, sprechen diese beiden Modelle auf eine anti-EGFR-Therapie an, da das Tumorwachstum nicht an die konstitutive *KRAS*-Aktivierung gebunden ist. Um die Relevanz der Signatur in den Xenografts endgültig bewerten zu können, sollte ein Vergleich mit den Affymetrix-Daten angestrebt werden. Die geringe Fallzahl ist bei der Auswertung jedoch kritisch zu berücksichtigen.

Als eigentliches Zielmolekül von Erlotinib und Cetuximab ist eine **Analyse des EGFR** von besonderem Interesse. Die Interaktion des EGFR mit ERBB2, ERBB3 und ERBB4 kann wichtige intrazelluläre Wachstums- und Überlebenssignale aufrechterhalten und das Fortbestehen der Zelle sichern [264]. Die Relevanz dieses Netzwerkes wurde in den vorliegenden Modellen beurteilt, indem eine Analyse der Genkopienzahl des EGFR sowie der mRNA- und Proteinexpression des EGFR, ERBB2, ERBB3 und ERBB4 stattfand.

Neben den bereits bekannten aktivierenden Mutationen im *EGFR* wird auch die Genamplifikation des *EGFR* als prädiktiver und prognostischer Marker diskutiert. Patienten mit einer Genamplifikation sollen eine bessere Ansprechrates, eine längere progressionsfreie Zeit und Überleben zeigen [265]. Bei der Analyse der *EGFR*-Genkopienzahl in den Xenografts wurden zwischen zwei und neun Genkopien gefunden. Zwei Modelle besaßen weniger als zwei Kopien

und in zehn Modellen ließen sich mehr als vier Kopien detektieren. In der statistischen Analyse konnte keine Verbindung zum Ansprechen auf einen EGFR-Inhibitor festgestellt werden. Die Auswertung der Phase II (IDEAL)- und Phase III (INTACT)-Studien zu Gefitinib identifizierte zwischen 4 und 1000 Kopien, mit durchschnittlich 8 Kopien in den Patienten. Im Vergleich zu unserer Arbeit lag die Kopienzahl wesentlich höher. Bell *et al.* beobachteten, dass Patienten mit mehr als vier Amplifikationen besser auf Gefitinib ansprachen, wenngleich nicht signifikant. Aufgrund der geringen Patientenzahl in seiner Studie konnte keine abschließende Aussage getroffen werden [266]. Diese Tendenz konnte in den Xenografts nicht nachvollzogen werden. Dennoch zeigten die Modelle (7466 und 7668) mit der höchsten Kopienzahl ein starkes Ansprechen auf Erlotinib und/ oder Cetuximab. Im Gegensatz dazu berichteten Endo *et al.*, dass *EGFR*-Mutationen mit dem Ansprechen und dem Überleben assoziiert waren, aber Genamplifikationen keinen Einfluss darauf besitzen [267]. Dies wird durch die Ergebnisse unserer Arbeit gestützt. Die Mehrzahl der publizierten Studien wurde an einem Patientenkollektiv mit fortgeschrittenem Lungenkrebs durchgeführt, was durch den allgemeinen Aufbau klinischer Studien bedingt ist. Im Gegensatz dazu stammen die eigenen Xenografts aus einem Patientenkollektiv mit frühen Tumorstadien. Diese Unterschiede der Tumorstadien bieten eine Erklärung für die divergenten Ergebnisse. Tumore im höheren Tumorstadien können durch ihre weiter fortgeschrittene Dedifferenzierung mehr Mutationen und auch Amplifikationen erlangt haben. Mutationen entstehen häufig schon während der Entwicklung von Lungenkrebs, währenddessen Amplifikationen mit fortschreitender Progression erlangt werden [268]. Sie stellen einen Überlebensvorteil der einzelnen Zelle dar, was zu einer weiteren Selektion führt. Ein erster Hinweis ist die wesentlich geringere Genkopienzahl in der vorliegenden Arbeit. Ferner wies nur das dedifferenzierte Modell 7668 mit Stadium IV, neben dem Modell 7466, eine Kopienzahl > 8 auf.

Unter diesen Gesichtspunkten sind unsere Ergebnisse dahingehend zu interpretieren, dass abhängig vom Tumorstadium die *EGFR*-Genamplifikation eine Resistenz vermitteln kann.

Neben der Genamplifikation wurden auch der Nachweis des EGFR und sein Proteinlevel als ein prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie in der Literatur diskutiert. Der EGFR wurde auf mRNA- und Proteinebene in allen Xenografts detektiert. Der Vergleich zur EGFR-überexprimierenden Kontrolle A431 machte jedoch deutlich, dass er weder auf Gen- noch auf Proteinebene überexprimiert war. In der Analyse der *EGFR*-Kopienzahl wurden keine generellen Amplifikationen beobachtet, was die Expressionsdaten bestätigten. Zahlreiche Studien haben bereits das EGFR-Protein mit unterschiedlichen Antikörpern positiv markiert [269;270]. Der größte Anteil an positiven Zellen befand sich in Plattenepithelkarzinomen (55-100%), gefolgt von Adeno-

(35-60%) und großzelligen Karzinomen (20-60%). Diese Verteilung wurde in dem Xenograftpanel nicht beobachtet, da der EGFR in allen Modellen nachgewiesen werden konnte. Eine Erklärung bietet die gewählte Untersuchungsmethode, da der ELISA eine sehr sensitive Nachweistechnik ist. Es existieren widersprüchliche Ergebnisse zum prädiktiven Wert des EGFR-Proteins. In den INTACT- und IDEAL-Studien ließ sich kein Zusammenhang zu dem Gefitinib-Ansprechen ermitteln, was im Widerspruch zu der Post-Analyse der BR.21-Studie steht [271-275]. In den hier untersuchten Xenografts war eine Verbindung zwischen dem Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie und der EGFR-Proteinkonzentration nicht vorhanden. Der prädiktive Wert des EGFR-Proteins bleibt weiterhin ungeklärt und ist in einer größeren Patientenkohorte zu untersuchen. Es finden sich allerdings vermehrt Hinweise, dass die Expressionshöhe des EGFR nicht als ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf anti-EGFR-Therapien angesehen werden kann.

Die Fähigkeit der **ERBB-Rezeptoren** untereinander Homo- und Heterodimere zu bilden, führt zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege, die in die Proliferation, Apoptose, Migration oder Adhäsion involviert sind. Deswegen war ein mRNA- und Proteinprofil für die Mitglieder der ERBB-Proteinfamilie von Interesse.

Die mRNA- und Proteinexpressionsprofile von ERBB2, ERBB3 und ERBB4 zeigten Gemeinsamkeiten zu klinischem Probenmaterial. Die Proteinanalyse ergab, dass in 16 Modellen ERBB2, in 18 Modellen ERBB3 und in nur einem Modell ERBB4 nachzuweisen war, wobei auch eine gleichzeitige Expression beobachtet wurde. In publizierten Studien war das ERBB3-Protein in bis zu 85% der NSCLCs vorhanden und bis 38% waren positiv für ERBB2 [276]. Partiiell divergente Ergebnisse entstehen durch die verschiedenen Analysemethoden. Hirsch *et al.* fanden, dass der ERBB2-Nachweis von der Histologie abhängig ist. Die höchste Rate an positiven Proben wurde in Adenokarzinomen, gefolgt von großzelligen Karzinomen und Plattenepithelkarzinomen gefunden. [277]. Eine ähnliche Tendenz ließ sich auch in den Xenografts beobachten.

Des Weiteren wurde die Expression der mRNA- und Proteine mit dem Ansprechen auf die anti-EGFR-Therapie verglichen. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich innerhalb der ERBB-Rezeptoren eine Korrelation zwischen *ERBB2* und *ERBB3* auf mRNA-Ebene nachweisen. Modelle mit einer hohen *ERBB2*-mRNA-Menge exprimierten die mRNA des *ERBB3* auf einem ähnlichen Niveau. Eine Verknüpfung beider Rezeptoren ist offensichtlich, was auch Literaturdaten belegen. Obwohl zehn verschiedene Dimere gebildet werden könnten, gibt es eine abgestufte, ligandenabhängige Hierarchie für die Formation der Heterodimere. Dimere, an denen der ERBB2 beteiligt ist, sind sehr stabil und stellen die bevorzugte Kombination dar [122]. Der ERBB2 begünstigt ERBB3 bei der Bildung von Heterodimeren [278]. Das ERBB2-ERBB3-Heterodimer ist vermutlich das stärkste ERBB-Dimer bezüglich der Interaktionsstärke, der ligandeninduzierten Tyrosinphosphorylierung

sowie der nachfolgenden Signalübertragung. Des Weiteren wurde in den Xenografts ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression des *ERBB2* als auch des *ERBB3* und dem Ansprechen auf Erlotinib gefunden. Eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren erhöhte die *ERBB3*-Expression *in vitro* und *in vivo*, um die Hemmung der anderen ERBB-Rezeptoren zu kompensieren [279]. Des Weiteren fanden Engelmann *et al.* in Gefitinib-sensitiven NSCLC Zelllinien, dass PI3K mit *ERBB3* assoziiert war. Dieser Komplex wird durch Gefitinib dissoziiert und vermindert die AKT-Aktivität. Im Gegensatz dazu ließ sich in Gefitinib-resistenten Linien keine *ERBB3*-vermittelte PI3K/AKT-Signalaktivität beobachten [280]. Eine Beteiligung der beiden Rezeptoren an dem Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren, wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den Xenografts gefunden.

Die in dieser Arbeit ermittelten Resultate und die Daten der Literatur belegen, dass *ERBB2* und *ERBB3* direkt in das komplexe Signalnetzwerk involviert sind und ihr Status das Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie beeinflusst.

Unterschiedliche **Liganden** binden an den EGFR und weitere ERBB-Rezeptoren, aktivieren diese und lösen die nachfolgenden Signalkaskaden aus. Durch die Aktivierung der verschiedenen ERBB-Homo-/ Heterodimere, stimulieren sie das Wachstum und die Proliferation der Zellen. Die Liganden werden parakrin vom normalen Gewebe ständig produziert, können aber auch vom Tumor selbst u. a. mit Hilfe eines autokrinen Loops überexprimiert und ausgeschüttet werden. Autokrine Loops einiger Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren spielen bei der Entwicklung und Progression von Lungenkarzinomen eine wichtige Rolle [269;281;282]. Um eine Abhängigkeit des Tumorwachstums und/oder -überlebens und der daraus resultierenden Medikamentenresistenzen bewerten zu können, wurden die intrinsischen Expressionslevel der Liganden EGF, TGF, AREG und EREG auf mRNA- und Proteinebene in den Modellen untersucht. Die Liganden EGF, TGFA und AREG ließen sich in allen Modellen auf mRNA- und Proteinebene nachweisen. Die *EREG*-mRNA konnte in zwei Modellen nicht detektiert werden, aber alle Modelle produzierten das Protein. Verschiedene publizierte Studien wiesen die Liganden in primären NSCLC Tumorproben nach [146;269;283]. Auch in den Xenografts ließen sich die Proteine der Liganden detektieren. Innerhalb der Modelle waren bis zu 100-fache (57-, 20-, 23-) Unterschiede der Proteinkonzentration bei AREG (EGF, TGFA, EREG) vorhanden, jedoch ist nicht eindeutig, ob es sich hier um eine Überexpression handelt. Die verstärkte/ verringerte Ausschüttung der Liganden kann eine Resistenz in einzelnen Xenografts vermitteln. Die Blockade der EGFR-Liganden führte *in vitro* und *in vivo* zu einer Wachstumshemmung [284]. In Patienten der BR.21-Studie wurde ein prognostischer Wert von hohen AREG-Konzentrationen beobachtet und eine

univariate Analyse zeigte einen Trend, dass hohe basale TGFA-Level eine Resistenz auf Erlotinib vorhersagten [285]. In unserer Arbeit fanden sich keine Korrelationen zwischen den Liganden und dem Ansprechen auf die Therapien, was teilweise durch Daten aus der Literatur gestützt wird [286]. Die hohe Expression eines oder mehrerer Liganden kann dennoch das Ansprechen auf eine Therapie in einzelnen Modellen beeinflussen. In dem Modell 7913 kann die Resistenz gegenüber Erlotinib durch die verstärkte TGFA-Expression vermittelt werden und eine Erklärung für das schlechte Ansprechen der Modelle 7387 und 7700 bietet die gesteigerte Expression von AREG.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorlysate direkt untersucht, da das Serum von Patienten nicht verfügbar war. In Vorversuchen konnten die Liganden im Serum tumortragender Mäuse nicht nachgewiesen werden. Entweder wurde kein Ligand sezerniert oder die Konzentration des Liganden lag unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Ausschüttung der Liganden ist jedoch keine Voraussetzung, um an den EGFR zu binden und nachfolgende Signalwege anzuschalten. Neben der parakrinen und autokrinen Aktivierung sind die Liganden TGFA und AREG auch in der Lage, den EGFR juxtakrin zu aktivieren [287]. Die Liganden werden nicht in die Gewebeflüssigkeit freigesetzt, sondern bleiben in der Plasmamembran verankert. Dies wurde auch in den Xenografts beobachtet. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz ließ sich der TGFA vermehrt in der Nähe der Zellmembran nachweisen.

Studien haben gezeigt, dass abhängig davon, welcher Ligand an den EGFR bindet, verschiedene biologische Aktivitäten durch unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst werden. Dabei entscheidet die Ligand-Rezeptor-Kombination auch über die Stabilität der Bindung. Die EGF-EGFR-Bindung ist bei endosomalem pH-stabil, was zu einem lysosomalen Abbau führt. Dagegen sind TGFA und Neuregulin 1 pH-sensitiv und dissoziieren vom EGFR im Lysosom [288]. Anschließend wird der Rezeptor zurück an die Membran transportiert, wo er erneut durch Liganden aktiviert werden kann [289]. Die gemessene Proteinkonzentration spiegelt somit nicht zwangsläufig die Aktivität der Liganden wider. Neben der Aktivierung der Signalwege durch eine Bindung an den EGFR können die Liganden auch mit weiteren Tyrosinkinase-Rezeptoren interagieren. Die Liganden sind in der Lage, eine Resistenz mit Hilfe des IGFR zu vermitteln, indem sie die Apoptose hemmen. In NSCLC Zelllinien bindet AREG an den IGFR und aktiviert diesen. Als Folge werden AREG und der IGFR induziert. Die Transaktivierung des IGFR ist dabei unabhängig von der Bindung AREG-EGFR [290]. Auf diesem Weg kann das Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie auch ohne eine Ligandenüberexpression durch die (Liganden)spezifische Aktivierung von nachgeschalteten EGFR-Signalkaskaden reguliert werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Resultate durch murine Wachstumsfaktoren verfälscht wurden. Der humane und murine TGFA weisen eine sehr ähnliche DNA-Sequenz (~90%) auf und humanes TGFA kann das murine Rezeptoranalogen aktivieren [287]. *In vitro* sind der humane und

murine TGFA in der Lage, den humanen und murinen EGF funktionell zu ersetzen. Das Ereignis der Aktivierung des humanen EGFR durch murine Liganden kann stattgefunden haben.

Zwischen der mRNA-Expression von *AREG* und *EREG* war eine schwache Korrelation vorhanden. In Kolonkarzinomen wurde bereits eine gemeinsame Expression von *AREG* und *EREG* beobachtet [291]. Ebenso wurde gezeigt, dass *EREG* essenziell für die vollständige *AREG*-mRNA-Expression ist [292]. Des Weiteren war in den hier erhobenen Analysen der Ligand *EREG* mit dem EGFR auf Proteinebene assoziiert. Für NSCLC Zelllinien wurde eine Abhängigkeit der *EREG*-mRNA-Expression vom EGFR beschrieben. Eine Behandlung mit Gefitinib reduzierte das *EREG*-mRNA-Niveau [293].

Die Diskussion zeigt, dass die Liganden nur in einzelnen Modellen das Ansprechen beeinflussen können. Die Resistenz der restlichen Modelle kann nicht allein durch die Expression der Liganden erklärt werden, sondern wird anscheinend durch andere Mechanismen vermittelt.

Der durch Liganden aktivierte EGF-Rezeptor kann mehrere **nachgeschaltete Signalwege** aktivieren. Die drei am häufigsten genutzten Signalkaskaden sind der STAT-, der MAPK- und der PI3K-AKT-Weg (siehe Abb. 7). Die Aktivierung der Signalwege wird dabei nicht nur über den EGFR vermittelt, sondern auch durch andere Wachstumsfaktorrezeptoren.

