

„Charakterisierung der Auswirkungen von Cetuximab auf EGFR und EGFRvIII im Zellkulturmodell“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Agnieszka Dreier
aus Bromberg

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. Joachim Weis
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Frank Müller
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Marc Spehr

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

“Cancer cells are not intelligent beasts which cleverly learn to escape immunological defenses and therapeutic agents, but instead represent the simple but diverse evolutionary complexity of life itself evolving within the host.”

Garth R. Anderson

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY.....	II
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 EGFR.....	1
1.1.1 Entdeckung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors	1
1.1.2 EGFR-Rezeptor Familie	1
1.1.3 Mechanismus der Liganden-induzierten EGFR-Dimerisierung.....	2
1.1.4 Modulation der Rezeptordimerisierung	3
1.1.5 Phosphorylierungsstellen des EGFR.....	4
1.1.6 Modulation der Signalweiterleitung des aktivierten EGFR	4
1.1.7 Inaktivierung des EGFR-Signals.....	9
1.2 EGFRvIII	10
1.2.1 Vorstellung der EGFRvIII-Deletionsmutante	10
1.2.2 Mechanismus der Liganden-unabhängigen EGFRvIII-Dimerisierung	10
1.2.3 Modulation der Dimerisierung und Aktivierung von EGFRvIII.....	11
1.2.4 Inaktivierung des EGFRvIII-Signals.....	12
1.3 Tumorerkrankungen.....	13
1.3.1 EGFR und EGFRvIII in Tumoren.....	13
1.4 Die EGFR-basierte Therapieansätze	14
1.4.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	14
1.4.2 Monoklonale Antikörper.....	15
1.5 Cetuximab	15
1.5.1 Mechanismus der Bindung von Cetuximab an EGFR	15
1.5.2 Auswirkungen der Cetuximab-Bindung	17
1.5.3 Die Verwendung von Cetuximab in der Klinik	18
1.5.4 Die Nebenwirkungen einer Cetuximab-Therapie.....	18
1.6 Die Zielsetzung.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Geräte.....	21
2.1.3 Verwendete Zelllinien.....	22
2.1.4 Medien und Lösungen zur Zellkultivierung.....	22
2.1.5 Kits und Marker	23
2.1.6 Antikörper	23
2.1.7 Sonstige Materialien	25
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	25
2.2.2 Genetische und molekularbiologische Methoden	32
2.2.3 Indirekte Immunofluoreszenz	34
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	38
2.3 Statistik.....	45

3	ERGEBNISSE	46
3.1	Überprüfung der Funktionalität der stabil transfizierten NR6- und A431-Zellen.....	46
3.2	Die <i>in vitro</i> Charakterisierung der Wirkungseffizienz von Cetuximab auf EGFRvIII	48
3.2.1	Internalisierung von Cetuximab nach Bindung an EGFRvIII.....	48
3.2.2	Einfluss von Cetuximab auf die Signaltransduktion von EGFRvIII und der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren.....	52
3.2.3	Einfluss von Cetuximab auf subzelluläre Lokalisierung von EGFRvIII.....	56
3.2.4	Untersuchungen zum Cetuximab-vermittelten Zellüberleben.....	58
3.2.5	Einfluss von Cetuximab auf die subzelluläre Lokalisierung von Mitochondrien und EGFRvIII	61
3.3	Die <i>in vitro</i> Charakterisierung der Wirkungseffizienz von Cetuximab auf EGFR.....	64
3.3.1	Internalisierung von Cetuximab nach Bindung an EGFR.....	64
3.3.2	Einfluss von Cetuximab auf Signaltransduktion von EGFR und seiner nachgeschalteten Faktoren .	69
3.3.3	Einfluss von Cetuximab auf die subzelluläre Lokalisierung von EGFR.....	75
3.3.4	Untersuchungen zum Cetuximab-vermittelten Überleben EGFR-exprimierender Zellen	76
3.3.5	Charakterisierung der Cetuximab-induzierten STAT3-Aktivierung in EGFR-exprimierenden Zellen.....	81
4	DISKUSSION	101
4.1	Die <i>in vitro</i> Charakterisierung der Wirkungseffizienz von Cetuximab auf EGFRvIII	101
4.1.1	Cetuximab verhindert nicht die Aktivierung der tumorspezi-fischen Isoform EGFRvIII.....	101
4.1.2	Verstärkte Aktivierung der tumorspezifischen Isoform EGFRvIII während kurzzeitiger Cetuximab-Behandlung	103
4.1.3	Zusätzliche Faktoren, die die Wirkung von Cetuximab reduzieren	104
4.1.4	Cetuximab erhöht die mitochondriale Aktivität der EGFRvIII-exprimierenden Zellen	104
4.1.5	Zusammenfassung.....	106
4.2	Die <i>in vitro</i> Charakterisierung der Wirkung von Cetuximab auf EGFR.....	107
4.2.1	Cetuximab hemmt die Aktivierung der Serin- Phosphorylierung des EGFR.....	108
4.2.2	Cetuximab-Inkubation hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3.....	109
4.2.3	Das Überleben der EGFR-exprimierenden Zellen ist STAT3-vermittelt.....	110
4.2.4	Cetuximab induziert DNA-Reparatur mittels der Eme1-Endo-nuklease	111
4.2.5	Zusammenhänge zwischen STAT3, Chk1, p53 und Eme1 bezüglich der DNA-Reparatur	113
4.2.6	Aktivierung der Eme1-vermittelten DNA-Reparatur resultiert in einer Therapieresistenz.....	114
4.2.7	Zusammenfassung.....	115
5	AUSBLICK	117
5.1	EGFRvIII	117
5.2	EGFR.....	118
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120
7	LITERATURVERZEICHNIS	125
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	138
9	DANKSAGUNG	140
10	LEBENS LAUF	141