Eine Evaluierung dieser Signalwege sollte ihre Bedeutung in diesem Xenograftpanel klären. Die Analyse der Proteine STAT1, STAT3, MAPK1/3, AKT und MTOR sowie deren phosphorylierten Formen ergaben sehr heterogene Profile. Jedes Modell wies ein individuelles Proteinmuster auf. In allen Xenografts ließ sich STAT3 und in einem geringeren Umfang auch das phosphorylierte Protein detektieren. Eine konstitutive Aktivierung von STAT3 wurde bereits für das Bronchialkarzinom beschrieben [294], was die Befunde dieser Arbeit stützen. Seinen prädiktiven Wert erlangt AKT durch die Vorhersage des Ansprechens auf Gefitinib [295]. Dies konnte in den Xenografts nicht bestätigt werden. Ein weiteres Protein im AKT-Signalweg ist MTOR. Eine Detektion von MTOR fand in 51-74% von untersuchten Lungenkarzinomen (Patienten und Zelllinien) statt [296], was im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit steht. Eine Einteilung der Tumore nach ihrem Ansprechen auf die Therapeutika erlaubte keine Identifizierung eindeutiger Profile. Folglich ist nicht *ein* definierter Signalweg für das (Nicht-)Ansprechen auf die EGFR-Inhibitoren verantwortlich, sondern jedes Modell reagierte individuell verschieden auf die Therapie. Beispielsweise kann in den Xenografts 7166 und 7612 die Resistenz durch eine konstitutive AKT-Aktivierung vermittelt werden, während in dem Xenograft 7414 STAT3 permanent in einem phosphorylierten und somit aktiven Zustand vorhanden ist. Das allein kann aber nicht die Resistenzen in allen Modellen erklären, da auch in den sensitiven Modellen

phosphoryliertes AKT und phosphoryliertes STAT3 detektiert wurden. Suzuki *et al.* analysierten NSCLC Proben immunhistologisch und beobachteten, dass in einer Probe entweder STAT3 oder AKT aktiviert war, aber nicht beide gleichzeitig [297]. Diese Tendenz wurde auch in den Xenografts beobachtet, war jedoch nicht signifikant.

Um ein besseres Verständnis für die Regulation der Signalwege durch eine anti-EGFR-Behandlung zu erlangen, fand eine Analyse der Proteine in zehn ausgewählten Modellen nach einem Therapiezyklus statt. In einigen sensitiven Modellen ließ sich eine verminderte Expression des EGFR durch die Cetuximab-Therapie beobachten. Es ist bekannt, dass durch die Bindung von Cetuximab an den Rezeptor, eine Initiation des EGFR-Abbaus erfolgt [298]. Der Verlust des EGFR führt zum Zelltod [299]. Der EGFR stabilisiert das intrazelluläre Glukoselevel der Zelle und verhindert dadurch die Autophagozytose [300]. Diese Funktion kann er in den sensitiven Modellen nicht mehr erfüllen und die Zelle wird phagozytiert. Das erklärt, warum trotz fehlendem EGFR in den nachgeschalteten Signalwegen MAPK, AKT und STAT1 keine Regulationsmechanismen beobachtet wurden. Die resistenten Modelle sind entweder in der Lage, mehr EGFR-Protein zu produzieren und/ oder sie nutzen andere Wachstumsfaktoren zur Stimulation der überlebensnotwendigen Signale. In Studien wurde gezeigt, dass der EGFR Signale für das Überleben aussendet, die unabhängig von der Tyrosinkinase sind. Mäuse, in denen der EGFR ausgeknockt ist, sterben [301], während Tiere mit einer mutierten Tyrosinkinase lebensfähig sind und nur wenige Defekte aufweisen [302]. Der inaktive Kinase des EGFR ist weiterhin in der Lage, die DNA-Synthese [303] und das Überleben der Zelle zu stimulieren [304]. Die Hemmung der Kinase führt zwar oft zu einer verminderten Zellproliferation aber nicht zum Zelltod [305]. Auch in den Xenografts fand ein vermindertes Tumorwachstum in den resistenten Modellen statt, während die sensitiven Tumore (fast) vollständig zurückgingen. In der Cetuximab behandelten Gruppe war in einem resistenten Modell vermehrt phosphoryliertes STAT1 zu beobachten und auch (p)STAT3 wurde in drei Modellen differenziell exprimiert. Die Aktivierung der STATs kann durch Tyrosinkinaserzeptoren (z.B. EGFR, PDGFR) mittels der SH2-Domäne oder durch den MAPK-Signalweg erfolgen [306]. Aber auch weitere Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der SRC-Familie und das Fusionsprotein BCR-ABL können STATs aktivieren und die Signalkaskaden anschalten. Mit Hilfe von alternativen, EGFR-unabhängigen Aktivierungen der nachfolgenden Signalwege – beispielsweise durch den IGFR – wird die Zelle befähigt, die lebensnotwendigen Signale weiterzuleiten [307]. Die hier untersuchten Signalwege scheinen in die Resistenz involviert, es sind jedoch vermutlich auch Transaktivierungen durch andere Wachstumsfaktorrezeptoren und zusätzliche Signalwege beteiligt.

Die Diskussion dieses Kapitels ergab, dass die Xenografts heterogene mRNA- und Proteinexpressionsprofile EGFR-assoziiierter Moleküle aufweisen. Die Sensitivität der Modelle auf die anti-EGFR-Therapien konnte in einzelnen Xenograft mit der individuellen Expression erklärt werden. Folglich können mit Hilfe patientenabgeleiteten Xenografts Marker der anti-EGFR-Therapien charakterisiert und validiert werden.

4.4 Patientenabgeleitete Xenografts als Modelle zur Therapieoptimierung

Unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in einem folgenden Schritt die Xenografts als Modelle zur Therapieoptimierung untersucht. Während und nach den klinischen Studien der EGFR-Inhibitoren deutete sich an, dass nur eine Subpopulation der Patienten von der Therapie profitiert. Prädiktive Marker wie EGFR-Mutationen, der Raucherstatus, der ethnische Hintergrund und das Geschlecht sollten helfen Patienten zu selektieren. Dennoch spricht eine Vielzahl der Patienten nicht auf die Behandlung an. In der vorliegenden Arbeit wurden bereits zahlreiche Ursachen für eine mögliche Resistenz diskutiert, von denen jedoch nicht eine einzelne für alle Therapieresultate verantwortlich gemacht werden konnte.

Mit Hilfe einer Genexpressionsstudie sollten einzelne Funktionskreise für ein Therapieansprechen identifiziert werden, gegen die ein Medikament zur Verfügung stand, um eine Kombinationsbehandlung zu initiieren. Die Untersuchung selektierte sechs potentielle Kandidaten, von denen der *VEGFA* der Vielversprechendste war. Das Medikament Bevacizumab bindet selektiv an den VEGFA und hemmt die Angiogenese. Der Antikörper erhielt bereits eine Zulassung zur Erstlinientherapie von metastasiertem und fortgeschrittenem Kolonkarzinom und als Erstlinienbehandlung von inoperablem, fortgeschrittenem, metastasiertem oder rezidiviertem Lungenkarzinom (mit Ausnahme des Plattenepithelkarzinoms) in Kombination mit platinhaltigen Chemotherapeutika.

Ein Zusammenhang zwischen der Inhibition des EGFR und VEGFA wurde bereits in anderen Studien gesehen. Der Ligand EGF konnte die VEGFA-Expression in Zelllinien induzieren [308;309]. Umgekehrt führte eine EGFR-Inhibition zu einer verringerten VEGFA-Expression und dadurch auch zu einer verminderten Angiogenese im Tumor [310-313]. Eine VEGFA-Überexpression war mit der Entwicklung einer Resistenz gegenüber Cetuximab in einem humanen Xenograft assoziiert. Mittlerweile wurden bzw. werden klinische Studien mit der Kombination von einem EGFR- und einem VEGFA-Inhibitor durchgeführt [314;315]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in ausgewählten Xenografts ebenfalls eine Kombinationsbehandlung von Erlotinib und Bevacizumab initiiert.

Um die Ergebnisse der Bevacizumab-Sensitivität besser beurteilen zu können, fand eine Untersuchung der intrinsischen mRNA- und Proteinlevel von VEGFA in den 25 Xenografts statt. Ein heterogenes Expressionsprofil mit einem bis zu 30-fachen Unterschied wurde auf mRNA-Ebene beobachtet. Ein Muster der VEGFA-Proteinkonzentration ließ sich nicht erkennen. Die Xenografts wiesen bis zu 18-fache Konzentrationsunterschiede an Protein auf. Eine Korrelation der bisher 20 getesteten Xenografts mit dem Ansprechen auf eine Bevacizumab-Monotherapie ergab keine Assoziation. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass vom VEGFA-Level keine Rückschlüsse auf das Therapieansprechen gemacht werden können [316].

Die Kombinationsbehandlung von Erlotinib und Bevacizumab wurde in sechs Modellen durchgeführt. Es wurden Xenografts mit einem unterschiedlichen Ansprechen auf Erlotinib ausgewählt, um die Identifizierung möglicher Regulationsmechanismen zu erleichtern. Die **Wachstumskurven** zeigten, dass in allen Modellen die Kombinations- der Monotherapie überlegen war. Drei Modelle sprachen besser auf eine Bevacizumab- als auf eine Erlotinib-Monotherapie an. In allen Modellen führte die Kombinationstherapie zu einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums. Präklinische Studien mit verschiedenen Xenograftmodellen zeigten eine additive Anti-Tumorwirkung [317;318]. In klinischen Studien wurde ebenfalls ein Therapievorzug für die Kombination gesehen. Die progressionsfreie Zeit, das Überleben, die Ansprechrate sowie die Ein-Jahresüberlebensrate waren jeweils in der Erlotinib-Bevacizumab-Gruppe verbessert [175;176]. In der BeTa-Studie wurde zwar kein verlängertes Überleben beobachtet, trotzdem waren die progressionsfreie Zeit und die Ansprechrate in der Kombinationsgruppe erhöht [178].

Das Medikament Bevacizumab bindet an **VEGFA** und neutralisiert den Wachstumsfaktor. Das gebundene VEGFA steht der Endothelzelle nicht mehr für die Aktivierung der Signalkaskaden zur Verfügung und wird abgebaut. Der Metabolismus von Bevacizumab ähnelt dem des endogenen Immunglobulins G. Normalerweise wird ungebundenes Immunglobulin G durch den neonatalen Fc-Rezeptor recycelt. Liegt aber ein großer Immunkomplex vor, wird dieser aus der Zirkulation entfernt und degradiert [319]. In 5/6 Xenografts ließ sich nach der Therapie eine reduzierte VEGFA-Proteinkonzentration beobachten. Eine leichte Verringerung der Proteinmenge wurde bereits in der Erlotinib-Gruppe gemessen, die in der Bevacizumab-Gruppe weiter abnahm. Die geringste Konzentration an VEGFA-Protein wies die Kombinationsgruppe auf. Der Grad der Abnahme war nicht an das Therapieansprechen gebunden. So zeigte das Modell mit dem besten Ansprechen eine (leicht) erhöhte VEGFA-Proteinkonzentration, was mit einem geringen Anteil an vitalem Gewebe erklärt werden könnte. Der Bevacizumab-VEGFA-Komplex wird degradiert, was in der Zelle zu einem VEGFA-Mangel führt. Die Tumorzelle kompensiert die VEGFA-

Neutralisierung, indem sie VEGFA und weitere angiogeneseassoziierte Gene verstärkt exprimiert [320]. In den Xenografts wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. In zwei von sechs Modellen war die VEGFA-mRNA-Expression in der Erlotinib- und stärker in der Bevacizumab-Gruppe erhöht. Eine signifikante Zunahme der VEGFA-mRNA wurde für vier Modelle in der Kombinationsgruppe erfasst.

Hinsichtlich der Angiogenese scheinen der VEGF- und EGFR-Signalweg in soliden Tumoren miteinander verbunden zu sein. Zum einen fördert die Synergie von VEGF und EGFR die epitheliale Tumorentwicklung und zum anderen besitzen EGF und TGF α pro-angiogene Eigenschaften, da sie die VEGFA-Expression mit Hilfe des EGFR aktivieren können [161]. Wahrscheinlich werden durch den EGFR-Signalweg VEGFA und weitere für die Angiogenese essentielle Proteine hoch reguliert. Eine Cetuximab-Therapie in präklinischen Modellen führte zu einer Verminderung pro-angiogener Faktoren wie VEGFA. Die Anti-Tumorwirkung von Cetuximab wird vermutlich teilweise durch die Hemmung der Angiogenese vermittelt, indem vorgeschaltete angiogene Signalwege unterbrochen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Tyrosinkinaseinhibitoren beschrieben [161]. Die Inhibition des EGFR blockiert VEGFA aber nicht, was dem Tumor die weitere Angiogenese und das Wachstum ermöglicht [171]. Die zuvor beschriebenen Beobachtungen anderer Gruppen wurden auch in den Xenografts gemacht. Bereits in der Erlotinib-behandelten Gruppe wurde eine (leicht) veränderte VEGFA-mRNA- und Proteinexpression nachgewiesen. Deutlicher wurde dieser Effekt nach einer Therapie mit Bevacizumab bzw. in der Kombination.

Eine verminderte VEGFA-Proteinmenge lässt keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Hemmung der **Angiogenese** zu. Deshalb wurde in den Xenografts die Anzahl der Blutgefäße immunhistologisch untersucht. In allen Modellen war die Anzahl der Blutgefäße unter einer Bevacizumab- bzw. Kombinationstherapie reduziert. In drei Modellen waren keine Unterschiede zwischen der Bevacizumab-Monotherapie und der Kombination vorhanden. Dort ist die Therapie mit Bevacizumab, unabhängig von einer Kombination, für die Reduktion der Blutgefäße verantwortlich. Das stärker verringerte Tumorwachstum in der Kombinationsgruppe ist daher nicht allein durch die reduzierte Anzahl an Blutgefäßen zu erklären. Eine Bevacizumab-Therapie verhindert nicht nur die Bildung neuer Blutgefäße, sondern normalisiert auch das vorhandene Gefäßsystem [19;321]. Die Blutgefäße im Tumor sind durchlässig, erweitert, ausgebuchtet und zeigen anormale Verzweigungsmuster [322]. Der beeinträchtigte Blutfluss und der interstitielle Überdruck führen zu einer schlechten Verteilung der Medikamente [323;324]. Durch die Normalisierung der Gefäße wird Erlotinib möglicherweise effektiver zu den Tumorzellen transportiert, was zu einer besseren Inhibition des EGFR führen kann.

Die anormale Verteilung und Struktur der Blutgefäße sowie die Behandlung mit Medikamenten können in dem Tumor einen **hypoxischen Zustand** auslösen. Dieser ist u. a. durch die Expression von HIF1A gekennzeichnet. Die Aktivierung von HIF1A kann verschiedene, oft auch gegensätzliche Effekte auf das Überleben einer Zelle auslösen. So führt eine HIF-Aktivierung zu einer erhöhten apoptotischen Aktivität von TP53 oder erhöht die parakrine Sekretion von VEGFA [325;326]. Neben VEGFA werden weitere angiogene Faktoren wie PDGF-B, VEGFR1, Endothelin1, induzierbare Nitrit-Oxid-Synthase, Adrenomedullin und EGF von HIF1A reguliert [327]. Das Bestehen einer Hypoxie in den Xenografts wurde mit Hilfe des *HIF1A*-mRNA-Levels überprüft. Des Weiteren wurde die Carboanhydrase 9 untersucht, die unter einer Hypoxie durch HIF1A hochreguliert wird und als besserer Marker für einen Sauerstoffmangel angesehen wird [328]. In allen Modellen und allen Behandlungsgruppen wurde eine sehr geringe Regulation von *HIF1A* und der *CA9* beobachtet. Aufgrund der minimalen Veränderungen wird nicht von dem Zustand einer Hypoxie in den Tumoren ausgegangen. Die Ergebnisse sind dahingehend zu interpretieren, dass die Veränderungen von VEGFA auf mRNA- und Proteinebene nicht oder nur in einem sehr geringen Umfang durch *HIF1A* reguliert werden, sondern u. a. durch das komplexe Netzwerk der EGFR-Signalwege.

Zusammenfassend führte die Therapieoptimierung zu einer deutlichen Verbesserung des Ansprechens durch eine Kombinationsbehandlung von Bevacizumab mit Erlotinib in Erlotinib resistenten Modellen. Die Regulationsmechanismen des Ansprechens konnten durch die Interaktion des EGFR- und VEGFA-Signalweges erklärt werden.

Resümee

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die gesetzten Ziele erreicht werden und ein zusammenhängendes und patientennahes Xenograftset des Lungenkarzinoms wurde intensiv charakterisiert. Der Vergleich der patientenabgeleiteten Xenografts mit ihren Originaltumoren zeigte, dass die individuellen Tumoreigenschaften erhalten blieben. Hinsichtlich des Genexpressionsprofils und der Expression der Tumormarker auf Proteinebene ließen sich die Xenografts ihren Primärtumoren zuordnen. Die Charakterisierung und Validierung von Markern, die im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine klassische Chemotherapie oder anti-EGFR-Therapien diskutiert werden, wurde erfolgreich durchgeführt. Die nativen mRNA- und Proteinexpressionsprofile der Marker zeigten viele Übereinstimmungen mit klinischen Probensets. Die klinische Heterogenität des Lungenkarzinoms spiegelte sich in der Anzahl und den

individuellen Eigenschaften der Xenografts wider. Auf diese Weise wird die Stärke der patientenabgeleiteten Xenografts als präklinische Modelle deutlich, was ihren Einsatz in vielen Bereichen der onkologischen Forschung erlaubt. Sowohl Analysen zur Expression und Regulation von Biomarkern als auch die Suche nach neuen Therapiestrategien können mit Hilfe der patientenabgeleiteten Xenografts realisiert werden. Die Modelle ermöglichen die Durchführung dieser Studien mit verschiedenen Behandlungsschemata unter gut standardisierten Bedingungen. Des Weiteren können Therapieoptimierungen in den Xenografts durchgeführt werden. So führte hier eine Kombination von Erlotinib und Bevacizumab zu einem verbesserten Ansprechen in resistenten Modellen. Dieses Xenograftset überbrückt die Lücke zwischen Zellkultur und Klinik und mit seiner Hilfe können klinik-relevante Fragestellungen beantwortet werden.

4.5 Perspektiven

Innerhalb der Diskussion dieser Arbeit und in der Literatur haben sich neue Fragestellungen ergeben, die mit Hilfe der Xenografts untersucht werden können.

Die Modelle und zahlreiche Daten sind bereits vorhanden, so dass Analysen schnell und unkompliziert durchgeführt werden können. Weitere für die Zukunft nötige Informationen wie zusätzliche Mutations-, SNP- und Expressionsdaten lassen sich erheben, um Fragestellungen gezielt zu beantworten. Damit können in der Literatur diskutierte Marker (z.B. ERCC1, RRM1) oder Markerprofile (z.B. das Genprofil der BATTLE II-Studie) in den Modellen validiert werden, um u. a. ihren klinischen Wert beurteilen zu können.

Mit Hilfe von Genexpressionsstudien können (neue) prädiktive und prognostische Marker identifiziert werden, die helfen, Patienten vor einer Therapie besser zu selektionieren. Daran anschließend können Therapieoptimierungen für (weitere) Medikamente durchgeführt werden, um neue Kombinationsmöglichkeiten zu erschließen.

Die Entwicklung neuer Medikamente könnte durch die Identifizierung von Behandlungstargets in den patientenabgeleiteten Xenografts unterstützt werden. Des Weiteren können in der präklinischen Phase befindliche Substanzen in den Xenografts auf ihre Wirksamkeit getestet werden, um damit die partiell enttäuschenden Ergebnisse von klinischen Studien zu reduzieren oder gar zu vermeiden.

5. ABKÜRZUNGEN

, ’	Kennzeichnung der verwendeten Anglizismen
ΔC_T	,Cycle threshold’
ABCG2	ABC-Transporter G2
ACTB	Aktin beta
ADC	Adenokarzinom
AKT	Serin-Threonin Proteinkinase B
AREG	Amphiregulin
BEV	Bevacizumab
CDH1	E-Cadherin
CET	Cetuximab
CPT	Carboplatin
DDC	Dedifferenziertes Lungenkarzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	,Epidermal growth factor receptor’
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
ERBB	‘V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog’
ERCC	,Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency’
EREG	Epiregulin
ERL	Erlotinib
EPCAM	,Epithelial cell adhesion molecule’
ETO	Etoposid
FN1	Fibronektin
GEM	Gemcitabin
GO	,Gene Ontology’
Gp	Gesamtprotein
GSTP1	Glutathion-S-Transferase Pi 1
GTP	Guanosintriphosphat
HB-EGF	Hepatozyten bindender epidermaler Wachstumsfaktor
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
JUP	□-Catenin
KRAS	,V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog’
Ktr	Kontrollgruppe
LRP	,Lung resistance related protein’
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MDM2	,Mouse double minute 2’
MDR1	,Multidrug resistance protein 1’

MRP1	‘Multidrug resistance-associated protein 1’
MTOR	‘Mammalian target of rapamycin’
NMRI:nu/nu	Nacktmaus
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
p	Signifikanzniveau
P	Passage
p.o.	per os
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC	Pleomorphes Lungenkarzinom
PTX	Paclitaxel
r	Spearman-Koeffizient
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
Rt	Raumtemperatur
SCC	Plattenepithelkarzinom
SCID	‘severe combined immunodeficiency Maus’
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SNAI1	Snail
SNP	‘Single nucleotide polymorphism’
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
T/C	Verhältnis des Tumolvolumens der behandelten zur Kontrollgruppe
TGFA	Transformierender Wachstumsfaktor A
TP53	Tumorprotein 53
V	Variante des SNP
VEGFA	‘Vascular endothelial growth factor A’
VIM	Vimentin
WG	Wachstumsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp
XRCC	‘X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5’

6. LITERATUR

- [1] Epidemiologische Datenerhebung von Deutschland. Robert-Koch-Institut Februar (2011).
- [2] GLOBOCAN Cancer fact sheet. World Health Organization Mai (2010).
- [3] R.M.Huber, ., and . Manual - Tumore der Lunge. Tumorzentrum München, W.Zuckschwerdt Verlag GmbH . 2009.
Ref Type: Report
- [4] G.Goeckenjan and et al., Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* 64 (2010) e1-e164.
- [5] R.J.Knox, F.Friedlos, D.A.Lydall, and J.J.Roberts, Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* 46 (1986) 1972-1979.
- [6] G.Natarajan, R.Malathi, and E.Holler, Increased DNA-binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: activation theory revisited. *Biochem.Pharmacol.* 58 (1999) 1625-1629.
- [7] M.A.Jordan and L.Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat.Rev.Cancer* 4 (2004) 253-265.
- [8] M.E.Wall and M.C.Wani, Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 55 (1995) 753-760.
- [9] A.M.Storniolo, S.R.Allerheiligen, and H.L.Pearce, Preclinical, pharmacologic, and phase I studies of gemcitabine. *Semin.Oncol.* 24 (1997) S7.
- [10] S.M.Sieber, J.A.Mead, and R.H.Adamson, Pharmacology of antitumor agents from higher plants. *Cancer Treat.Rep.* 60 (1976) 1127-1139.
- [11] J.D.Loike and S.B.Horwitz, Effect of VP-16-213 on the intracellular degradation of DNA in HeLa cells. *Biochemistry* 15 (1976) 5443-5448.
- [12] E.K.Rowinsky, The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu.Rev.Med.* 55 (2004) 433-457.
- [13] E.Raymond, S.Faivre, and J.P.Armand, Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* 60 Suppl 1 (2000) 15-23.
- [14] European Medicines Agency. <http://www.ema.europa.eu> . 2011.
Ref Type: Electronic Citation
- [15] M.Prewett, P.Rockwell, R.F.Rockwell, N.A.Giorgio, J.Mendelsohn, H.I.Scher, and N.I.Goldstein, The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J.Immunother.Tumor Immunol.* 19 (1996) 419-427.
- [16] D.Hanahan and R.A.Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (2011) 646-674.
- [17] C.J.Sweeney, K.D.Miller, S.E.Sissons, S.Nozaqi, D.K.Heilman, J.Shen, and G.W.Sledge, Jr., The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. *Cancer Res.* 61 (2001) 3369-3372.
- [18] R.A.Brekken, J.P.Overholser, V.A.Stastny, J.Waltenberger, J.D.Minna, and P.E.Thorpe, Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res.* 60 (2000) 5117-5124.
- [19] C.G.Willett, Y.Boucher, T.E.di, D.G.Duda, L.L.Munn, R.T.Tong, D.C.Chung, D.V.Sahani, S.P.Kalva, S.V.Kozin, M.Mino, K.S.Cohen, D.T.Scadden, A.C.Hartford, A.J.Fischman, J.W.Clark, D.P.Ryan, A.X.Zhu, L.S.Blaszkowsky, H.X.Chen, P.C.Shellito, G.Y.Lauwers, and R.K.Jain, Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat.Med.* 10 (2004) 145-147.
- [20] G.P.Pfeifer, M.F.Denissenko, M.Olivier, N.Tretyakova, S.S.Hecht, and P.Hainaut, Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21 (2002) 7435-7451.
- [21] S.Rodenhuis, M.L.van de Wetering, W.J.Mooi, S.G.Evers, Z.N.van, and J.L.Bos, Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N.Engl.J.Med.* 317 (1987) 929-935.
- [22] J.L.Bos, ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49 (1989) 4682-4689.
- [23] Y.Suzuki, M.Orita, M.Shiraishi, K.Hayashi, and T.Sekiya, Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 5 (1990) 1037-1043.
- [24] S.Rodenhuis, L.Boerrigter, B.Top, R.J.Slebos, W.J.Mooi, V.L.van't, and Z.N.van, Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study. *J.Clin.Oncol.* 15 (1997) 285-291.
- [25] H.Ohgaki, J.M.Kros, Y.Okamoto, A.Gaspert, H.Huang, and M.O.Kurrer, APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett.* 207 (2004) 197-203.
- [26] M.Soda, Y.L.Choi, M.Enomoto, S.Takada, Y.Yamashita, S.Ishikawa, S.Fujiwara, H.Watanabe, K.Kurashina, H.Hatanaka, M.Bando, S.Ohno, Y.Ishikawa, H.Aburatani, T.Niki, Y.Sohara, Y.Sugiyama, and H.Mano,

- Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448 (2007) 561-566.
- [27] European group on tumour markers. Tumour markers in lung cancer - EGTM recommendations. http://www.egtmeu/tumour_markers_in_lung_cancer.htm . 2011.
Ref Type: Electronic Citation
- [28] M.Herlyn, Z.Steplewski, D.Herlyn, and H.Koprowski, Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76 (1979) 1438-1442.
- [29] P.T.Went, A.Lugli, S.Meier, M.Bundi, M.Mirlacher, G.Sauter, and S.Dirnhofer, Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum.Pathol.* 35 (2004) 122-128.
- [30] P.Went, M.Vasei, L.Bubendorf, L.Terracciano, L.Tornillo, U.Riede, J.Kononen, R.Simon, G.Sauter, and P.A.Baeuerle, Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br.J.Cancer* 94 (2006) 128-135.
- [31] M.Kasper, J.Behrens, D.Schuh, and M.Muller, Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury. *Histochem.Cell Biol.* 103 (1995) 281-286.
- [32] S.V.Litvinov, M.Balzar, M.J.Winter, H.A.Bakker, B.Briaire-de, I, F.Prins, G.J.Fleuren, and S.O.Warnaar, Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J.Cell Biol.* 139 (1997) 1337-1348.
- [33] M.Guarino, B.Rubino, and G.Ballabio, The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39 (2007) 305-318.
- [34] M.A.Huber, N.Kraut, and H.Beug, Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17 (2005) 548-558.
- [35] J.Behrens, M.M.Mareel, F.M.Van Roy, and W.Birchmeier, Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J.Cell Biol.* 108 (1989) 2435-2447.
- [36] W.Pao, V.Miller, M.Zakowski, J.Doherty, K.Politi, I.Sarkaria, B.Singh, R.Heelan, V.Rusch, L.Fulton, E.Mardis, D.Kupfer, R.Wilson, M.Kris, and H.Varmus, EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 (2004) 13306-13311.
- [37] T.J.Lynch, D.W.Bell, R.Sordella, S.Gurubhagavatula, R.A.Okimoto, B.W.Brannigan, P.L.Harris, S.M.Haserlat, J.G.Supko, F.G.Haluska, D.N.Louis, D.C.Christiani, J.Settleman, and D.A.Haber, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N.Engl.J.Med.* 350 (2004) 2129-2139.
- [38] J.G.Paez, P.A.Janne, J.C.Lee, S.Tracy, H.Greulich, S.Gabriel, P.Herman, F.J.Kaye, N.Lindeman, T.J.Boggon, K.Naoki, H.Sasaki, Y.Fujii, M.J.Eck, W.R.Sellers, B.E.Johnson, and M.Meyerson, EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304 (2004) 1497-1500.
- [39] W.Pao, T.Y.Wang, G.J.Riely, V.A.Miller, Q.Pan, M.Ladanyi, M.F.Zakowski, R.T.Heelan, M.G.Kris, and H.E.Varmus, KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS.Med.* 2 (2005) e17.
- [40] A.J.Brookes, The essence of SNPs. *Gene* 234 (1999) 177-186.
- [41] M.B.Stein, M.D.Fallin, N.J.Schork, and J.Gelernter, COMT polymorphisms and anxiety-related personality traits. *Neuropsychopharmacology* 30 (2005) 2092-2102.
- [42] M.Thomas, A.Kalita, S.Labrecque, D.Pim, L.Banks, and G.Matlashewski, Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol.Cell Biol.* 19 (1999) 1092-1100.
- [43] P.Dumont, J.I.Leu, P.A.Della, III, D.L.George, and M.Murphy, The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat.Genet.* 33 (2003) 357-365.
- [44] K.Shiraishi, T.Kohno, C.Tanai, Y.Goto, A.Kuchiba, S.Yamamoto, K.Tsuta, H.Nokihara, N.Yamamoto, I.Sekine, Y.Ohe, T.Tamura, J.Yokota, and H.Kunitoh, Association of DNA repair gene polymorphisms with response to platinum-based doublet chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 28 (2010) 4945-4952.
- [45] S.Dai, C.Mao, L.Jiang, G.Wang, and H.Cheng, P53 polymorphism and lung cancer susceptibility: a pooled analysis of 32 case-control studies. *Hum.Genet.* 125 (2009) 633-638.
- [46] Y.Li, L.X.Qiu, X.K.Shen, X.J.Lv, X.P.Qian, and Y.Song, A meta-analysis of TP53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk: evidence from 15,857 subjects. *Lung Cancer* 66 (2009) 15-21.
- [47] G.L.Bond, W.Hu, and A.Levine, A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res.* 65 (2005) 5481-5484.
- [48] H.Lind, S.Zienolddiny, P.O.Ekstrom, V.Skaug, and A.Haugen, Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of nonsmall cell lung cancer. *Int.J.Cancer* 119 (2006) 718-721.
- [49] S.Wilkening, J.L.Bermejo, and K.Hemminki, MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis* 28 (2007) 2262-2267.
- [50] J.Y.Han, G.K.Lee, D.H.Jang, S.Y.Lee, and J.S.Lee, Association of p53 codon 72 polymorphism and MDM2 SNP309 with clinical outcome of advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 113 (2008) 799-807.
- [51] T.Moriai, M.S.Kobrin, C.Hope, L.Speck, and M.Korc, A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (1994) 10217-10221.

- [52] H.Sasaki, K.Okuda, S.Shimizu, M.Takada, M.Kawahara, N.Kitahara, M.Okumura, A.Matsumura, K.Iuchi, T.Kawaguchi, A.Kubo, O.Kawano, H.Yukiue, M.Yano, and Y.Fujii, EGFR R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for advanced lung cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 135 (2009) 313-318.
- [53] M.E.Garber, O.G.Troyanskaya, K.Schluens, S.Petersen, Z.Thaesler, M.Pacyna-Gengelbach, R.M.van de, G.D.Rosen, C.M.Perou, R.I.Whyte, R.B.Altman, P.O.Brown, D.Botstein, and I.Petersen, Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001) 13784-13789.
- [54] A.Bhattacharjee, W.G.Richards, J.Staunton, C.Li, S.Monti, P.Vasa, C.Ladd, J.Beheshti, R.Bueno, M.Gillette, M.Loda, G.Weber, E.J.Mark, E.S.Lander, W.Wong, B.E.Johnson, T.R.Golub, D.J.Sugarbaker, and M.Meyerson, Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001) 13790-13795.
- [55] D.A.Wigle, I.Jurisica, N.Radulovich, M.Pintilie, J.Rossant, N.Liu, C.Lu, J.Woodgett, I.Seiden, M.Johnston, S.Keshavjee, G.Darling, T.Winton, B.J.Breitkreutz, P.Jorgenson, M.Tyers, F.A.Shepherd, and M.S.Tsao, Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res.* 62 (2002) 3005-3008.
- [56] D.J.Raz, M.R.Ray, J.Y.Kim, B.He, M.Taron, M.Skrzypski, M.Segal, D.R.Gandara, R.Rosell, and D.M.Jablons, A multigene assay is prognostic of survival in patients with early-stage lung adenocarcinoma. *Clin.Cancer Res.* 14 (2008) 5565-5570.
- [57] H.Y.Chen, S.L.Yu, C.H.Chen, G.C.Chang, C.Y.Chen, A.Yuan, C.L.Cheng, C.H.Wang, H.J.Terng, S.F.Kao, W.K.Chan, H.N.Li, C.C.Liu, S.Singh, W.J.Chen, J.J.Chen, and P.C.Yang, A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N.Engl.J.Med.* 356 (2007) 11-20.
- [58] A.Potti, S.Mukherjee, R.Petersen, H.K.Dressman, A.Bild, J.Koontz, R.Kratzke, M.A.Watson, M.Kelley, G.S.Ginsburg, M.West, D.H.Harpole, Jr., and J.R.Nevins, A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N.Engl.J.Med.* 355 (2006) 570-580.
- [59] M.Raponi, Y.Zhang, J.Yu, G.Chen, G.Lee, J.M.Taylor, J.Macdonald, D.Thomas, C.Moskaluk, Y.Wang, and D.G.Beer, Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res.* 66 (2006) 7466-7472.
- [60] K.Shedden, J.M.Taylor, S.A.Enkemann, M.S.Tsao, T.J.Yeatman, W.L.Gerald, S.Eschrich, I.Jurisica, T.J.Giordano, D.E.Misek, A.C.Chang, C.Q.Zhu, D.Strumpf, S.Hanash, F.A.Shepherd, K.Ding, L.Seymour, K.Naoki, N.Pennell, B.Weir, R.Verhaak, C.Ladd-Acosta, T.Golub, M.Gruidl, A.Sharma, J.Szoke, M.Zakowski, V.Rusch, M.Kris, A.Viale, N.Motoi, W.Travis, B.Conley, V.E.Seshan, M.Meyerson, R.Kuick, K.K.Dobbin, T.Lively, J.W.Jacobson, and D.G.Beer, Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat.Med.* 14 (2008) 822-827.
- [61] J.Subramanian and R.Simon, Gene expression-based prognostic signatures in lung cancer: ready for clinical use? *J.Natl.Cancer Inst.* 102 (2010) 464-474.
- [62] B.J.Xu, A.L.Gonzalez, T.Kikuchi, K.Yanagisawa, P.P.Massion, H.Wu, S.E.Mason, S.J.Olson, Y.Shyr, D.P.Carbone, and R.M.Caprioli, MALDI-MS derived prognostic protein markers for resected non-small cell lung cancer. *Proteomics.Clin.Appl.* 2 (2008) 1508-1517.
- [63] F.Taguchi, B.Solomon, V.Gregorc, H.Roder, R.Gray, K.Kasahara, M.Nishio, J.Brahmer, A.Spreafico, V.Ludovini, P.P.Massion, R.Dziadziszko, J.Schiller, J.Grigorieva, M.Tsypin, S.W.Hunsucker, R.Caprioli, M.W.Duncan, F.R.Hirsch, P.A.Bunn, Jr., and D.P.Carbone, Mass spectrometry to classify non-small-cell lung cancer patients for clinical outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a multicohort cross-institutional study. *J.Natl.Cancer Inst.* 99 (2007) 838-846.
- [64] S.Salmon, H.Chen, S.Chen, R.Herbst, A.Tsao, H.Tran, A.Sandler, D.Billheimer, Y.Shyr, J.W.Lee, P.Massion, J.Brahmer, J.Schiller, D.Carbone, and T.P.Dang, Classification by mass spectrometry can accurately and reliably predict outcome in patients with non-small cell lung cancer treated with erlotinib-containing regimen. *J.Thorac.Oncol.* 4 (2009) 689-696.
- [65] J.Heymach. AACR 102nd Annual Meeting. 2-4-2011. 2-4-2011.
Ref Type: Conference Proceeding
- [66] A.Nadkar, C.Pungaliya, K.Drake, E.Zajac, S.S.Singhal, and S.Awasthi, Therapeutic resistance in lung cancer. *Expert.Opin.Drug Metab Toxicol.* 2 (2006) 753-777.
- [67] M.Muller, Human ABC-transporters. <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm> Juni (2011).
- [68] G.L.Scheffer, A.C.Pijnenborg, E.F.Smit, M.Muller, D.S.Postma, W.Timens, d.van, V, E.G.de Vries, and R.J.Scheper, Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J.Clin.Pathol.* 55 (2002) 332-339.
- [69] M.M.Gottesman, T.Fojo, and S.E.Bates, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat.Rev.Cancer* 2 (2002) 48-58.
- [70] S.Marchetti, N.A.de Vries, T.Buckle, M.J.Bolijn, M.A.van Eijndhoven, J.H.Beijnen, R.Mazzanti, T.O.van, and J.H.Schellens, Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1-/-/Mdr1a/1b-/- (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol.Cancer Ther.* 7 (2008) 2280-2287.
- [71] Y.Abe, M.Nakamura, E.Ota, Y.Ozeki, S.Tamai, H.Inoue, Y.Ueyama, T.Ogata, and N.Tamaoki, Expression of the multidrug resistance gene (MDR1) in non-small cell lung cancer. *Jpn.J.Cancer Res.* 85 (1994) 536-541.
- [72] S.Roy, E.Kenny, S.Kennedy, A.Larkin, J.Ballot, M.P.De Villarreal, J.Crown, and L.O'Driscoll, MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 mRNA and protein expression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 27 (2007) 1325-1330.