11 VERÖFFENTLICHUNGEN	142
------------------------------------	------------

Zusammenfassung

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung normaler zellulärer Funktionen und des Zellüberlebens. In humanen Tumoren findet sich sehr häufig eine funktionelle Dysregulation von EGFR, oft auch die konstitutiv aktive Deletionsmutante EGFRvIII. Verschiedene Strategien wurden entwickelt, um EGFR bzw. EGFRvIII und die nachgeschalteten Transduktionsfaktoren zu inhibieren. Darüber hinaus stellt EGFRvIII ein aussichtsreiches Zielprotein für die molekulare Tumorthherapie dar, da es ausschließlich in Tumorzellen exprimiert wird. Der monoklonale Antikörper Cetuximab (Merck) kann sowohl an EGFR als auch an EGFRvIII binden. Die Wirksamkeit von Cetuximab kann jedoch stark beeinträchtigt sein, wenn es im Tumorgewebe zur Entwicklung von Resistenzen kommt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cetuximab weder die Aktivität von EGFRvIII noch seiner nachgeschalteten Transduktions-faktoren inhibiert. Eine Cetuximab-Behandlung veränderte auch nicht das Zellüberleben oder die proliferative Aktivität der untersuchten NR6M-Zellen. Allerdings resultierte die Inkubation mit Cetuximab in erhöhter mitochondrialer Aktivität und einer stärkeren Kolokalisierung von EGFRvIII und Mitochondrien. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass Mitochondrien möglicherweise eine Rolle im Überleben Cetuximab-behandelter EGFRvIII-exprimierender Zellen spielen. Folglich wäre es wichtig die mitochondriale Mitwirkung in der Entwicklung von Resistenzen zu bedenken, die bei einer Cetuximab-Therapie auftreten können.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit zeigt, dass Cetuximab zwar die Aktivierung des EGF-Rezeptors und der nachgeschalteten Transduktionsfaktoren Akt und Erk1/2 hemmt, jedoch auch die Expression und Aktivierung von STAT3 heraufsetzt. Dies resultiert in einem unveränderten Zellüberleben der EGFR-exprimierenden Zellen. Weitere Untersuchungen offenbarten, dass Cetuximab die DNA-Reparatur induziert, die mittels der Endonuklease Eme1/Mus81 gesteuert ist. Diese Daten weisen auf einen neuen Cetuximab-vermittelten Resistenz-Mechanismus hin. Somit würde eine Cetuximab-Therapie nicht nur eine Hemmung des Tumorwachstums verfehlen, sondern auch zusätzlich die DNA-Reparatur induzieren. Diese könnte sogar dazu führen, dass Tumorzellen während einer Kombinationstherapie mit DNA-schädigender Radio- oder Chemotherapie geschützt werden würden.

Summary

The epidermal growth factor receptor (EGFR) plays a very important role in maintaining normal cellular functions and cell survival. Functional dysregulation of EGFR and of its truncated form EGFRvIII is frequently found in human tumours. Several strategies have been investigated in order to inhibit EGFR activation and signaling. Furthermore EGFRvIII is a promising target for selective molecular tumour therapy due to the fact that it is only expressed by tumour cells. Cetuximab (Merck) is a monoclonal antibody which targets EGFR and EGFRvIII. So far inconsistent data have been reported regarding the effects of Cetuximab on EGFRvIII. Cetuximab targets EGFR very precisely but still Cetuximab therapy has been found to be ineffective for many patients due to development of resistance.

In the first part of the present work it could be demonstrated that Cetuximab neither inhibits the activation of EGFRvIII nor of the downstream signalling pathways. Incubation with Cetuximab also did not change the survival and proliferative activity of NR6M cells; however, it resulted in increased mitochondrial activity and an increase in co-localization of EGFRvIII with mitochondria. These results demonstrate that mitochondria might play a role in the survival of Cetuximab treated EGFRvIII expressing cells. Thus, it might be important to consider a role of mitochondria in terms of tumor drug resistance apparent in Cetuximab therapy.

In the second part of the work it could be shown that Cetuximab failed to induce cell death in EGFR expressing NR6W and A431 cells; although Cetuximab treatment decreased the expression and activation of EGFR and the transduction factors Erk1/2 and Akt. However, Cetuximab lead to increased expression and activation of STAT3, which is an important trigger of cell survival and proliferation. Further analysis revealed that Cetuximab enabled DNA repair mediated via the endonuclease Eme1/Mus81. Taken together, these data suggest a novel mechanism for the resistance against Cetuximab-mediated therapy. Moreover, combination of Cetuximab-therapy with induction of DNA damage caused by radio- or chemotherapy might be less likely to be successful due to DNA repair mediated via Cetuximab.

1 Einleitung

In einem biologischen System sind Zellen konstant diversen Stimuli ausgesetzt, die einer genauen Kontrolle und Regulation bedürfen. Die Funktion der Kommunikation mit der Umgebung wird durch eine große Zahl von Signalwegen erreicht, die eingehende Signale entgegennehmen und über intrazelluläre Signalketten verarbeiten. Dies resultiert in der Regulation physiologischer Prozesse, die zu Zellneubildung, Differenzierung oder Zellerntgang führen können. Zum Beispiel spielen die Rezeptortyrosinkinasen bei der Signalübermittlung und der Steuerung einer Vielzahl biologischer Prozesse eine wichtige Rolle.