-
- [73] S.L.Lai, L.J.Goldstein, M.M.Gottesman, I.Pastan, C.M.Tsai, B.E.Johnson, J.L.Mulshine, D.C.Ihde, K.Kayser, and A.F.Gazdar, MDR1 gene expression in lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 81 (1989) 1144-1150.
- [74] M.Oka, M.Fukuda, A.Sakamoto, H.Takatani, M.Fukuda, H.Soda, and S.Kohno, The clinical role of MDR1 gene expression in human lung cancer. *Anticancer Res.* 17 (1997) 721-724.
- [75] M.Volm and W.Rittgen, Cellular predictive factors for the drug response of lung cancer. *Anticancer Res.* 20 (2000) 3449-3458.
- [76] M.Volm, R.Koomagi, J.Mattern, and T.Efferth, Protein expression profiles indicative for drug resistance of non-small cell lung cancer. *Br.J.Cancer* 87 (2002) 251-257.
- [77] N.Triller, P.Korosec, I.Kern, M.Kosnik, and A.Debeljak, Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease. *Lung Cancer* 54 (2006) 235-240.
- [78] N.Savaraj, C.J.Wu, R.Xu, T.Lampidis, S.Lai, E.Donnely, J.Solomon, and L.G.Feun, Multidrug-resistant gene expression in small-cell lung cancer. *Am.J.Clin.Oncol.* 20 (1997) 398-403.
- [79] D.W.Loe, R.G.Deeley, and S.P.Cole, Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* 58 (1998) 5130-5136.
- [80] P.Borst, R.Evers, M.Kool, and J.Wijnholds, A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J.Natl.Cancer Inst.* 92 (2000) 1295-1302.
- [81] M.M.Gottesman, Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu.Rev.Med.* 53 (2002) 615-627.
- [82] S.P.Cole, G.Bhardwaj, J.H.Gerlach, J.E.Mackie, C.E.Grant, K.C.Almquist, A.J.Stewart, E.U.Kurz, A.M.Duncan, and R.G.Deeley, Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258 (1992) 1650-1654.
- [83] J.Li, Z.N.Li, Y.J.Du, X.Q.Li, Q.L.Bao, and P.Chen, Expression of MRP1, BCRP, LRP, and ERCC1 in advanced non-small-cell lung cancer: correlation with response to chemotherapy and survival. *Clin.Lung Cancer* 10 (2009) 414-421.
- [84] L.C.Young, B.G.Campling, S.P.Cole, R.G.Deeley, and J.H.Gerlach, Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clin.Cancer Res.* 7 (2001) 1798-1804.
- [85] T.Litman, M.Bhangi, E.Hudson, P.Fetsch, A.Abati, D.D.Ross, K.Miyake, J.H.Resau, and S.E.Bates, The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci.* 113 (Pt 11) (2000) 2011-2021.
- [86] N.B.Elkind, Z.Szentpetery, A.Apati, C.Ozvegy-Laczka, G.Varady, O.Ujhelly, K.Szabo, L.Homolya, A.Varadi, L.Buday, G.Keri, K.Nemet, and B.Sarkadi, Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res.* 65 (2005) 1770-1777.
- [87] J.E.Diestra, G.L.Scheffer, I.Catala, M.Maliepaard, J.H.Schellens, R.J.Scheper, J.R.Germa-Lluch, and M.A.Izquierdo, Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J.Pathol.* 198 (2002) 213-219.
- [88] K.Yoh, G.Ishii, T.Yokose, Y.Minegishi, K.Tsuta, K.Goto, Y.Nishiwaki, T.Kodama, M.Suga, and A.Ochiai, Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 10 (2004) 1691-1697.
- [89] P.Seve and C.Dumontet, Chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Curr.Med.Chem.Anticancer Agents* 5 (2005) 73-88.
- [90] Y.H.Kim, G.Ishii, K.Goto, S.Ota, K.Kubota, Y.Murata, M.Mishima, N.Saijo, Y.Nishiwaki, and A.Ochiai, Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 65 (2009) 105-111.
- [91] V.A.Kickhoefer, K.S.Rajavel, G.L.Scheffer, W.S.Dalton, R.J.Scheper, and L.H.Rome, Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J Biol.Chem.* 273 (1998) 8971-8974.
- [92] E.Lee and S.J.Lim, The association of increased lung resistance protein expression with acquired etoposide resistance in human H460 lung cancer cell lines. *Arch.Pharm.Res.* 29 (2006) 1018-1023.
- [93] C.M.Laurencot, G.L.Scheffer, R.J.Scheper, and R.H.Shoemaker, Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines. *Int.J Cancer* 72 (1997) 1021-1026.
- [94] Y.Shimamoto, T.Sumizawa, M.Haraguchi, T.Gotanda, H.C.Jueng, T.Furukawa, R.Sakata, and S.Akiyama, Direct activation of the human major vault protein gene by DNA-damaging agents. *Oncol.Rep.* 15 (2006) 645-652.
- [95] S.Zochbauer-Muller, A.F.Gazdar, and J.D.Minna, Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu.Rev.Physiol* 64 (2002) 681-708.
- [96] I.F.Tannock, New perspectives in combined radiotherapy and chemotherapy treatment. *Lung Cancer* 10 Suppl 1 (1994) S29-S51.
- [97] D.N.Carney, The biology of lung cancer. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 1 (1995) 271-277.
- [98] C.M.Tsai, K.T.Chang, L.Li, R.P.Perng, and L.Y.Yang, Interrelationships between cellular nucleotide excision repair, cisplatin cytotoxicity, HER-2/neu gene expression, and epidermal growth factor receptor level in non-small cell lung cancer cells. *Jpn.J.Cancer Res.* 91 (2000) 213-222.
- [99] G.J.Peters, C.J.Van Moorsel, B.Lakerveld, K.Smid, P.Noordhuis, E.C.Comijn, D.Weaver, J.C.Willey, D.Voorn, d.van, V, and H.M.Pinedo, Effects of gemcitabine on cis-platinum-DNA adduct formation and repair in a panel
-

- of gemcitabine and cisplatin-sensitive or -resistant human ovarian cancer cell lines. *Int.J.Oncol.* 28 (2006) 237-244.
- [100] S.Zienolddiny, D.Campa, H.Lind, D.Ryberg, V.Skaug, L.Stangeland, D.H.Phillips, F.Canizian, and A.Haugen, Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 27 (2006) 560-567.
- [101] E.L.Goode, C.M.Ulrich, and J.D.Potter, Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11 (2002) 1513-1530.
- [102] R.J.Hung, J.Hall, P.Brennan, and P.Boffetta, Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am.J.Epidemiol.* 162 (2005) 925-942.
- [103] H.Lage and M.Dietel, Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 125 (1999) 156-165.
- [104] M.R.Shen, I.M.Jones, and H.Mohrenweiser, Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 58 (1998) 604-608.
- [105] J.J.Yu, K.B.Lee, C.Mu, Q.Li, T.V.Abernathy, F.Bostick-Bruton, and E.Reed, Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int.J.Oncol.* 16 (2000) 555-560.
- [106] C.Zhou, S.Ren, S.Zhou, L.Zhang, C.Su, Z.Zhang, Q.Deng, and J.Zhang, Predictive effects of ERCC1 and XRCC3 SNP on efficacy of platinum-based chemotherapy in advanced NSCLC patients. *Jpn.J.Clin.Oncol.* 40 (2010) 954-960.
- [107] F.Li, X.Sun, N.Sun, S.Qin, H.Cheng, J.Feng, B.Chen, L.Cheng, Z.Lu, J.Ji, and Y.Zhou, Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and clinical response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Am.J.Clin.Oncol.* 33 (2010) 489-494.
- [108] R.M.Lunn, K.J.Helzlsouer, R.Parshad, D.M.Umbach, E.L.Harris, K.K.Sanford, and D.A.Bell, XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 21 (2000) 551-555.
- [109] D.Palli, A.Russo, G.Masala, C.Saieva, S.Guarrera, S.Carturan, A.Munnia, G.Matullo, and M.Peluso, DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int.J.Cancer* 94 (2001) 121-127.
- [110] G.Matullo, M.Peluso, S.Polidoro, S.Guarrera, A.Munnia, V.Krogh, G.Masala, F.Berrino, S.Panico, R.Tumino, P.Vineis, and D.Palli, Combination of DNA repair gene single nucleotide polymorphisms and increased levels of DNA adducts in a population-based study. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 12 (2003) 674-677.
- [111] C.Kiyohara and K.Yoshimasu, Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int.J.Med.Sci.* 4 (2007) 59-71.
- [112] A.Matakidou, G.R.el, E.L.Webb, M.F.Rudd, H.Bridle, T.Eisen, and R.S.Houlston, Genetic variation in the DNA repair genes is predictive of outcome in lung cancer. *Hum.Mol.Genet.* 16 (2007) 2333-2340.
- [113] D.Schrama, D.Scherer, M.Schneider, M.Zapatka, E.B.Brockner, D.Schadendorf, S.Ugurel, R.Kumar, and J.C.Becker, ERCC5 p.Asp1104His and ERCC2 p.Lys751Gln Polymorphisms Are Independent Prognostic Factors for the Clinical Course of Melanoma. *J.Invest Dermatol.* 131 (2011) 1280-1290.
- [114] K.K.Khanna and S.P.Jackson, DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat.Genet.* 27 (2001) 247-254.
- [115] H.Sun, Y.Qiao, X.Zhang, L.Xu, X.Jia, D.Sun, C.Shen, A.Liu, Y.Zhao, Y.Jin, Y.Yu, J.Bai, and S.Fu, XRCC3 Thr241Met polymorphism with lung cancer and bladder cancer: a meta-analysis. *Cancer Sci.* 101 (2010) 1777-1782.
- [116] R.Rosell-Costa, V.Alberola, C.Camps, G.Lopez-Vivanco, T.Moran, R.Etxaniz, R.De Las Penas, M.Gupta, M.Taron, and J.J.Sanchez, Clinical outcome of gemcitabine /cisplatin - vs docetaxel /cis-treated stage IV non-small cell lung cancer (patients according to X-ray repair cross-complementing group 3 polymorphism and age. *J.Clin.Oncol.* 24 (2006) 7055.
- [117] M.A.Watson, R.K.Stewart, G.B.Smith, T.E.Massey, and D.A.Bell, Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19 (1998) 275-280.
- [118] J.Stoehlmacher, D.J.Park, W.Zhang, D.Yang, S.Groshen, S.Zahedy, and H.J.Lenz, A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br.J.Cancer* 91 (2004) 344-354.
- [119] Y.Yarden and M.X.Sliwkowski, Untangling the ErbB signalling network. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2 (2001) 127-137.
- [120] M.A.Olayioye, R.M.Neve, H.A.Lane, and N.E.Hynes, The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19 (2000) 3159-3167.
- [121] T.P.Garrett, N.M.McKern, M.Lou, T.C.Elleman, T.E.Adams, G.O.Lovrecz, M.Kofler, R.N.Jorissen, E.C.Nice, A.W.Burgess, and C.W.Ward, The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol.Cell* 11 (2003) 495-505.
- [122] D.Graus-Porta, R.R.Beerli, J.M.Daly, and N.E.Hynes, ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 16 (1997) 1647-1655.
- [123] P.M.Guy, J.V.Platko, L.C.Cantley, R.A.Cerione, and K.L.Carraway, III, Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (1994) 8132-8136.
- [124] M.A.Olayioye, D.Graus-Porta, R.R.Beerli, J.Rohrer, B.Gay, and N.E.Hynes, ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol.Cell Biol.* 18 (1998) 5042-5051.

- [125] R.Pinkas-Kramarski, L.Soussan, H.Waterman, G.Levkowitz, I.Alroy, L.Klapper, S.Lavi, R.Seger, B.J.Ratzkin, M.Sela, and Y.Yarden, Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 15 (1996) 2452-2467.
- [126] S.M.Feng, C.I.Sartor, D.Hunter, H.Zhou, X.Yang, L.S.Caskey, R.Dy, R.S.Muraoka-Cook, and H.S.Earp, III, The HER4 cytoplasmic domain, but not its C terminus, inhibits mammary cell proliferation. *Mol.Endocrinol.* 21 (2007) 1861-1876.
- [127] H.Yamamoto, S.Toyooka, and T.Mitsudomi, Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 63 (2009) 315-321.
- [128] N.E.Hynes and D.F.Stern, The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim.Biophys.Acta* 1198 (1994) 165-184.
- [129] I.J.Dahabreh, H.Linardou, F.Siannis, P.Kosmidis, D.Bafaloukos, and S.Murray, Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 16 (2010) 291-303.
- [130] D.J.Slamon, G.M.Clark, S.G.Wong, W.J.Levin, A.Ullrich, and W.L.McGuire, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (1987) 177-182.
- [131] F.Cappuzzo, M.Varella-Garcia, H.Shigematsu, I.Domenichini, S.Bartolini, G.L.Ceresoli, E.Rossi, V.Ludovini, V.Gregorc, L.Toschi, W.A.Franklin, L.Crino, A.F.Gazdar, P.A.Bunn, Jr., and F.R.Hirsch, Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 5007-5018.
- [132] F.Cappuzzo, F.R.Hirsch, E.Rossi, S.Bartolini, G.L.Ceresoli, L.Bemis, J.Haney, S.Witta, K.Danenber, I.Domenichini, V.Ludovini, E.Magrini, V.Gregorc, C.Dogliani, A.Sidoni, M.Tonato, W.A.Franklin, L.Crino, P.A.Bunn, Jr., and M.Varella-Garcia, Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 97 (2005) 643-655.
- [133] T.Takano, Y.Ohe, H.Sakamoto, K.Tsuta, Y.Matsuno, U.Tateishi, S.Yamamoto, H.Nokihara, N.Yamamoto, I.Sekine, H.Kunitoh, T.Shibata, T.Sakiyama, T.Yoshida, and T.Tamura, Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 6829-6837.
- [134] D.B.Weiner, J.Nordberg, R.Robinson, P.C.Nowell, A.Gazdar, M.I.Greene, W.V.Williams, J.A.Cohen, and J.A.Kern, Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res.* 50 (1990) 421-425.
- [135] A.E.al Moustafa, M.aoui-Jamali, J.Paterson, and M.O'Connor-McCourt, Expression of P185erbB-2, P160erbB-3, P180erbB-4, and heregulin alpha in human normal bronchial epithelial and lung cancer cell lines. *Anticancer Res.* 19 (1999) 481-486.
- [136] A.Starr, J.Greif, A.Vexler, M.shkenazy-Voghera, V.Glades, C.Rubin, G.Kerber, S.Marmor, S.Lev-Ari, M.Inbar, Y.Yarden, and R.Ben-Yosef, ErbB4 increases the proliferation potential of human lung cancer cells and its blockage can be used as a target for anti-cancer therapy. *Int.J.Cancer* 119 (2006) 269-274.
- [137] N.Normanno, C.Bianco, L.A.De, and D.S.Salomon, The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci.* 6 (2001) D685-D707.
- [138] R.Derynck, The physiology of transforming growth factor-alpha. *Adv.Cancer Res.* 58 (1992) 27-52.
- [139] K.A.Stern, T.L.Place, and N.L.Lill, EGF and amphiregulin differentially regulate Cbl recruitment to endosomes and EGF receptor fate. *Biochem.J.* 410 (2008) 585-594.
- [140] H.Toyoda, T.Komurasaki, Y.Ikeda, M.Yoshimoto, and S.Morimoto, Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. *FEBS Lett.* 377 (1995) 403-407.
- [141] M.Shoyab, G.D.Plowman, V.L.McDonald, J.G.Bradley, and G.J.Todaro, Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 243 (1989) 1074-1076.
- [142] M.Tateishi, T.Ishida, T.Mitsudomi, S.Kaneko, and K.Sugimachi, Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.* 50 (1990) 7077-7080.
- [143] V.Rusch, J.Baselga, C.Cordon-Cardo, J.Orazem, M.Zaman, S.Hoda, J.McIntosh, J.Kurie, and E.Dmitrovsky, Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res.* 53 (1993) 2379-2385.
- [144] N.Ishikawa, Y.Daigo, A.Takano, M.Taniwaki, T.Kato, S.Hayama, H.Murakami, Y.Takeshima, K.Inai, H.Nishimura, E.Tsuchiya, N.Kohno, and Y.Nakamura, Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 65 (2005) 9176-9184.
- [145] V.Gorgoulis, D.Aninos, P.Mikou, P.Kanavaros, A.Karameris, J.Joordanoglou, A.Rasidakis, M.Veslemes, B.Ozanne, and D.A.Spandidos, Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res.* 12 (1992) 1183-1187.
- [146] M.Tateishi, T.Ishida, T.Mitsudomi, and K.Sugimachi, Prognostic implication of transforming growth factor alpha in adenocarcinoma of the lung--an immunohistochemical study. *Br.J Cancer* 63 (1991) 130-133.
- [147] N.Ishikawa, Y.Daigo, A.Takano, M.Taniwaki, T.Kato, S.Hayama, H.Murakami, Y.Takeshima, K.Inai, H.Nishimura, E.Tsuchiya, N.Kohno, and Y.Nakamura, Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 65 (2005) 9176-9184.