1.1 EGFR

1.1.1 Entdeckung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

Ein typischer Vertreter der Rezeptortyrosinkinasen ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). Vor der Charakterisierung des EGF-Rezeptors wurde einer seiner wichtigsten Liganden entdeckt. Im Jahre 1962 isolierte Stanley Cohen aus der Unterkieferspeicheldrüse der Maus ein Protein, das das Wachstum der Schneidezähne und das Öffnen der Augenlider bei neugeborenen Tieren beschleunigte [1]. Da das Protein auch die Proliferation von Epithelzellen stimuliert, bekam es den Namen epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*). Zehn Jahre später wurde die Aminosäuresequenz des EGFs identifiziert. Eine spezifische Bindungsstelle für den EGF wurde im Jahre 1975 bestätigt. Hierbei wurde gezeigt, dass radioaktiv markiertes EGF speziell an die Oberfläche von Fibroblasten bindet. Schließlich wurde im Jahre 1978 der EGF-Rezeptor als ein 170 kDa großes Protein identifiziert [2].

1.1.2 EGFR-Rezeptor Familie

Der EGF-Rezeptor, auch unter dem Namen ErbB1 (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*) oder HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*) bekannt, ist ein Mitglied der HER-Familie. Diese Rezeptorfamilie besteht aus vier Mitgliedern zu der neben dem EGFR auch ErbB2 (HER2, NEU), ErbB3 und ErbB4 gehören [3]. Bis jetzt wurden elf Liganden identifiziert, die an die Rezeptoren der ErbB-Familie binden. Aufgrund ihres spezifischen Bindungsverhaltens lassen sie sich in vier

Gruppen einteilen. Zu der ersten Gruppe gehören die Liganden, die spezifisch nur den EGF-Rezeptor binden. Darin enthalten ist der epidermale Wachstumsfaktor, der transformierende Wachstumsfaktor alpha (TGF α , *transforming growth factor*), Amphiregulin (AR) und Epigen. In der zweiten Gruppe sind das Heparin-bindende EGF (HB-EGF), Epiregulin und Betacellulin (β -Cellulin) enthalten, die sowohl den EGFR als auch ErbB4 binden. Die letzten beiden Gruppen beinhaltet die Neureguline (NRG), auch unter dem Namen Heregulin bekannt. Hierbei gehören NRG1 und NRG2 zur dritten Liganden-Gruppe. Sie binden sowohl ErbB3 als auch ErbB4. Zu der letzten Gruppe gehören NRG3 und NRG4, die nur an den ErbB4-Rezeptor binden können. Bisher ist noch kein direkter Ligand für den ErbB2-Rezeptor beschrieben worden [4].

1.1.3 Mechanismus der Liganden-induzierten EGFR-Dimerisierung

Wie alle Rezeptortyrosinkinase ist auch der EGFR aus vier funktionellen Domänen aufgebaut, und zwar aus einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einer transmembranalen Domäne, einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne [5].

EGF-Moleküle werden als Monomere sezerniert. In ihrer aktiven Form liegen sie jedoch als Dimere vor. Ihre Bindung an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors führt zu ihrer Aktivierung. Die extrazelluläre Domäne des EGFR ist aus vier unterschiedlichen Proteinsubdomänen aufgebaut (Abb.1). Sie besteht aus zwei homologen Leucin-reichen L-Subdomänen und zwei Cystein-reichen CR-Subdomänen in der Reihenfolge L1-CR1-L2-CR2, die auch als Subdomäne I, II, III und IV bezeichnet werden [6]. Die Ligandenbindung erfolgt an die L-Subdomänen, während die CR-Subdomänen für die Regulation der Rezeptordimerisierung verantwortlich sind [7]. Für den Wachstumsfaktor EGF ist beispielsweise bekannt, dass er über zwei Rezeptor-Bindungsstellen verfügt: eine hochaffine spezifische Bindungsstelle und eine zweite weniger affine Bindungsstelle, die auch weniger spezifisch ist [8]. Ein großer ligandenungebundener Teil der EGF-Rezeptoren (etwa 95 %) liegt in der kompakten autoinhibierten Form vor, die auch als die „angebundene Konformation“ (*tethered conformation*) bezeichnet wird (Abb.1) [7]. In dieser Konformation interagieren die CR-Subdomänen intramolekular miteinander und sind somit für die Rezeptordimerisierung nicht zugänglich [7,9]. Bei den restlichen 5 % der ligandenungebundenen Rezeptoren ist die angebundene Konformation aufgebrochen, d.h. der EGFR liegt in der „ungebundenen

Konformation“ (*untethered conformation*) vor. Hierbei rücken die L-Subdomänen in unmittelbare Nähe zueinander und führen dazu, dass die beiden CR-Subdomänen nicht mehr miteinander interagieren können. Somit sind die L-Subdomänen für eine Bindung EGFR-spezifischer Liganden zugänglich (Abb.1) [7].

Die als Dimer vorliegenden EGFR-Liganden bevorzugen die ungebundene Konformation des EGFR, da sie dort gleichzeitig an die Subdomänen L1 und L2 binden können [10,11]. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor stabilisiert die ungebundene Konformation der extrazellulären Domäne des EGFR und leitet die Rezeptordimerisierung ein. Die Dimerisierung zweier Rezeptoren ist ausschließlich Rezeptor-vermittelt und geht von den CR1-Subdomänen der Rezeptoren aus, die miteinander interagieren (Abb.1) [5].

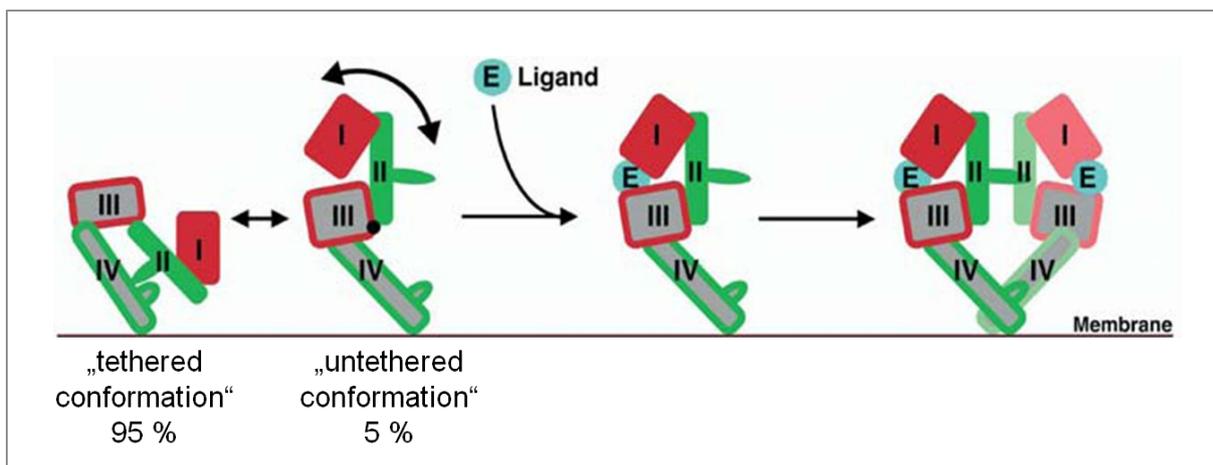


Abb 1: Liganden-induzierte Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des EGFR

Die extrazelluläre Domäne des EGFR wird in vier Subdomänen unterteilt I (L1), II (CR1), III (L2) und IV (CR2). Hauptsächlich liegen die EGF-Rezeptoren in der gebundenen Konformation („tethered conformation“) vor. Nur 5 % der Rezeptoren weisen die ungebundene Konformation („untethered conformation“) auf. Die EGFR-spezifischen Liganden bevorzugen zur Bindung die ungebundene Konformation und interagieren simultan mit Subdomäne L1 und L2. Die Rezeptordimerisierung ist ausschließlich Rezeptorvermittelt und wird von der Interaktion der CR1-Subdomäne dominiert (aus [12]).

1.1.4 Modulation der Rezeptordimerisierung

Die Bindung der verschiedenen Liganden an den EGFR führt zur Bildung von Rezeptor- Homodimeren oder -Heterodimeren. Die Regulation der Dimerisierung, die auch als Transmodulation bezeichnet wird, ist ein komplexer Prozess. Der EGFR kann nämlich nicht nur mit einem anderen EGF-Rezeptor dimerisieren, sondern auch mit einem der drei anderen Mitglieder der ErbB-Familie. Zudem können an die ErbB-

Rezeptoren verschiedene ErbB-spezifische Liganden binden. Durch diese Möglichkeit der Kombination mehrerer Liganden und Rezeptoren miteinander ergibt sich eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege, die initiiert werden können. Das resultierende Signal hängt davon ab, welcher Ligand vorhanden ist, an welchen Rezeptor der Ligand bindet und welcher zweite Rezeptor zur Dimerisierung zur Verfügung steht. Je nachdem welches Dimer entsteht, können sich nur bestimmte zytoplasmatische Signalpeptide anlagern und somit nur bestimmte Signalkaskaden initiiert werden [13]. Der bevorzugte Bindungspartner des EGFR ist der ErbB2-Rezeptor. EGFR-ErbB2-Heterodimere weisen eine erhöhte Ligandenaffinität im Vergleich zu EGFR-Homodimeren auf, was wiederum zu einer verlängerten Signaldauer führt [14,15].

1.1.5 Phosphorylierungsstellen des EGFR

Die Dimerisierung stimuliert die Aktivität der intrinsischen Tyrosinkinase und löst die Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste (Y974, Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148, Y1173) in der zytoplasmatischen Regulationsdomäne des Rezeptors aus [16]. Es gibt auch eine Reihe von Tyrosinresten, die nicht vom Rezeptor selbst phosphoryliert werden können. Dazu gehören Y820, Y845, Y891 und Y1101 [17,18]. Die Funktion dieser Tyrosinreste ist jedoch weitgehend ungeklärt.

1.1.6 Modulation der Signalweiterleitung des aktivierten EGFR

Damit es zur Aktivierung bestimmter Signalwege kommen kann, interagieren die phosphorylierten Tyrosinreste mit PH- (*pleckstrin homology*), SH2- (*src homology 2*) beziehungsweise PTB- (*phosphotyrosine binding*) Domänen unterschiedlicher Effektorproteine. Die an den phosphorylierten EGF-Rezeptor bindenden Effektorproteine können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Proteine ohne enzymatische Aktivität und Proteine mit enzymatischer Aktivität. Proteine ohne Enzymaktivität bilden eine Plattform zur Rekrutierung von Signalproteinen an die Zellmembran. Zu den Proteinen mit Enzymaktivität gehören die Src (*sarcoma kinase*)-Kinasen, die Phosphatasen (PTP), die Phospholipasen (PL) und die Ras-GAPs (*GTPase activating protein*). Die Bindung eines solchen Proteins an den phosphorylierten EGFR kann zur Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung des Effektorproteins und somit Aktivierung seiner enzymatischen Aktivität führen. Die Enzymaktivität kann auch durch eine Konformationsänderung ausgelöst werden, die nach der Bindung des Effektorproteins durch Wechselwirkungen mit dem

autophosphorylierten EGF-Rezeptor induziert wird [19,20,21,22]. Somit verfügt der Rezeptor über vielfältige Möglichkeiten zur Kontrolle und Modulation bestimmter Signalwege.

Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors leitet eine ganze Reihe komplexer Signalkaskaden ein, zu denen unter anderem der MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalweg, der STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-Signalweg oder die Aktivierung der Phosphatidylinosit-3-Kinase (PI3K) und Akt (auch Proteinkinase B, PKB genannt) gehören (Abb.2).

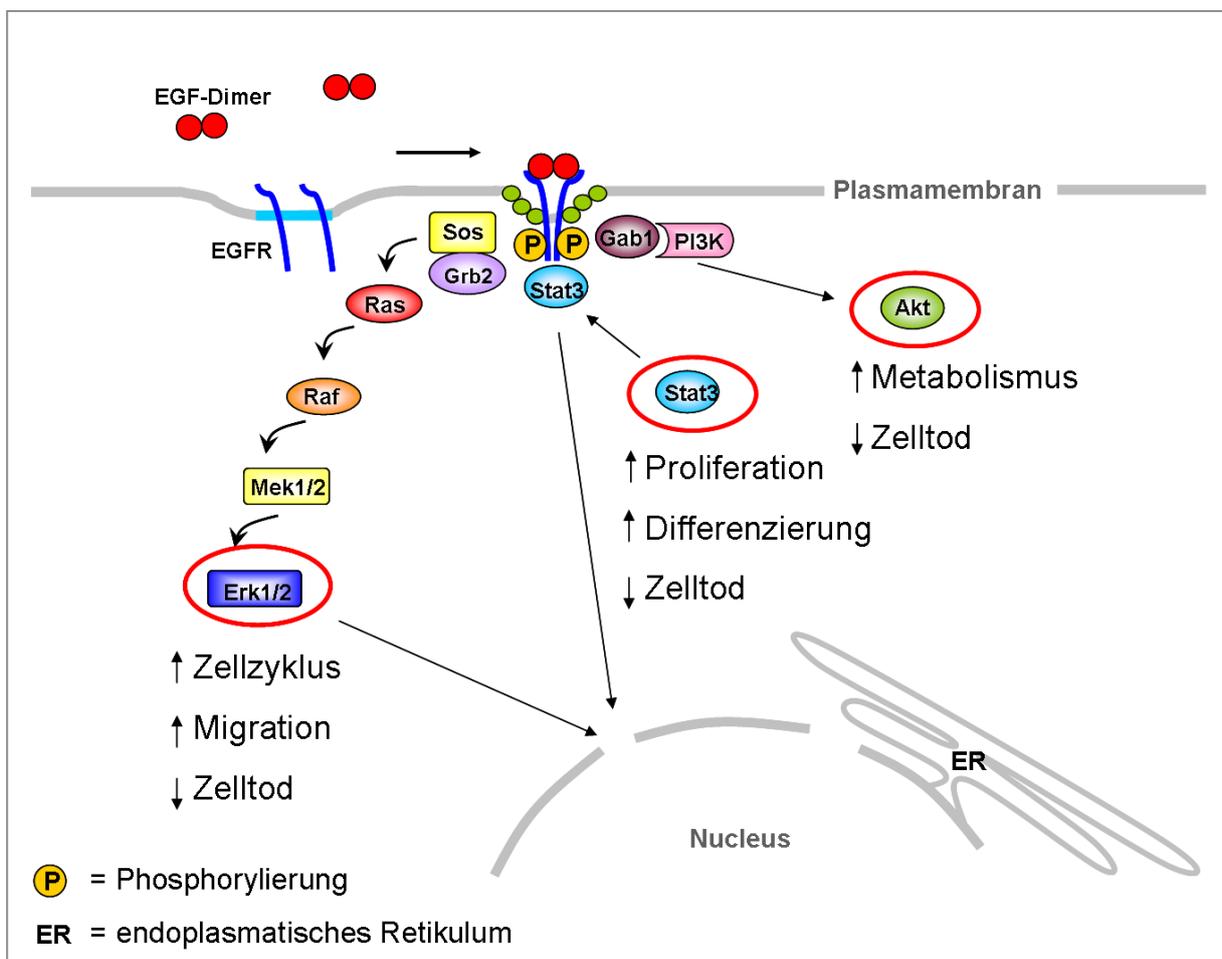


Abb 2: EGF-induzierte Signaltransduktionskaskaden des EGFR-Homodimers

Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors an den EGF-Rezeptor führt zu Bildung von EGFR-Homodimeren. Dimerisierung des Rezeptors führt zur Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste und zur Rekrutierung verschiedener Adapterproteine. Daraufhin werden unterschiedliche Signalwege eingeleitet, die zur Aktivierung von Erk1/2, STAT3 und Akt führen. Nähere Erläuterungen im Text.