- [148] M.A.Vollebergh, I.Kappers, H.M.Klomp, J.C.Buning-Kager, C.M.Korse, M.Hauptmann, K.E.de Visser, M.M.van den Heuvel, and S.C.Linn, Ligands of epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor family as serum biomarkers for response to epidermal growth factor receptor inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J.Thorac.Oncol.* 5 (2010) 1939-1948.
- [149] M.H.Chang, H.K.Ahn, J.Lee, C.K.Jung, Y.L.Choi, Y.H.Park, J.S.Ahn, K.Park, and M.J.Ahn, Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* 117 (2011) 143-151.
- [150] S.Kakiuchi, Y.Daigo, N.Ishikawa, C.Furukawa, T.Tsunoda, S.Yano, K.Nakagawa, T.Tsuruo, N.Kohno, M.Fukuoka, S.Sone, and Y.Nakamura, Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum.Mol.Genet.* 13 (2004) 3029-3043.
- [151] K.Yonesaka, K.Zejnullahu, N.Lindeman, A.J.Homes, D.M.Jackman, F.Zhao, A.M.Rogers, B.E.Johnson, and P.A.Janne, Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin.Cancer Res.* 14 (2008) 6963-6973.
- [152] S.Khambata-Ford, C.R.Garrett, N.J.Meropol, M.Basik, C.T.Harbison, S.Wu, T.W.Wong, X.Huang, C.H.Takimoto, A.K.Godwin, B.R.Tan, S.S.Krishnamurthi, H.A.Burris, III, E.A.Poplin, M.Hidalgo, J.Baselga, E.A.Clark, and D.J.Mauro, Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin.Oncol.* 25 (2007) 3230-3237.
- [153] M.A.Olayioye, D.Graus-Porta, R.R.Beerli, J.Rohrer, B.Gay, and N.E.Hynes, ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol.Cell Biol.* 18 (1998) 5042-5051.
- [154] S.P.Soltoff and L.C.Cantley, p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J.Biol.Chem.* 271 (1996) 563-567.
- [155] P.Fedi, J.H.Pierce, P.P.di Fiore, and M.H.Kraus, Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol.Cell Biol.* 14 (1994) 492-500.
- [156] R.Bianco, T.Troiani, G.Tortora, and F.Ciardello, Intrinsic and acquired resistance to EGFR inhibitors in human cancer therapy. *Endocr.Relat Cancer* 12 Suppl 1 (2005) S159-S171.
- [157] G.Carpenter, Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J.Cell Biol.* 146 (1999) 697-702.
- [158] N.Prenzel, E.Zwick, H.Daub, M.Leserer, R.Abraham, C.Wallasch, and A.Ullrich, EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402 (1999) 884-888.
- [159] K.Kasahara, T.Arao, K.Sakai, K.Matsumoto, A.Sakai, H.Kimura, T.Sone, A.Horiike, M.Nishio, T.Ohira, N.Ikeda, T.Yamanaka, N.Saijo, and K.Nishio, Impact of serum hepatocyte growth factor on treatment response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung adenocarcinoma. *Clin.Cancer Res.* 16 (2010) 4616-4624.
- [160] P.Carmeliet, Angiogenesis in health and disease. *Nat.Med.* 9 (2003) 653-660.
- [161] L.M.Ellis, Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 18 (2004) 1007-21, viii.
- [162] R.K.Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307 (2005) 58-62.
- [163] N.Ferrara, VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat.Rev.Cancer* 2 (2002) 795-803.
- [164] N.Ferrara, H.P.Gerber, and J.LeCouter, The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* 9 (2003) 669-676.
- [165] G.Bergers and L.E.Benjamin, Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat.Rev.Cancer* 3 (2003) 401-410.
- [166] T.Tammela, B.Enholm, K.Alitalo, and K.Paavonen, The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc.Res.* 65 (2005) 550-563.
- [167] T.Tammela, B.Enholm, K.Alitalo, and K.Paavonen, The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc.Res.* 65 (2005) 550-563.
- [168] R.S.Herbst, D.H.Johnson, E.Mininberg, D.P.Carbone, T.Henderson, E.S.Kim, G.Blumenschein, Jr., J.J.Lee, D.D.Liu, M.T.Truong, W.K.Hong, H.Tran, A.Tsao, D.Xie, D.A.Ramies, R.Mass, S.Seshagiri, D.A.Eberhard, S.K.Kelley, and A.Sandler, Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 2544-2555.
- [169] B.M.Lichtenberger, P.K.Tan, H.Niederleithner, N.Ferrara, P.Petzelbauer, and M.Sibilia, Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 140 (2010) 268-279.
- [170] P.Perrotte, T.Matsumoto, K.Inoue, H.Kuniyasu, B.Y.Eve, D.J.Hicklin, R.Radinsky, and C.P.Dinney, Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin.Cancer Res.* 5 (1999) 257-265.
- [171] J.Tabernero, The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol.Cancer Res.* 5 (2007) 203-220.
- [172] F.Ciardello, R.Bianco, V.Damiano, G.Fontanini, R.Caputo, G.Pomatico, P.S.De, A.R.Bianco, J.Mendelsohn, and G.Tortora, Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin.Cancer Res.* 6 (2000) 3739-3747.

- [173] R.M.Shaheen, S.A.Ahmad, W.Liu, N.Reinmuth, Y.D.Jung, W.W.Tseng, K.E.Drazan, C.D.Bucana, D.J.Hicklin, and L.M.Ellis, Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *Br.J.Cancer* 85 (2001) 584-589.
- [174] R.S.Herbst, D.H.Johnson, E.Mininberg, D.P.Carbone, T.Henderson, E.S.Kim, G.Blumenschein, Jr., J.J.Lee, D.D.Liu, M.T.Truong, W.K.Hong, H.Tran, A.Tsao, D.Xie, D.A.Ramies, R.Mass, S.Seshagiri, D.A.Eberhard, S.K.Kelley, and A.Sandler, Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 2544-2555.
- [175] H.J.Groen, E.F.Smit, and A.Dingemans, A phase II study of erlotinib and bevacizumab in patients with previously untreated stage IIIB/IV non-small cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 25 (2007) 7625.
- [176] R.S.Herbst, V.J.O'Neill, L.Fehrenbacher, C.P.Belani, P.D.Bonomi, L.Hart, O.Melnyk, D.Ramies, M.Lin, and A.Sandler, Phase II study of efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy or erlotinib compared with chemotherapy alone for treatment of recurrent or refractory non small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 25 (2007) 4743-4750.
- [177] V.A.Miller, P.O'Connor, C.Soh, and F.Kabinavar, A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIIb trial (ATLAS) comparing bevacizumab therapy with or without erlotinib after completion of chemotherapy with bevacizumab for first-line treatment of locally advanced, recurrent, or metastatic non-small cell lung cancer. *J Clin.Oncol.* 27:18s (2009).
- [178] G.A.Otterson, P.G.O'Connor, M.Lin, and R.S.Herbst, Safety of bevacizumab and erlotinib therapy in patients with treated brain metastases in the phase III, placebo-controlled, randomized BeTa trial for pts with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) after failure of standard first-line chemotherapy. *J Clin Oncol* 27 (2009).
- [179] H.H.Fiebig and A.M.Burger, (2001) Human tumor xenografts and explants, in: B.A.Teicher (Ed.) *Animal models in cancer research*, Humana Press, 2001 pp. 113-137
- [180] S.P.Flanagan, 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet.Res.* 8 (1966) 295-309.
- [181] G.C.Bosma, R.P.Custer, and M.J.Bosma, A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301 (1983) 527-530.
- [182] J.Rygaard and C.O.Povlsen, Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 77 (1969) 758-760.
- [183] B.C.Giovanella, S.O.Yim, J.S.Stehlin, and L.J.Williams, Jr., Development of invasive tumors in the "nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 48 (1972) 1531-1533.
- [184] V.C.Daniel, L.Marchionni, J.S.Hierman, J.T.Rhodes, W.L.Devereux, C.M.Rudin, R.Yung, G.Parmigiani, M.Dorsch, C.D.Peacock, and D.N.Watkins, A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res.* 69 (2009) 3364-3373.
- [185] G.G.Steel, V.D.Courtenay, and M.J.Peckham, The response to chemotherapy of a variety of human tumour xenografts. *Br.J.Cancer* 47 (1983) 1-13.
- [186] T.Voskoglou-Nomikos, J.L.Pater, and L.Seymour, Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin.Cancer Res.* 9 (2003) 4227-4239.
- [187] J.I.Johnson, S.Decker, D.Zaharevitz, L.V.Rubinstein, J.M.Venditti, S.Schepartz, S.Kalyandrug, M.Christian, S.Ar buck, M.Hollingshead, and E.A.Sausville, Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br.J.Cancer* 84 (2001) 1424-1431.
- [188] J.G.Judde, M.Rebucci, N.Vogt, C.P.de, A.Livartowski, A.Chapelier, C.Tran-Perennou, K.Boye, R.Defrance, M.F.Poupon, and R.A.Bras-Goncalves, Gefitinib and chemotherapy combination studies in five novel human non small cell lung cancer xenografts. Evidence linking EGFR signaling to gefitinib antitumor response. *Int.J.Cancer* 120 (2007) 1579-1590.
- [189] R.Perez-Soler, B.Kemp, Q.P.Wu, L.Mao, J.Gomez, A.Zeleniuch-Jacquotte, H.Yee, J.S.Lee, J.Jagirdar, and Y.H.Ling, Response and determinants of sensitivity to paclitaxel in human non-small cell lung cancer tumors heterotransplanted in nude mice. *Clin.Cancer Res.* 6 (2000) 4932-4938.
- [190] M.F.Poupon, F.Arvelo, A.F.Goguel, Y.Bourgeois, M.Jacrot, N.Hanania, R.Arriagada, and C.T.Le, Response of small-cell lung cancer xenografts to chemotherapy: multidrug resistance and direct clinical correlates. *J.Natl.Cancer Inst.* 85 (1993) 2023-2029.
- [191] J.C.Cutz, J.Guan, J.Bayani, M.Yoshimoto, H.Xue, M.Sutcliffe, J.English, J.Flint, J.LeRiche, J.Yee, J.A.Squire, P.W.Gout, S.Lam, and Y.Z.Wang, Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancers: potential models for studying tumor progression-related changes. *Clin.Cancer Res.* 12 (2006) 4043-4054.
- [192] K.D.Pruitt, T.Tatusova, and D.R.Maglott, NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6048>. *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) D501-D504.
- [193] K.D.Pruitt, T.Tatusova, and D.R.Maglott, NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4323>. *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) D501-D504.
- [194] K.D.Pruitt, T.Tatusova, and D.R.Maglott, NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3851>. *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) D501-D504.

- [195] K.D.Pruitt, T.Tatusova, and D.R.Maglott, NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5996>. *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) D501-D504.
- [196] J.X.Hong, G.L.Wilson, C.H.Fox, and J.H.Kehrl, Isolation and characterization of a novel B cell activation gene. *J.Immunol.* 150 (1993) 3895-3904.
- [197] K.D.Pruitt, T.Tatusova, and D.R.Maglott, NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4069>. *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) D501-D504.
- [198] P.L.McCormack and S.J.Keam, Dasatinib: a review of its use in the treatment of chronic myeloid leukaemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs* 71 (2011) 1771-1795.
- [199] N.P.Shah, C.Tran, F.Y.Lee, P.Chen, D.Norris, and C.L.Sawyers, Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 305 (2004) 399-401.
- [200] S.Nam, D.Kim, J.Q.Cheng, S.Zhang, J.H.Lee, R.Buettner, J.Mirosevich, F.Y.Lee, and R.Jove, Action of the Src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 65 (2005) 9185-9189.
- [201] I.Fichtner, W.Slisow, J.Gill, M.Becker, B.Elbe, T.Hillebrand, and M.Bibby, Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas. *Eur.J.Cancer* 40 (2004) 298-307.
- [202] X.Dong, J.Guan, J.C.English, J.Flint, J.Yee, K.Evans, N.Murray, C.Macaulay, R.T.Ng, P.W.Gout, W.L.Lam, J.Laskin, V.Ling, S.Lam, and Y.Wang, Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clin.Cancer Res.* 16 (2010) 1442-1451.
- [203] C.K.Chung, R.Zaino, J.A.Stryker, M.O'Neill, Jr., and W.E.DeMuth, Jr., Carcinoma of the lung: evaluation of histological grade and factors influencing prognosis. *Ann.Thorac.Surg.* 33 (1982) 599-604.
- [204] M.A.Sulzer, M.P.Leers, J.A.van Noord, E.C.Bollen, and P.H.Theunissen, Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157 (1998) 1319-1323.
- [205] S.C.Lim, I.G.Jang, Y.C.Kim, and K.O.Park, The role of E-cadherin expression in non-small cell lung cancer. *J.Korean Med.Sci.* 15 (2000) 501-506.
- [206] J.Behrens, M.M.Mareel, F.M.Van Roy, and W.Birchmeier, Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J.Cell Biol.* 108 (1989) 2435-2447.
- [207] X.Xie, N.Brunner, G.Jensen, J.Albrechtsen, B.Gotthardsen, and J.Rygaard, Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors. *Clin.Exp.Metastasis* 10 (1992) 201-210.
- [208] C.Allen and N.Hogg, Elevation of infiltrating mononuclear phagocytes in human colorectal tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* 78 (1987) 465-470.
- [209] A.Mantovani, Tumor-associated macrophages. *Curr.Opin.Immunol.* 2 (1989) 689-692.
- [210] B.M.Vose and M.Moore, Human tumor-infiltrating lymphocytes: a marker of host response. *Semin.Hematol.* 22 (1985) 27-40.
- [211] I.Shimokawara, M.Imamura, N.Yamanaka, Y.Ishii, and K.Kikuchi, Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: an immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer* 49 (1982) 1456-1464.
- [212] L.Vaccarello, A.Kanbour, A.Kanbour-Shakir, and T.L.Whiteside, Tumor-infiltrating lymphocytes from ovarian tumors of low malignant potential. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 12 (1993) 41-50.
- [213] A.Bergamaschi, G.O.Hjortland, T.Triulzi, T.Sorlie, H.Johnsen, A.H.Ree, H.G.Russnes, S.Trønnes, G.M.Maelandsmo, O.Fodstad, A.L.Borresen-Dale, and O.Engebraaten, Molecular profiling and characterization of luminal-like and basal-like in vivo breast cancer xenograft models. *Mol.Oncol.* 3 (2009) 469-482.
- [214] C.C.Whiteford, S.Bilke, B.T.Greer, Q.Chen, T.A.Braunschweig, N.Cenacchi, J.S.Wei, M.A.Smith, P.Houghton, C.Morton, C.P.Reynolds, R.Lock, R.Gorlick, C.Khanna, C.J.Thiele, M.Takikita, D.Catchpoole, S.M.Hewitt, and J.Khan, Credentialing preclinical pediatric xenograft models using gene expression and tissue microarray analysis. *Cancer Res.* 67 (2007) 32-40.
- [215] D.A.Eberhard, B.E.Johnson, L.C.Amler, A.D.Goddard, S.L.Heldens, R.S.Herbst, W.L.Ince, P.A.Janne, T.Januario, D.H.Johnson, P.Klein, V.A.Miller, M.A.Ostland, D.A.Ramies, D.Sebisanovic, J.A.Stinson, Y.R.Zhang, S.Seshagiri, and K.J.Hillan, Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 5900-5909.
- [216] M.S.Brose, P.Volpe, M.Feldman, M.Kumar, I.Rishi, R.Gerrero, E.Einhorn, M.Herlyn, J.Minna, A.Nicholson, J.A.Roth, S.M.Albelda, H.Davies, C.Cox, G.Brignell, P.Stephens, P.A.Futreal, R.Wooster, M.R.Stratton, and B.L.Weber, BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 62 (2002) 6997-7000.
- [217] F.A.Shepherd, P.J.Rodrigues, T.Ciuleanu, E.H.Tan, V.Hirsh, S.Thongprasert, D.Campos, S.Maoleekoonpiroj, M.Smylie, R.Martins, K.M.van, M.Dediu, B.Findlay, D.Tu, D.Johnston, A.Bezjak, G.Clark, P.Santabarbara, and L.Seymour, Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N.Engl.J.Med.* 353 (2005) 123-132.

- [218] R.Perez-Soler, A.Chachoua, L.A.Hammond, E.K.Rowinsky, M.Huberman, D.Karp, J.Rigas, G.M.Clark, P.Santabarbara, and P.Bonomi, Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 22 (2004) 3238-3247.
- [219] R.Perez-Soler, Erlotinib: recent clinical results and ongoing studies in non small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 13 (2007) 4589s-4592s.
- [220] N.Hanna, R.Lilenbaum, R.Ansari, T.Lynch, R.Govindan, P.A.Janne, and P.Bonomi, Phase II trial of cetuximab in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 24 (2006) 5253-5258.
- [221] T.Tashiro, M.Inaba, T.Kobayashi, Y.Sakurai, K.Maruo, Y.Ohnishi, Y.Ueyama, and T.Nomura, Responsiveness of human lung cancer/nude mouse to antitumor agents in a model using clinically equivalent doses. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 24 (1989) 187-192.
- [222] T.John, D.Kohler, M.Pintilie, N.Yanagawa, N.A.Pham, M.Li, D.Panchal, F.Hui, F.Meng, F.A.Shepherd, and M.S.Tsao, The ability to form primary tumor xenografts is predictive of increased risk of disease recurrence in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 17 (2011) 134-141.
- [223] J.P.Pignon, H.Tribodet, G.V.Scagliotti, J.Y.Douillard, F.A.Shepherd, R.J.Stephens, A.Dunant, V.Torri, R.Rosell, L.Seymour, S.G.Spiro, E.Rolland, R.Fossati, D.Aubert, K.Ding, D.Waller, and C.T.Le, Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J.Clin.Oncol.* 26 (2008) 3552-3559.
- [224] H.J.Shin, J.S.Lee, W.K.Hong, and D.M.Shin, Study of multidrug resistance (mdr1) gene in non-small-cell lung cancer. *Anticancer Res.* 12 (1992) 367-370.
- [225] H.Dobre, D.Cesari, A.Mairovitz, C.Benac, S.Chantot-Bastarud, K.Dagnon, M.Antoine, C.Danel, J.F.Bernaudin, and J.Fleury-Feith, Multidrug resistance-associated protein (MRP1) is overexpressed in DNA aneuploid carcinomatous cells in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int.J.Cancer* 113 (2005) 568-574.
- [226] S.Kawabata, M.Oka, H.Soda, K.Shiozawa, K.Nakatomi, J.Tsurutani, Y.Nakamura, S.Do, T.Kitazaki, K.Sugahara, Y.Yamada, S.Kamihira, and S.Kohno, Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 9 (2003) 3052-3057.
- [227] W.Berger, U.Setinek, P.Hollaus, T.Zidek, E.Steiner, L.Elbling, H.Cantonati, J.Attems, A.Gsur, and M.Micksche, Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 131 (2005) 355-363.
- [228] A.M.Dingemans, J.van Ark-Otte, d.van, V, R.M.Apolinario, R.J.Scheper, P.E.Postmus, and G.Giaccone, Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. *Ann.Oncol.* 7 (1996) 625-630.
- [229] S.Rybarova, M.Hajdukova, I.Hodorova, M.Kocisova, A.Boor, E.Brabencova, P.Kasan, E.Biros, J.Mojzis, and L.Mirossay, Expression of the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) and the lung resistance-related protein (LRP) in human lung cancer. *Neoplasma* 51 (2004) 169-174.
- [230] S.R.Wright, A.H.Boag, G.Valdimarsson, D.R.Hipfner, B.G.Camplung, S.P.Cole, and R.G.Deeley, Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. *Clin.Cancer Res.* 4 (1998) 2279-2289.
- [231] M.Kourti, N.Vavatsi, N.Gombakis, V.Sidi, G.Tzimagiorgis, T.Papageorgiou, D.Kolioukas, and F.Athanassiadou, Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int.J.Hematol.* 86 (2007) 166-173.
- [232] S.M.Hart, K.Ganeshaguru, R.J.Scheper, H.G.Prentice, A.V.Hoffbrand, and A.B.Mehta, Expression of the human major vault protein LRP in acute myeloid leukemia. *Exp.Hematol.* 25 (1997) 1227-1232.
- [233] B.Li, R.Gao, H.Zhang, L.Q.Li, F.Gao, and R.J.Ren, [Studies on multidrug resistance associated protein in retinoblastoma]. *Zhonghua Yan.Ke.Za Zhi.* 45 (2009) 314-317.
- [234] Q.J.Lu, F.Dong, J.H.Zhang, X.H.Li, Y.Ma, and W.G.Jiang, Expression of multidrug resistance-related markers in primary neuroblastoma. *Chin Med.J.(Engl.)* 117 (2004) 1358-1363.
- [235] A.M.Bergman, H.M.Pinedo, I.Talianidis, G.Veerman, W.J.Loves, C.L.van der Wilt, and G.J.Peters, Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br.J.Cancer* 88 (2003) 1963-1970.
- [236] M.Stark, L.Rothem, G.Jansen, G.L.Scheffer, I.D.Goldman, and Y.G.Assaraf, Antifolate resistance associated with loss of MRP1 expression and function in Chinese hamster ovary cells with markedly impaired export of folate and cholate. *Mol.Pharmacol.* 64 (2003) 220-227.
- [237] J.F.Chiou, J.A.Liang, W.H.Hsu, J.J.Wang, S.T.Ho, and A.Kao, Comparing the relationship of Taxol-based chemotherapy response with P-glycoprotein and lung resistance-related protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung* 181 (2003) 267-273.
- [238] J.J.Yeh, W.H.Hsu, J.J.Wang, S.T.Ho, and A.Kao, Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with P-glycoprotein expression. *Respiration* 70 (2003) 32-35.
- [239] T.Harada, S.Ogura, K.Yamazaki, I.Kinoshita, T.Itoh, H.Isobe, K.Yamashiro, H.aka-Akita, and M.Nishimura, Predictive value of expression of P53, Bcl-2 and lung resistance-related protein for response to chemotherapy in non-small cell lung cancers. *Cancer Sci.* 94 (2003) 394-399.
- [240] K.E.Huffman and D.R.Corey, Major vault protein does not play a role in chemoresistance or drug localization in a non-small cell lung cancer cell line. *Biochemistry* 44 (2005) 2253-2261.
- [241] M.Volm, J.Mattern, and R.Koomagi, Expression of lung resistance-related protein (LRP) in non-small cell lung carcinomas of smokers and non-smokers and its predictive value for doxorubicin resistance. *Anticancer Drugs* 8 (1997) 931-936.

- [242] S.Ota, G.Ishii, K.Goto, K.Kubota, Y.H.Kim, M.Kojika, Y.Murata, M.Yamazaki, Y.Nishiwaki, K.Eguchi, and A.Ochiai, Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2008).
- [243] M.Filipits, V.Haddad, K.Schmid, A.Huynh, A.Dunant, F.Andre, E.Brambilla, R.Stahel, J.P.Pignon, J.C.Soria, H.H.Popper, C.T.Le, and R.Pirker, Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *Clin.Cancer Res.* 13 (2007) 3892-3898.
- [244] P.Seve and C.Dumontet, Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* 9 (2008) 168-175.
- [245] K.Noguchi, H.Kawahara, A.Kaji, K.Katayama, J.Mitsuhashi, and Y.Sugimoto, Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib. *Cancer Sci.* 100 (2009) 1701-1707.
- [246] P.Seve and C.Dumontet, Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol.* 9 (2008) 168-175.
- [247] W.Berger, U.Setinek, P.Hollaus, T.Zidek, E.Steiner, L.Elbling, H.Cantonati, J.Attems, A.Gsur, and M.Micksche, Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 131 (2005) 355-363.
- [248] X.Sun, F.Li, N.Sun, Q.Shukui, C.Baoan, F.Jifeng, C.Lu, L.Zuhong, C.Hongyan, C.Yuandong, J.Jiazhong, and Z.Yingfeng, Polymorphisms in XRCC1 and XPG and response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2009).
- [249] T.Takenaka, T.Yano, C.Kiyohara, N.Miura, H.Kouso, T.Ohba, T.Kometani, F.Shoji, I.Yoshino, and Y.Maehara, Effects of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) single nucleotide polymorphisms on the prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 67 (2010) 101-107.
- [250] C.Tibaldi, E.Giovannetti, E.Vasile, V.Mey, A.C.Laan, S.Nannizzi, M.R.Di, A.Antonuzzo, C.Orlandini, S.Ricciardi, T.M.Del, G.J.Peters, A.Falcone, and R.Danesi, Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 14 (2008) 1797-1803.
- [251] S.Z.Wei, P.Zhan, M.Q.Shi, Y.Shi, Q.Qian, L.K.Yu, and Y.Song, Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Med.Oncol.* 28 (2011) 315-321.
- [252] M.Kim, H.G.Kang, S.Y.Lee, H.C.Lee, E.B.Lee, Y.Y.Choi, W.K.Lee, S.Cho, G.Jin, H.S.Jheon, J.W.Son, M.H.Lee, D.K.Jung, S.I.Cha, C.H.Kim, Y.M.Kang, S.Kam, T.H.Jung, S.Jheon, and J.Y.Park, Comprehensive analysis of DNA repair gene polymorphisms and survival in patients with early stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 101 (2010) 2436-2442.
- [253] A.Kalikaki, M.Kanaki, H.Vassalou, J.Souglakos, A.Voutsina, V.Georgoulas, and D.Mavroudis, DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *Clin.Lung Cancer* 10 (2009) 118-123.
- [254] D.F.Giachino, P.Ghio, S.Regazzoni, G.Mandrile, S.Novello, G.Selvaggi, D.Gregori, M.DeMarchi, and G.V.Scagliotti, Prospective assessment of XPD Lys751Gln and XRCC1 Arg399Gln single nucleotide polymorphisms in lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 13 (2007) 2876-2881.
- [255] E.J.Duell, J.K.Wiencke, T.J.Cheng, A.Varkonyi, Z.F.Zuo, T.D.Ashok, E.J.Mark, J.C.Wain, D.C.Christiani, and K.T.Kelsey, Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 21 (2000) 965-971.
- [256] X.Sun, F.Li, N.Sun, Q.Shukui, C.Baoan, F.Jifeng, C.Lu, L.Zuhong, C.Hongyan, C.Yuandong, J.Jiazhong, and Z.Yingfeng, Polymorphisms in XRCC1 and XPG and response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2009).
- [257] M.A.Watson, R.K.Stewart, G.B.Smith, T.E.Massey, and D.A.Bell, Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19 (1998) 275-280.
- [258] T.Lecomte, B.Landi, P.Beaune, P.Laurent-Puig, and M.A.Loriot, Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin.Cancer Res.* 12 (2006) 3050-3056.
- [259] R.Booton, T.Ward, J.Heighway, L.Ashcroft, J.Morris, and N.Thatcher, Glutathione-S-transferase P1 isoenzyme polymorphisms, platinum-based chemotherapy, and non-small cell lung cancer. *J.Thorac.Oncol.* 1 (2006) 679-683.
- [260] G.J.Riely, J.Marks, and W.Pao, KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 6 (2009) 201-205.
- [261] C.Ferte, B.Besse, E.Dansin, F.Parent, M.P.Buisine, M.C.Copin, N.Penel, and J.C.Soria, Durable responses to Erlotinib despite KRAS mutations in two patients with metastatic lung adenocarcinoma. *Ann.Oncol.* 21 (2010) 1385-1387.
- [262] C.Q.Zhu, S.G.da Cunha, K.Ding, A.Sakurada, J.C.Cutz, N.Liu, T.Zhang, P.Marrano, M.Whitehead, J.A.Squire, S.Kamel-Reid, L.Seymour, F.A.Shepherd, and M.S.Tsao, Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J.Clin.Oncol.* 26 (2008) 4268-4275.

- [263] A.Singh, P.Greninger, D.Rhodes, L.Koopman, S.Violette, N.Bardeesy, and J.Settleman, A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 15 (2009) 489-500.
- [264] J.A.Engelman and L.C.Cantley, The role of the ErbB family members in non-small cell lung cancers sensitive to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin.Cancer Res.* 12 (2006) 4372s-4376s.
- [265] M.J.Ahn, B.B.Park, J.S.Ahn, S.W.Kim, H.T.Kim, J.S.Lee, J.H.Kang, J.Y.Cho, H.S.Song, S.H.Park, C.H.Sohn, S.W.Shin, J.H.Choi, C.S.Ki, C.K.Park, A.J.Holmes, P.A.Janne, and K.Park, Are there any ethnic differences in molecular predictors of erlotinib efficacy in advanced non-small cell lung cancer? *Clin.Cancer Res.* 14 (2008) 3860-3866.
- [266] D.W.Bell, T.J.Lynch, S.M.Haserlat, P.L.Harris, R.A.Okimoto, B.W.Brannigan, D.C.Sgroi, B.Muir, M.J.Riemenschneider, R.B.Iacona, A.D.Krebs, D.H.Johnson, G.Giaccone, R.S.Herbst, C.Manegold, M.Fukuoka, M.G.Kris, J.Baselga, J.S.Ochs, and D.A.Haber, Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 8081-8092.
- [267] K.Endo, H.Sasaki, M.Yano, Y.Kobayashi, H.Yukiue, H.Haneda, E.Suzuki, O.Kawano, and Y.Fujii, Evaluation of the epidermal growth factor receptor gene mutation and copy number in non-small cell lung cancer with gefitinib therapy. *Oncol.Rep.* 16 (2006) 533-541.
- [268] Y.Yatabe, T.Takahashi, and T.Mitsudomi, Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Res.* 68 (2008) 2106-2111.
- [269] V.Rusch, D.Klimstra, E.Venkatraman, P.W.Pisters, J.Langenfeld, and E.Dmitrovsky, Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin.Cancer Res.* 3 (1997) 515-522.
- [270] G.Fontanini, M.De Laurentiis, S.Vignati, S.Chine, M.Lucchi, V.Silvestri, A.Mussi, P.S.De, G.Tortora, A.R.Bianco, W.Gullick, C.A.Angeletti, G.Bevilacqua, and F.Ciardiello, Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-III non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin.Cancer Res.* 4 (1998) 241-249.
- [271] M.G.Kris, R.B.Natale, R.S.Herbst, T.J.Lynch, Jr., D.Prager, C.P.Belani, J.H.Schiller, K.Kelly, H.Spiridonidis, A.Sandler, K.S.Albain, D.Cella, M.K.Wolf, S.D.Averbuch, J.J.Ochs, and A.C.Kay, Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 290 (2003) 2149-2158.
- [272] G.Giaccone, R.S.Herbst, C.Manegold, G.Scagliotti, R.Rosell, V.Miller, R.B.Natale, J.H.Schiller, P.J.Von, A.Pluzanska, U.Gatzemeier, J.Grous, J.S.Ochs, S.D.Averbuch, M.K.Wolf, P.Rennie, A.Fandi, and D.H.Johnson, Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J.Clin.Oncol.* 22 (2004) 777-784.
- [273] R.S.Herbst, G.Giaccone, J.H.Schiller, R.B.Natale, V.Miller, C.Manegold, G.Scagliotti, R.Rosell, I.Oliff, J.A.Reeves, M.K.Wolf, A.D.Krebs, S.D.Averbuch, J.S.Ochs, J.Grous, A.Fandi, and D.H.Johnson, Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J.Clin.Oncol.* 22 (2004) 785-794.
- [274] M.Fukuoka, S.Yano, G.Giaccone, T.Tamura, K.Nakagawa, J.Y.Douillard, Y.Nishiwaki, J.Vansteenkiste, S.Kudoh, D.Rischin, R.Eek, T.Horai, K.Noda, I.Takata, E.Smit, S.Averbuch, A.Macleod, A.Feyereislova, R.P.Dong, and J.Baselga, Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J.Clin.Oncol.* 21 (2003) 2237-2246.
- [275] C.Gridelli, A.Rossi, P.Maione, C.Ferrara, G.F.Del, C.Guerriero, D.Nicolella, G.Palazzolo, M.Falanga, and G.Colantuoni, New insights in drug development for the non-small cell lung cancer therapy. *Front Biosci.* 13 (2008) 5108-5119.
- [276] N.Normanno, C.Bianco, L.A.De, M.R.Maiello, and D.S.Salomon, Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr.Relat Cancer* 10 (2003) 1-21.
- [277] F.R.Hirsch, M.Varella-Garcia, W.A.Franklin, R.Veve, L.Chen, B.Helfrich, C.Zeng, A.Baron, and P.A.Bunn, Jr., Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br.J.Cancer* 86 (2002) 1449-1456.
- [278] E.Tzahar, H.Waterman, X.Chen, G.Levkowitz, D.Karunakaran, S.Lavi, B.J.Ratzkin, and Y.Yarden, A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol.Cell Biol.* 16 (1996) 5276-5287.
- [279] N.V.Sergina, M.Rausch, D.Wang, J.Blair, B.Hann, K.M.Shokat, and M.M.Moasser, Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445 (2007) 437-441.
- [280] J.A.Engelman, P.A.Janne, C.Mermel, J.Pearlberg, T.Mukohara, C.Fleet, K.Cichowski, B.E.Johnson, and L.C.Cantley, ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102 (2005) 3788-3793.
- [281] E.T.Hsieh, F.A.Shepherd, and M.S.Tsao, Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha is independent of ras mutations in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 29 (2000) 151-157.
- [282] V.Gorgoulis, D.Aninos, P.Mikou, P.Kanavaros, A.Karameris, J.Joordanoglou, A.Rasidakis, M.Veslemes, B.Ozanne, and D.A.Spandidos, Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res.* 12 (1992) 1183-1187.