1.1.6.1 EGFR-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges

Der MAPK-Signalweg ist der Hauptsignalweg des EGF-Rezeptors [23]. An die phosphorylierten Tyrosinreste 1068, 1086 oder 1148 des EGF-Rezeptors binden die

Adapterproteine Shc (*Src homology domain-containing protein C*) oder Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) (Abb.2) [24]. Diese können wiederum den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor, GEF*) Sos (*son of sevenless*) rekrutieren [25]. Sos ist ein Ras (*rat sarcoma*)-GTP-Austauschfaktor, der die Dissoziation des an Ras gebundenen GDP (*guanosine diphosphate*) katalysiert. Daraufhin wird das Protein durch die Bindung von GTP (*guanosine trisphosphate*) für eine kurze Zeit in seine aktive Form überführt. Ras gehört zur Gruppe kleiner GTP-bindender Proteine („*small GTPases*“), die als molekulare Schalter fungieren und eine Vielzahl biologischer Prozesse kontrollieren können. Das GTP-gebundene Ras führt der Reihe nach zur Aktivierung der drei Kinasen der MAP-Kinase-Kaskade: Raf (*rat fibrosarcoma*), Mek (*MAPK/Erk kinase 1*) und Erk (*extracellular signal-regulated kinase*). Die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade beginnt mit der Phosphorylierung der MAP-Tripelkinase Raf1. Raf1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die ihrerseits die MAP-Kinase-Kinase Mek1 und Mek2 (*MAP/ERK kinase*) an zwei Serinresten phosphoryliert und hierdurch aktiviert. Mek1 und Mek2 sind nach ihrer Aktivierung in der Lage die MAP-Kinasen Erk1 (p42) und Erk2 (p44) (auch Erk1/2 genannt) an Serin- und Threoninresten zu phosphorylieren und dementsprechend zu aktivieren [26,27]. Die MAP-Kinasen Erk1/2 können durch den EGFR auch über einen Ras-unabhängigen Weg aktiviert werden und zwar über die phosphorylierten Tyrosinreste 992 und 1173. Diese autophosphorylierten Tyrosinreste dienen in erster Linie als Andockstellen für PLC γ 1 (Phospholipase C gamma 1). Ihre Aktivierung durch den Rezeptor führt zur Freisetzung der sekundären Botenstoffe („*second messenger*“) Inosit-(1,4,5)-trisphosphat (IP $_3$) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) [28,29]. IP $_3$ kann von der Membran ins Cytosol gelangen und dort an spezifische IP $_3$ -Kanäle des endoplasmatischen Retikulums binden. Dies führt zum Einstrom von Calciumionen (Ca $^{2+}$) aus intrazellulären Speichern ins Cytosol. Im calciumreichen Milieu ändern sich Konformation und Affinität von Proteinkinasen, so dass weitere Reaktionen möglich sind. Das an der Plasmamembran lokalisierte DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC)-Isoformen. Diese wiederum können zur Ras-unabhängigen Erk1/2 Aktivierung führen [30,31].

Phosphoryliertes Erk1/2 transloziert in den Zellkern und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren, die an Promotorregionen bestimmter Gene binden und ihre Transkription aktivieren. Dabei handelt es sich um Gene, die für Proteine des Zellzyklus kodieren. Die MAP-Kinasen Erk1/2 aktivieren auch die Serin/Threonin-

Kinasen p90RS6K (*90 kDa ribosomal S6 kinase*) und MSK-1 (*mitogen and stress activated kinase-1*). Diese Kinasen können die an der Transkription beteiligte Proteine phosphorylieren und sie dadurch aktivieren [32]. Über die Aktivierung von Erk1/2 werden Zellzyklusprogression, Zellmigration, und Zelldifferenzierung reguliert [33].

1.1.6.2 EGFR-abhängige Aktivierung des Akt-Signalweges

Ein anderer wichtiger Signalweg läuft über die heterodimere PI3-Kinase (PI3K) ab (Abb. 2). Die PI3-Kinase ist ein Heterodimer, das aus einer katalytischen (p85) und einer regulatorischen (p110) Untereinheit besteht [34]. Eine Aktivierung der PI3-Kinase kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Die direkte Aktivierung von PI3K verläuft über die Heterodimerisierung des EGFR mit ErbB3, da der EGF-Rezeptor im Gegensatz zum ErbB3 keine Bindungsstellen für die PI3-Kinase besitzt [35]. Die PI3-Kinase kann aber auch über Adapterproteine rekrutiert werden. Dabei bindet Gab1 (*Grb2-associated-binding protein 1*) an die phosphorylierten Tyrosinreste 1068 oder 1086 des EGF-Rezeptors und kann so wiederum die PI3-Kinase rekrutieren. Jedoch wird hierbei die PI3K in einem geringeren Ausmaß aktiviert.

Nach der Bindung katalysiert die p110- Untereinheit der PI3K die Phosphorylierung von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) zum sekundärem Botenstoff Phosphatidylinosit-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) [36]. Dies führt zur Rekrutierung von PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase1*) und der Serin/Threonin-Kinase Akt. Die vollständige Kinaseaktivität von Akt wird erst erreicht, wenn PDK1 Akt am Threoninrest 308 und zusätzlich die Serin/Threonin-Kinase mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) am Serinrest 473 phosphoryliert [37].

Die Serin/Threonin-Kinase Akt spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Zellvermehrung und beim programmierten Zelltod. Die bereits erwähnte Serin/Threonin-Kinase mTORC2 fungiert als Sensor für das Angebot an Nährstoffen und sorgt für ein Gleichgewicht zwischen Nährstoffangebot und Zellwachstum. Wenn genügend Nährstoffe vorhanden sind, aktiviert mTORC2 die Serin/Threonin-Kinase p70S6K. Nach anschließender Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 kommt es zur Steigerung der Translation. Es entstehen Proteine, die am Zellzyklus und an der Translation beteiligt sind. Die Kinasen mTOR und p70S6K sind somit wichtige Aktivatoren des Zellzyklus [38].

Die PI3K/Akt Signalkaskade kann aber auch den programmierten Zelltod inhibieren. Ausgehend vom Schlüsselenzym Akt kann zum Beispiel der Apoptose-fördernde Faktor Caspase-9 direkt oder über BAD (*Bcl-2/Bcl-XL-associated death promoter*) phosphoryliert und dadurch inhibiert werden. Das proapoptotische Protein BAD kann nicht mehr an Bcl-xL (*bcl = B-cell lymphoma*) binden, um dieses zu inhibieren. Bei Bcl-xL handelt es sich um ein antiapoptotisches Protein, welches die Aktivierung von Caspase-9 und somit die Apoptose verhindert [39].

1.1.6.3 EGFR-abhängige Aktivierung des STAT3-Signalweges

Die STAT-Proteinfamilie umfasst sieben Mitglieder: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Die STAT-Proteine STAT2, STAT4 und STAT6 werden spezifisch von einer geringen Anzahl an Cytokinen (IFN α (*interferone alpha*), IL-6 (*interleukin-6*), IL-12, IL-13) aktiviert. Die Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT1, STAT3, STAT5a und STAT5b kann neben einer großen Anzahl an Zytokinen auch von Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Src-Kinasen erreicht werden [40,41,42].

Speziell STAT3 kann spezifisch durch Mitglieder der IL-6-Zytokin-Familie wie IL-6, OSM (*Oncostatin M*) und LIF (*leukemia inhibitory factor*), aber auch Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) und EGF aktiviert werden [43]. Zudem wird STAT3 auch von den Rezeptortyrosinkinasen EGFR, FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) oder PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), Mitgliedern der Familie der Janus-Kinasen (JAK) oder den nicht Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen wie Ret und Src aktiviert [44].

Die phosphorylierten Tyrosinreste 992, 1045, 1068, 1086 und 1173 des EGF-Rezeptors sind potentielle Bindungsstellen für STAT3 (Abb. 2) [45,46]. STAT3 kann zudem auch indirekt über den EGF-Rezeptor aktiviert werden, zum Beispiel über die Src-Kinase. Diese bindet an den phosphorylierten Tyrosinrest 845 des EGFRs. Daraufhin wird sie aktiviert und fungiert als Andockstelle für STAT3, welches nach der Bindung an sie Src-Kinase ebenfalls phosphoryliert und somit aktiviert wird. Dabei rekrutieren die Janus Kinasen STAT-Proteine zur Src-Kinase [47].

Bindung von STAT3 an den EGFR führt zu dessen Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 oder Serinrest 727 und zu seiner Homo- oder Heterodimerisierung. STAT3 kann sowohl mit STAT1 oder mit einem anderen STAT3-Protein dimerisieren [46,48]. Daraufhin transloziert das STAT-Dimer in den Nukleus wo es mit DNA-Konsensus-

Elementen interagiert, die einer Reihe von Genen vorgeschaltet sind [49]. Die Bindung aktivierter STAT-Proteine an DNA-Konsensus-Elemente im Zellkern führt zur Expressierung verschiedener Gene, die wesentlich für das Zellüberleben, die Zelldifferenzierung und die Zellproliferation verantwortlich sind [44,50]. Kürzlich wurde ein Modell beschrieben, in dem die EGFR-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 die DNA-Reparatur aktivieren kann [51].

1.1.7 Inaktivierung des EGFR-Signals

Die Stärke der Aktivität des EGF-Rezeptors kann auf unterschiedliche Art und Weise moduliert werden. Zum einen kann die Regulation der Aktivität der Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors über intrazellulär gelegene regulatorische Serin- und Threoninreste erfolgen. Beispielsweise führt die *in vitro* Phosphorylierung der Serinreste an Position 1046/1047 (S1046/1047) zur Herabsetzung der Tyrosinaktivität des EGF-Rezeptors [52]. Eine andere Möglichkeit die Aktivität des Rezeptors indirekt zu reduzieren vermitteln die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs). Diese Proteine dephosphorylieren die Autophosphorylierungsstellen und inaktivieren dadurch bestimmte Signalwege des EGF-Rezeptors [53,54,55,56]. Die Inaktivierung des EGFR-Signals kann ebenfalls durch die Entfernung des Ligand-Rezeptor-Komplexes von der Zelloberfläche (die sogenannte Endocytose) vermittelt werden [57]. Je nachdem welcher Ligand an den EGF-Rezeptor gebunden ist, kann anschließend der Rezeptor zurück zur Oberfläche transportiert werden (Recycling) oder aber abgebaut (Degradation) werden. Die Bindung von EGF an den Rezeptor, die zur Entstehung von EGFR-Homodimeren führt, leitet nach der Endocytose den lysosomalen Abbau der Liganden-Rezeptor-Komplexe ein. Entstehen nach EGF-Bindung jedoch EGFR-ErbB2-Heterodimere, entgehen die Rezeptoren dem Abbauvorgang und werden wieder zurück zur Zelloberfläche transportiert. Die Bindung von TGF α an den EGF-Rezeptor, führt unabhängig von der Entstehung eines Homo- oder Heterodimers, ebenfalls zum Transport der Rezeptoren zurück zur Oberfläche [57]. Der Vorgang des Rezeptor-Recyclings stellt somit eine weitere Möglichkeit zur Modulation der Signalstärke dar. Rezeptoren, die dem lysosomalen Abbau entgehen und zurück zur Oberfläche transportiert werden, stehen schneller für eine erneute Aktivierung bereit [58].