- [283] C.L.Hinkle, S.W.Sunnarborg, D.Loiselle, C.E.Parker, M.Stevenson, W.E.Russell, and D.C.Lee, Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J.Biol.Chem.* 279 (2004) 24179-24188.
- [284] N.Normanno, C.Bianco, L.A.De, and D.S.Salomon, The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci.* 6 (2001) D685-D707.
- [285] C.L.Addison, K.Ding, H.Zhao, M.A.Le, G.D.Goss, L.Seymour, M.S.Tsao, F.A.Shepherd, and P.A.Bradbury, Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21. *J.Clin.Oncol.* 28 (2010) 5247-5256.
- [286] M.H.Chang, H.K.Ahn, J.Lee, C.K.Jung, Y.L.Choi, Y.H.Park, J.S.Ahn, K.Park, and M.J.Ahn, Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* 117 (2011) 143-151.
- [287] J.M.Smith, M.B.Sporn, A.B.Roberts, R.Derynck, M.E.Winkler, and H.Gregory, Human transforming growth factor-alpha causes precocious eyelid opening in newborn mice. *Nature* 315 (1985) 515-516.
- [288] A.R.French, D.K.Tadaki, S.K.Niyogi, and D.A.Lauffenburger, Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J.Biol.Chem.* 270 (1995) 4334-4340.
- [289] H.Waterman, I.Sabanai, B.Geiger, and Y.Yarden, Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 13819-13827.
- [290] A.Hurbin, L.Dubrez, J.L.Coll, and M.C.Favrot, Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1010 (2003) 354-357.
- [291] S.Khambata-Ford, C.R.Garrett, N.J.Meropol, M.Basik, C.T.Harblson, S.Wu, T.W.Wong, X.Huang, C.H.Takimoto, A.K.Godwin, B.R.Tan, S.S.Krishnamurthi, H.A.Burris, III, E.A.Poplin, M.Hidalgo, J.Baselga, E.A.Clark, and D.J.Mauro, Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin.Oncol.* 25 (2007) 3230-3237.
- [292] K.Kim, H.Lee, D.W.Threadgill, and D.Lee, Epiregulin-dependent amphiregulin expression and ERBB2 signaling are involved in luteinizing hormone-induced paracrine signaling pathways in mouse ovary. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 405 (2011) 319-324.
- [293] J.Zhang, K.Iwanaga, K.C.Choi, M.Wislez, M.G.Raso, W.Weil, I.I.Wistuba, and J.M.Kurie, Intratumoral epiregulin is a marker of advanced disease in non-small cell lung cancer patients and confers invasive properties on EGFR-mutant cells. *Cancer Prev.Res.(Phila)* 1 (2008) 201-207.
- [294] T.Mukohara, S.Kudoh, S.Yamauchi, T.Kimura, N.Yoshimura, H.Kanazawa, K.Hirata, H.Wanibuchi, S.Fukushima, K.Inoue, and J.Yoshikawa, Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 41 (2003) 123-130.
- [295] F.Cappuzzo, E.Magrini, G.L.Ceresoli, S.Bartolini, E.Rossi, V.Ludovini, V.Gregorc, C.Ligorio, A.Cancellieri, S.Damiani, A.Spreafico, C.T.Paties, L.Lombardo, C.Calandri, G.Bellezza, M.Tonato, and L.Crino, Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 96 (2004) 1133-1141.
- [296] B.R.Balsara, J.Pei, Y.Mitsuuchi, R.Page, A.Klein-Szanto, H.Wang, M.Unger, and J.R.Testa, Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. *Carcinogenesis* 25 (2004) 2053-2059.
- [297] S.Suzuki, S.Igarashi, M.Hanawa, H.Matsubara, A.Ooi, and Y.Dobashi, Diversity of epidermal growth factor receptor-mediated activation of downstream molecules in human lung carcinomas. *Mod.Pathol.* 19 (2006) 986-998.
- [298] F.Morgillo, J.K.Woo, E.S.Kim, W.K.Hong, and H.Y.Lee, Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res.* 66 (2006) 10100-10111.
- [299] P.Nagy, D.J.rndt-Jovin, and T.M.Jovin, Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells. *Exp.Cell Res.* 285 (2003) 39-49.
- [300] Z.Weihua, R.Tsan, W.C.Huang, Q.Wu, C.H.Chiu, I.J.Fidler, and M.C.Hung, Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* 13 (2008) 385-393.
- [301] P.J.Miettinen, J.E.Berger, J.Meneses, Y.Phung, R.A.Pedersen, Z.Werb, and R.Derynck, Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376 (1995) 337-341.
- [302] N.C.Luetteke, H.K.Phillips, T.H.Qiu, N.G.Copeland, H.S.Earp, N.A.Jenkins, and D.C.Lee, The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev.* 8 (1994) 399-413.
- [303] K.J.Coker, J.V.Staros, and C.A.Guyer, A kinase-negative epidermal growth factor receptor that retains the capacity to stimulate DNA synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (1994) 6967-6971.
- [304] J.A.Ewald, J.C.Wilkinson, C.A.Guyer, and J.V.Staros, Ligand- and kinase activity-independent cell survival mediated by the epidermal growth factor receptor expressed in 32D cells. *Exp.Cell Res.* 282 (2003) 121-131.
- [305] P.M.Harari and S.M.Huang, Combining EGFR inhibitors with radiation or chemotherapy: will preclinical studies predict clinical results? *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 58 (2004) 976-983.

- [306] S.Xi, Q.Zhang, K.F.Dyer, E.C.Lerner, T.E.Smithgall, W.E.Gooding, J.Kamens, and J.R.Grandis, Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J.Biol.Chem.* 278 (2003) 31574-31583.
- [307] D.LeRoith, H.Werner, D.Beitner-Johnson, and C.T.Roberts, Jr., Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr.Rev.* 16 (1995) 143-163.
- [308] C.K.Goldman, J.Kim, W.L.Wong, V.King, T.Brock, and G.Y.Gillespie, Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol.Biol.Cell* 4 (1993) 121-133.
- [309] A.Maity, N.Pore, J.Lee, D.Solomon, and D.M.O'Rourke, Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res.* 60 (2000) 5879-5886.
- [310] A.M.Petit, J.Rak, M.C.Hung, P.Rockwell, N.Goldstein, B.Fendly, and R.S.Kerbel, Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am.J.Pathol.* 151 (1997) 1523-1530.
- [311] F.Ciardello, Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* 60 Suppl 1 (2000) 25-32.
- [312] F.Ciardello, R.Caputo, R.Bianco, V.Damiano, G.Fontanini, S.Cuccato, P.S.De, A.R.Bianco, and G.Tortora, Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin.Cancer Res.* 7 (2001) 1459-1465.
- [313] S.M.Huang, J.Li, E.A.Armstrong, and P.M.Harari, Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res.* 62 (2002) 4300-4306.
- [314] A.J.Ryan and S.R.Wedge, ZD6474--a novel inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity. *Br.J.Cancer* 92 Suppl 1 (2005) S6-13.
- [315] A.Sandler and R.Herbst, Combining targeted agents: blocking the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways. *Clin.Cancer Res.* 12 (2006) 4421s-4425s.
- [316] V.L.Keedy and A.B.Sandler, Inhibition of angiogenesis in the treatment of non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 98 (2007) 1825-1830.
- [317] Y.D.Jung, P.F.Mansfield, M.Akagi, A.Takeda, W.Liu, C.D.Bucana, D.J.Hicklin, and L.M.Ellis, Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *Eur.J Cancer* 38 (2002) 1133-1140.
- [318] G.N.Naumov, M.B.Nilsson, T.Cascone, A.Briggs, O.Straume, L.A.Akslen, E.Lifshits, L.A.Byers, L.Xu, H.K.Wu, P.Janne, S.Kobayashi, B.Halmos, D.Tenen, X.M.Tang, J.Engelman, B.Yeap, J.Folkman, B.E.Johnson, and J.V.Heymach, Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance. *Clin.Cancer Res.* 15 (2009) 3484-3494.
- [319] Avastin, EMEA, Scientific discussion. (2005).
- [320] D.E.Swinson and K.J.O'Byrne, Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Clin.Lung Cancer* 7 (2006) 250-256.
- [321] C.G.Willett, Y.Boucher, D.G.Duda, T.E.di, L.L.Munn, R.T.Tong, S.V.Kozin, L.Petit, R.K.Jain, D.C.Chung, D.V.Sahani, S.P.Kalva, K.S.Cohen, D.T.Scadden, A.J.Fischman, J.W.Clark, D.P.Ryan, A.X.Zhu, L.S.Blaszkowsky, P.C.Shellito, M.Mino-Kenudson, and G.Y.Lauwers, Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 8136-8139.
- [322] J.A.Nagy, S.H.Chang, S.C.Shih, A.M.Dvorak, and H.F.Dvorak, Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin.Thromb.Hemost.* 36 (2010) 321-331.
- [323] J.M.Brown, The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 59 (1999) 5863-5870.
- [324] R.K.Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307 (2005) 58-62.
- [325] D.Shweiki, A.Itin, D.Soffer, and E.Keshet, Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359 (1992) 843-845.
- [326] B.J.Moeller, R.A.Richardson, and M.W.Dewhirst, Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 241-248.
- [327] R.H.Wenger, Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 16 (2002) 1151-1162.
- [328] D.Vordermark and J.M.Brown, Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther.Onkol.* 179 (2003) 801-811.

7. ANHANG

7.1 Antikörper

Antikörper	Bestellnr.	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
ACTB	A5441	Sigma-Aldrich	WB	1:10000
ABCG2	801-029-C125	Alexis	WB	1:250
AKT	4691	CS	WB	1:1000
AREG	ab48191	Abcam	WB, IF	1:630
E-Cadherin	3195	CS	WB, IHC	1:1000
EGF	MAB636	R&D Systems	ELISA, Capture	1:125
EGF	sc-275	Santa Cruz	IF	1:50
			WB	1:100
			ELISA, Detektion	1:200
EGFR	sc-03	Santa Cruz	IF	1:50
			WB	1:150
EGFR	2232	CS	WB	1:1000
EPCAM	804-330-C100	Alexis Biochemicals	IHC	1:200
ERBB2	2165	CS	WB	1:1000
ERBB3	4754	CS	WB	1:1000
ERBB4	ab32375	Abcam	WB	1:4000
ERCC1	556452	BD	WB	1:1000
Fibronektin	610077	BD	WB	1:20000 / 5% Magermilch
γ-Catenin	2309	CS	WB	1:1000 / 5% BSA
IGFR	3027	CS	WB	1:1000
Ki67	M7240	Dako	IHC	1:50
LRP	610512	BD	WB	1:1000
MAPK1/3	610030	BD	WB	1:5000
MDR1	557001	BD	FACS	1µg/1*10 ⁶ Zellen
MRP1	557594	BD	FACS	1µg/1*10 ⁶ Zellen
MTOR	2983	CS	WB	1:1000 / 5% BSA
N-Cadherin	910920	BD	WB	1:5000
phospho Akt	9271	CS	WB	1:1000
phospho MAPK1/3	612358	BD	WB	1:1000
phospho STAT1	612232	BD	WB	1:1000
phospho STAT3	9145	CS	WB	1:1000
Phospho-MTOR	2971	CS	WB	1:1000 / 5% BSA
Snail	3895		WB	1:1000 / 5% Magermilch
STAT1	610115	BD	WB	1:250
STAT3	9132	CS	WB	1:1000
TGFA	GF10	Calbiochem	WB, IF	1:100
Vimentin	550513	BD	WB	1:1000
Cy2-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	111-225-144	Dianova		1:800
Cy3-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	111-165-114	Dianova		1:800
Cy3-conjugated Streptavidin	016-160-084	Dianova		1:800

HRP-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	111-035-003	Dianova	1:10000
HRP-conjugated Rabbit anti-Mouse IgG (H+L)	315-035-003	Dianova	1:20000

7.2 Primer

Gen	Primer
ABCB1	Hs 00184497_m1
ABCC1	Hs 00219905_m1
ABCG2	Hs 00184979_m1
ACTB	Hs 99999903_m1
AREG	Hs 00155832_m1
EGF	Hs 00153181_m1
EGFR	Hs 00193306_m1
ERBB2	Hs01001582_m1
ERBB3	Hs00951455_m1
ERBB4	Hs00171783_m1
EREG	Hs 00154995_m1
LRP	Hs 00233899_m1
TGFA	Hs 00177401_m1
VEGFA	Hs 00900057_m1

7.3 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
BioPhotometer	Eppendorf
Electrophoresis power supply, Consort EV265	Sigma-Aldrich
Elektrophoresegerät Minigel-Twin G42	Biometra
FACS Calibur	BectonDickinson
GeneAmp PCR-System 9700	Applied Biosystems
Horizon 58 Gelelektrophoresekammer	GibcoBRL
Kryomikrotom CM1900	Leica
Microplaterreader Infinite M200	Tecan Group Ltd.,
Mikroskop Zeiss Axioskop 40	Zeiss
NanoDrop	Thermo Scientific
Power Pack P25	Biometra
PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad
Präzisionswaage	Sartorius
PyroMark Q96 ID	Biotage
PyroMark Q96 Vacuum Prep Workstation	Biotage
Schüttler DRS-12	Neo-Lab
Schüttler Polymax1040	Heidolph
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems
TissueLyser II	Qiagen
Trans-Blot SD	Bio-Rad
Ultrazentrifuge Optima TC	Beckmann Coulter
Vortexer	Snijders
Zentrifuge 5403	Eppendorf

7.4 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
0,5 M Tris-HCL Buffer, pH 6,8	Bio-Rad
1,5 M Tris-HCL Buffer, pH 8,8	Bio-Rad
2-Mercaptoethanol	Roth
Acrylamide/Bis solution, 30%, 29:1	Bio-Rad
Ammoniaklösung, 25%	Roth
Ammoniumpersulfat	Roth
Animal Research Kit	Dako
Bovines Serum-Albumin	Sigma Aldrich
Cell lysis buffer (10x)	Cell Signaling
DAB-Chromogen + Puffer	Dako
Dako Pen	Dako
DAPI	Roth
ECL plus western blotting detection system	GE Healthcare
EDTA	Boehringer
EGF	RELIATech
Entwickler	Fujifilm
Eosin G Lösung	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Serva
Fetales Kälberserum	Biochrome
Fixierer	Fujifilm
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Hämatoxylin	Dako
Kaliumchlorid	Laborchemie
Laemmlis Ladepuffer	Bio-Rad
Magermilchpulver	Saliter
Methanol	Roth
MgCl	Applied Biosystems
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumdesoxycholate	Merck
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich
OPD Tabletten	Dako
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PCR-Puffer	Applied Biosystems
Peroxidase Block	Dako
Peroxidase Substrate Kit AEC	Vector Laboratories
Phosphatase Inhibitor cocktail 1	Sigma Aldrich
Phosphatase Inhibitor cocktail 2	Sigma Aldrich
Phosphate buffered saline (10x)	Invitrogen
Ponceau S	Sigma Aldrich
Protease inhibitor cocktail	Sigma Aldrich
Protein Assay Farbstoffkonzentrat (5x)	Bio-Rad
Protein Standard, BSA, 2mg/ml	Sigma Aldrich
Re-blot plus	Millipore
Rnase free DNase Set	Qiagen
RNeasy mini kit	Qiagen

Salzsäure	Roth
Streptavidin Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
TaqMan reverse transcription reagents	Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Master Mix, NoAmpErase	Applied Biosystems
Tetramethylethylenediamine	Bio-Rad
Tissue-Tek	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Tris-EDTA Puffer	Sigma Aldrich
Triton X-100	Serva
Tween-20	Roth
VectaMount AQ	Vector Laboratories
Xylol	Roth
Ziegen Serum	Dianova

7.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bench Mark pre-stained protein Standard	Invitrogen
Cuvettes UVette®	Eppendorf
Deckgläser, 25x60mm	Menzel
Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad
HiMark Pre-Stained Protein Standard	Invitrogen
Hyperfilm ECL	GE Healthcare
MicroAmp® 8 cap-strips	Applied Biosystems
MicroAmp® fast optical 96-well reaction plates	Applied Biosystems
MicroAmp® optical adhesive films	Applied Biosystems
MicroAmp® reaction tubes	Applied Biosystems
Nitrocellulosemembran Trans Blot	Bio-Rad
Nunc-Immuno Plates, Maxi-Sorp, F96	Nunc
Objektträger SuperFrost	Menzel
QIAshredder	Qiagen
Reaktionsgefäße; 1,5ml, 2ml	Josef Peske
Serologische Pipetten	Greiner
Zentrifugenröhrchen 15ml	BD
Zentrifugenröhrchen 50ml	BD

7.6 Datentabellen

LuCa	Carboplatin	Paclitaxel	Gemcitabin	Etoposid	Erlotinib	Cetuximab	Bevacizumab
7064	72	26	56	34	27	17	57
7126	91	84	12	64	33	19	21
7166	23	70	44	29	77	75	n.a.
7177	35	44	2	60	28	52	28
7187	31	33	8	74	78	27	17
7198	42	42	36	68	61	67	55
7298	38	25	31	42	54	43	76
7336	48	6	31	75	67	62	67
7343	13	33	8	75	57	86	30
7387	46	7	17	62	62	67	87
7406	35	19	15	39	68	74	38
7414	30	15	14	42	41	34	n.a.
7433	17	5	65	99	100	97	54
7462	39	13	0	65	31	0	58
7466	148	1	3	104	26	2	49
7506	2	15	47	61	95	41	n.a.
7530	26	6	tox	3	50	31	n.a.
7558	5	76	11	76	79	45	40
7612	4	7	51	76	94	72	12
7668	8	1	tox	49	71	1	n.a.
7700	42	28	3	59	109	67	62
7747	30	26	91	92	76	50	38
7766	9	21	40	73	66	25	79
7860	86	13	29	57	63	46	38
7913	40	11	46	63	59	9	68

Sensitivität der Xenograftmodelle, T/C-Wert [%], n.a.-keine Daten vorhanden

LuCa	Anteil tumorigener Zellen [%] im	
	Patiententumor	Xenografttumor
7064	25	70
7126	15	85
7166	0	95
7177	10	90
7187	60	85
7198	55	75
7298	60	85
7336	45	65
7343	40	90
7387	55	85
7406	25	85
7414	20	85
7433	30	80
7462	40	90
7466	40	90
7506	75	95
7530	80	95
7558	20	75
7612	85	85
7668	75	95
7700	85	95
7747	30	95
7766	75	85
7860	20	80
7913	5	75

Tumorigener Anteil im Präparat

LuCa	Polymorphismen									Mutationen		
	EGFR	TP53	MDM2	ERCC1	ERCC2	ERCC5	XRCC1	XRCC3	GSTP1	KRAS12	KRAS13	KRAS61
7064	A/A	G/G	T/T	G/A	A/A	G/G	G/G	T/T	A/A	G/G	G/G	T/T
7126	G/G	G/C	T/T	G/A	A/A	G/G	G/A	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7166	G/A	G/G	T/T	G/A	A/A	G/G	G/G	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7177	G/G	G/G	T/G	G/A	A/A	G/C	G/G	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7187	A/A	G/G	T/T	A/A	A/A	G/C	G/A	T/C	A/A	G/T	G/G	T/T
7198	A/A	G/G	T/T	G/A	C/C	G/G	G/G	T/T	G/G	T/T	G/G	T/T
7298	A/A	G/G	T/T	A/A	n.a.	G/G	G/G	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7336	G/G	G/G	T/G	G/A	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7343	G/A	G/C	G/G	G/A	A/C	G/G	G/A	T/T	A/A	G/G	G/G	T/T
7387	G/A	G/G	T/G	G/G	A/A	G/G	G/G	T/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7406	A/A	G/G	T/T	G/G	C/C	C/C	G/A	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7414	G/A	G/G	T/G	A/A	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	G/G	G/G	T/T
7433	A/A	C/C	T/G	A/A	A/A	G/G	G/G	T/C	A/G	G/G	G/G	T/T
7462	A/A	C/C	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	A/A	T/T	G/G	T/T
7466	G/A	C/C	T/G	A/A	A/A	G/G	G/G	T/C	A/G	G/T	G/G	T/T
7506	A/A	G/G	T/G	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C	A/G	G/G	G/G	T/T
7530	A/A	C/C	T/T	A/A	A/A	G/G	G/G	C/C	A/G	G/G	G/G	T/T
7558	A/A	G/G	T/T	G/A	A/C	C/C	G/A	C/C	A/G	G/G	G/G	T/T
7612	A/A	G/G	T/T	A/A	C/C	G/G	G/G	T/C	G/G	G/G	G/G	T/T
7668	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A	G/G	G/G	T/C	A/A	A/A	G/G	T/T
7700	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	A/A	G/T	G/T	T/T
7747	G/G	G/G	T/G	A/A	A/A	G/G	G/G	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7766	G/A	G/G	T/T	G/A	A/A	G/G	G/G	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7860	G/A	G/G	T/T	G/A	A/C	G/G	G/A	C/C	A/A	G/G	G/G	T/T
7913	G/A	G/G	T/T	G/A	A/C	G/G	G/A	C/C	G/G	G/G	G/G	T/T
V1	G/G	G/G	T/T	G/G	A/A	G/G	G/G	T/T	A/A			
V2	G/A	G/C	T/G	G/A	A/C	G/C	G/A	T/C	A/G			
V3	A/A	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C	A/A	C/C	G/G			

SNP- und Mutationsanalysen

LuCa	MDR		MRP1 mRNA		ABCG2		LRP	
	mRNA- Expression ΔC_T	positive Zellen [%]	mRNA- Expression ΔC_T	positive Zellen [%]	mRNA- Expression ΔC_T	mRNA- Expression ΔC_T	mRNA- Expression ΔC_T	
7064	17,54	15,4	7,10	13,8	12,19	8,01		
7126	18,18	15,3	3,45	18,2	4,17	5,04		
7166	0,00	13,7	7,16	13,8	15,46	6,45		
7177	16,97	14,5	2,02	29,5	10,42	5,33		
7187	0,00	15,4	7,55	18,3	8,13	6,90		
7198	21,24	27,2	6,25	20,9	10,13	6,18		
7298	17,19	14,4	6,33	13,1	15,03	5,79		
7336	0,00	13,3	7,02	13,6	8,08	6,68		
7343	0,00	20,8	5,23	24,1	8,34	5,85		
7387	10,90	15,4	7,57	29,9	6,15	7,64		
7406	14,97	29,4	8,10	22,4	14,87	7,61		
7414	0,00	17,9	6,21	15,6	7,13	5,69		
7433	17,20	18,8	3,73	22,1	6,99	5,68		
7462	9,36	39,8	7,78	31,3	7,65	5,24		
7466	22,43	15,5	8,65	18,6	8,62	7,56		
7506	15,94	65,8	6,98	19,0	10,96	7,07		
7530	14,35	14,0	6,17	n.a.	13,50	5,64		
7558	18,64	20,1	8,01	16,1	14,27	8,24		
7612	16,98	24,0	6,38	25,3	15,90	6,26		
7668	13,42	17,7	6,04	15,5	11,09	5,89		
7700	17,32	17,2	6,17	24,8	7,55	6,12		
7747	18,29	18,1	7,96	13,9	15,81	6,01		
7766	17,88	62,0	6,26	15,0	15,19	4,82		
7860	16,41	33,1	4,14	18,0	6,72	5,18		
7913	18,47	20,6	5,47	22,4	11,16	4,96		
MT3/ADR	3,50							
A549			5,54			9,97		
MDA/ABCG2					2,52			

Expression resistenzassoziierter Marker

LuCa	EGFR		ERBB2		ERBB3		ERBB4		
	Kopienanzahl	mRNA-Expression ΔC_T	Protein-konzentration [pg/ μg_{GP}]	mRNA-Expression ΔC_T	Protein Signalintensität	mRNA-Expression ΔC_T	Protein Signalintensität	mRNA-Expression ΔC_T	Protein Signalintensität
7064	4,42	3,66	19,15	4,39	0,15	4,65	0,74	14,82	0
7126	4,56	4,89	7,88	6,36	0	6,11	0	0	0
7166	2,89	10,07	1,34	5,01	0,11	4,79	0	8,14	0,09
7177	2,22	3,93	8,66	4,62	0	2,51	0,06	18,31	0
7187	3,47	5,62	4,09	2,74	0,37	1,32	0	9,59	0
7198	4,16	4,49	9,47	6,98	0	6,69	0	0	0
7298	3,83	4,78	10,96	4,79	0,38	4,76	0,07	17,84	0
7336	5,15	6,01	6,42	4,87	0,28	3,08	0,12	0	0
7343	1,97	4,66	4,89	5,63	0	6,01	0,82	15,01	0
7387	3,26	4,86	10,95	5,36	0,17	4,09	0,18	20,29	0
7406	5,66	5,31	10,89	6,44	0	6,46	0	16,63	0
7414	2,78	5,43	3,56	3,67	0,25	1,76	0	13,39	0
7433	3,73	4,36	13,16	5,77	0	6,37	0	11,14	0
7462	2,67	4,03	14,60	3,99	0,51	3,62	0	12,55	0
7466	8,62	4,41	20,28	5,26	0,39	5,82	0	15,91	0
7506	4,57	3,61	28,27	7,75	0	6,21	0	0	0
7530	6,97	13,43	1,33	12,67	0	16,15	0,41	12,8	0
7558	3,91	3,52	21,66	5,89	0,09	5,84	0,18	9,06	0
7612	3,68	3,96	26,30	7,44	0,14	5,52	0,13	17,99	0
7668	8,89	4,74	14,98	10,62	0	11,15	0	13,98	0
7700	2,34	4,52	10,77	5,43	0,34	7,10	0	16,38	0
7747	1,91	4,72	22,70	7,06	0,07	6,51	0,26	0	0
7766	6,26	2,34	34,07	4,71	0,04	4,76	0	14,68	0
7860	n.a.	4,89	13,63	4,79	0,45	5,95	1,03	18,46	0
7913	3,28	4,32	18,30	5,82	0,77	5,73	4,56	17,57	0
A431		-0,88	1351,00						

Expression der ERBB-Proteinfamilie, n.a.-keine Daten vorhanden

LuCa	EGF		TGFA		AREG		EREG	
	mRNA- Expression ΔC_T	Protein- konzentration [pg/mg _{Gp}]	mRNA- Expression ΔC_T	Protein- konzentration [pg/mg _{Gp}]	mRNA- Expression ΔC_T	Protein- konzentration [pg/mg _{Gp}]	mRNA- Expression ΔC_T	Protein- konzentration [pg/mg _{Gp}]
7064	14,12	6,44	8,20	21,50	10,90	320,9	10,65	137,72
7126	12,47	6,56	6,79	22,98	8,89	735,9	11,96	16,74
7166	14,62	8,19	7,06	13,77	10,66	104,9		6,01
7177	10,46	9,44	8,29	7,30	7,79	222,9	13,95	12,39
7187	8,707	196,30	7,64	8,14	10,89	109,4	13,57	13,02
7198	12,76	10,06	10,45	5,92	11,52	109,2	17,90	14,22
7298	12,47	6,94	7,02	37,20	7,70	692,4	15,71	28,25
7336	11,17	28,38	8,69	6,28	9,24	147,1	10,40	15,33
7343	9,663	17,69	6,23	9,15	11,63	41,7	12,63	7,45
7387	9,323	108,10	9,18	12,80	5,18	3803,0	12,10	44,49
7406	15,33	4,59	9,05	17,82	8,36	718,7	6,117	88,65
7414	9,510	27,94	8,20	11,12	6,76	412,0	9,743	20,24
7433	10,35	36,63	6,90	16,20	10,98	67,20	16,42	44,57
7462	10,13	52,06	14,87	2,64	6,63	486,9	5,353	19,44
7466	20,12	5,13	8,67	10,16	8,65	512,1	9,183	20,57
7506	14,44	21,75	6,97	18,89	7,91	209,5	7,673	31,45
7530	18,47	4,08	14,77	1,00	17,14	10,16	16,52	28,84
7558	15,20	3,44	6,59	18,31	6,15	530,3	6,587	27,03
7612	10,70	8,63	7,70	8,52	11,46	86,31	15,20	38,27
7668	14,70	4,83	8,54	6,17	10,56	121,4	5,017	31,78
7700	12,01	22,36	6,65	21,51	5,25	3632,0	4,767	62,34
7747	14,79	3,33	7,59	30,88	11,23	110,8	10,97	18,16
7766	9,183	19,50	7,01	9,238	11,34	37,5		26,49
7860	12,64	8,44	7,25	18,35	9,92	176,2	14,31	27,23
7913	13,85	10,75	6,48	51,75	10,77	96,1	8,71	13,98

Expression der EGFR-Liganden

LuCa	VEGFA mRNA- Expression ΔC_T	Protein- konzentration [pg/ μg_{Gp}]
7064	7,20	0,37
7126	3,73	0,10
7166	4,11	1,70
7177	3,13	0,81
7187	1,22	1,53
7198	2,74	0,37
7298	3,68	0,52
7336	5,56	0,30
7343	3,80	0,32
7387	5,37	0,40
7406	4,04	1,82
7414	1,29	0,66
7433	3,56	1,00
7462	3,19	0,56
7466	3,18	1,16
7506	2,57	0,46
7530	7,63	1,83
7558	4,23	0,15
7612	4,23	0,37
7668	2,64	0,41
7700	3,61	0,58
7747	4,96	1,70
7766	4,80	0,56
7860	2,92	0,40
7913	4,77	0,83

LuCa	7064	7126	7462	7466	7700	7860
VEGFA mRNA - ΔC_T						
Ktr	4,74	4,04	2,97	5,53	4,75	5,19
ERL	6,24	4,12	3,76	4,72	4,98	5,03
BEV	5,70	3,57	2,56	3,64	3,6	2,99
ERL + BEV	5,62	3,02	3,05	3,76	3,27	1,56
VEGFA Protein						
Ktr	7,37	0,37	0,38	0,73	1,09	0,51
ERL	7,02	0,41	0,27	0,59	0,84	0,47
BEV	5,39	0,5	0,21	0,41	0,27	0,36
ERL + BEV	4,21	0,38	0,21	0,22	0,36	0,41
CD31						
Ktr	16,11	19,11	19,22	24	18,11	14
ERL	13,78	15,56	15,44	31,56	11,89	9,89
BEV	3,44	5,22	7	8,89	8,89	4,67
ERL + BEV	0,99	2,99	7,67	7	6,44	2,33
CA9 mRNA - ΔC_T						
Ktr	4,7	1,89	14,77	6,65	3,89	3,86
ERL	6,2	2,21	15,17	5,71	3,34	5,17
BEV	5,58	2,31	14,46	3,71	2,49	4,25
ERL + BEV	5,73	1,66	14,75	5,29	2,34	n.d.
HIF1A mRNA - ΔC_T						
Ktr	2,76	1,94	3,54	3,13	2,38	1,55
ERL	3,07	1,62	3,02	2,57	1,87	1,19
BEV	3,82	1,59	3,84	2,37	1,97	1,72
ERL + BEV	3,65	0,94	3,34	2,41	1,97	n.d.

Daten der (anti-)Angiogenese assoziierten Analysen, n.d. - nicht nachweisbar

PUBLIKATIONEN

Chemoresistance in non-small-cell lung cancer: can multidrug resistance markers predict the response of xenograft lung cancer models to chemotherapy?;

Merk J, Rolff J, Dorn C, Leschber G, Fichtner I.;
Eur J Cardiothorac Surg. 2011 Jul;40(1):e29-33.

Comparative profiling of the novel epothilone, sagopilone, in xenografts derived from primary non-small cell lung cancer.;

Hammer S, Sommer A, Fichtner I, Becker M, Rolff J, Merk J, Klar U, Hoffmann J.;
Clin Cancer Res. 2010 Mar 1;16(5):1452-65.

Response of Patient-Derived Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts to Classical and Targeted Therapies Is Not Related to Multidrug Resistance Markers.;

Rolff J, Dorn C, Merk J, Fichtner I.;
J Oncol. 2009;2009:814140.

Patient-derived xenografts of non-small-cell lung cancer: a pre-clinical model to evaluate adjuvant chemotherapy?;

Merk J, Rolff J, Becker M, Leschber G, Fichtner I.;
Eur J Cardiothorac Surg. 2009 Sep;36(3):454-9.

Radiosensitisation of U87MG brain tumours by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies.;

Diaz Miqueli A, Rolff J, Lemm M, Fichtner I, Perez R, Montero E.;
Br J Cancer. 2009 Mar 24;100(6):950-8.

Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers.;

Fichtner I, Rolff J, Soong R, Hoffmann J, Hammer S, Sommer A, Becker M, Merk J.;
Clin Cancer Res. 2008 Oct 15;14(20):6456-68.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich während meiner Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ich möchte mich besonders bei Frau Dr. Iduna Fichtner bedanken. Vielen Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftlichen Hilfestellungen und vor allem die unermüdliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit. Sie ermöglichte mir meine Daten bei verschiedenen Gelegenheiten zu präsentieren und meine eigenen Ideen zu entwickeln.

Prof. Dr. Wolfgang Uckert danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung und für die Begutachtung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Stefan Fröhling möchte ich für die Erstellung des Gutachtens danken. Ebenso danke ich Dr. Johannes Merk für die angenehme und gute Kooperation.

Der Firma epo GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion sowie Dr. Christian Nowak und Dr. Jens Hoffmann für die Ratschläge, die sie mir mit auf den Weg gaben.

Danke an Dr. Michael Becker, der immer ein offenes Ohr für eine Diskussion oder sonstige Probleme hatte. Zudem danke ich Maria, Friedrich und Christian für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit. Außerdem möchte ich Diana für die Umsetzung der zahlreichen Ideen danken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe für die stets sehr angenehme Arbeitsumgebung, für die (nicht nur wissenschaftlichen) Gespräche, die Unterstützung bei technischen Fragen sowie die netten Unternehmungen.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Promotionsverfahren vorgelegt.

Datum

Unterschrift