1.2 EGFRvIII

1.2.1 Vorstellung der EGFRvIII-Deletionsmutante

Umgestaltungen im EGFR-Gen resultieren in unterschiedlichen Deletionsmutanten [59]. Die häufigste Deletion im *egfr*-Gen ist die Typ III EGFR-Deletion *egfrvIII*, die auch als $\Delta 801egfr$ oder *de2-7egfr* bezeichnet wird [60]. Zuerst wurde diese Mutation als ein abweichendes Transkript in humanem Gehirntumor, dem Glioblastom beobachtet [61]. Das *egfrvIII*-Gen weist eine „in-frame“-Deletion von 801 Basenpaaren auf, die den Exons 2 – 7 der mRNA und den Aminosäureresten 6 – 273 der extrazellulären Domäne entsprechen. An der Fusionsstelle zwischen den Aminosäureresten 5 und 274 wird eine neue Aminosäure generiert, namentlich ein Glycin, was somit eine einzigartige primäre Sequenz des *egfrvIII* hervorbringt. Es resultiert ein Protein von 145 kDa, welches im Vergleich zum EGFR mit 170 kDa deutlich kürzer ausfällt [62]. *EgfrvIII* kann einerseits, wie oben beschrieben, durch eine genomische Deletion oder aber durch alternatives Spleißen des *egfr*-Gens generiert werden [63,64,65]. Ein wichtiges Charakteristikum dieser Mutante ist, dass sie nicht in der Lage ist, Liganden des EGFR zu binden. Trotzdem ist diese Variante konstitutiv phosphoryliert und fähig stromabwärts liegende Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren [60].

1.2.2 Mechanismus der Liganden-unabhängigen EGFRvIII-Dimerisierung

Durch die Deletion von 267 Aminosäureresten fehlen der Deletionsmutante beinahe die gesamte L1-Subdomäne und Zweidrittel der CR1-Subdomäne. Somit können EGFR-assoziierte Liganden nicht mehr binden. Der Wildtyp-EGF-Rezeptor kann sowohl in der autoinhibierten „angebundenen Konformation“ als auch in der offenen „ungebundenen Konformation“ vorliegen. Erst wenn der EGFR diese ungebundene Konformation einnimmt, können die Liganden binden und so zu seiner Aktivierung führen [65]. Bei der EGFRvIII-Isoform führt die Deletion zu einer Strukturänderung des EGFRvIII-Proteins, welche der „ungebundenen Konformation“ des EGFR ähnelt. Die Deletion scheint daher die konstitutiv aktive Form des EGFRvIII zu unterstützen. Jedoch ist der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt [66]. Da jedoch die Deletion erst nach dem Signalpeptid erfolgt, kann EGFRvIII denselben Transportweg

und Bestimmungsort wie der EGFR einschlagen und in die Zellmembran eingebaut werden [62].

1.2.3 Modulation der Dimerisierung und Aktivierung von EGFRvIII

Die konstitutiv aktive EGFRvIII-Isoform kann durch Dimerisierung mit einem anderen EGFRvIII-Protein Rezeptor-Homodimere ausbilden. Durch Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie können auch Rezeptor-Heterodimere gebildet werden. Die Art der Dimerisierung ähnelt der der Liganden-induzierten EGFR-Dimerisierung [67,68]. Die gebildeten EGFRvIII- Homo- bzw. Heterodimere werden konstitutiv an den Tyrosinresten phosphoryliert. Dabei weist der intrazelluläre Teil des EGFRvIII-Rezeptors dieselbe primäre und sekundäre Struktur auf wie der EGF-Rezeptor. Unterschiede treten in der Aktivität der Tyrosinkinasedomäne und einiger Autophosphorylierungsstellen auf [65,67,69].

Grundsätzlich werden in der Tyrosinkinasedomäne des EGFRvIII dieselben Tyrosinreste autophosphoryliert wie im EGF-Rezeptor. Hauptsächlich werden jedoch die Tyrosinreste an den Positionen 1068, 1148 und 1173 autophosphoryliert [69]. Zudem beträgt das Ausmaß der Phosphorylierung der Tyrosinreste des EGFRvIII lediglich 10% der ligandenaktivierten Phosphorylierung des EGFR, fällt also deutlich schwächer aus [60].

1.2.3.1 EGFRvIII-abhängige Aktivierung der Erk1/2 MAP-Kinasen

Der MAP-Kinase-Signalweg wird in EGFRvIII-exprimierenden Zellen hauptsächlich über die Bindung der Adapterproteine Shc oder Grb2 an die Tyrosinreste 1068 und 1148 der konstitutiv aktiven Rezeptorvariante aktiviert [65,67,70,71]. EGFRvIII-exprimierende Zellen einer Glioblastom-Zelllinie (U87MG-Zellen) zeigen beispielsweise im Vergleich zu ihren parentalen Zellen eine doppelt so hohe Expression von Ras [70]. In EGFRvIII-exprimierenden Fibroblasten ist die Mek-Aktivität sogar um das Vierfache höher als in EGFR-exprimierenden Zellen. Jedoch führt das nicht zwangsläufig zu einer höheren Aktivierung der Kinasen Erk1/2. Dies ist auf negative Feedback-Mechanismen zurückzuführen, die erst auf der Ebene der MAP-Kinasen wirken [71].

1.2.3.2 EGFRvIII-abhängige Akt-Aktivierung

EGFRvIII aktiviert den PI3K-Akt-abhängigen Signalweg in Fibroblasten, Glioblastom-Zelllinien und in immortalisierten Astrozyten [72,73].

Die indirekte PI3-Kinase-Aktivierung läuft in den EGFR- bzw. EGFRvIII-exprimierenden Zellen auf die gleiche Art ab. Dabei bindet das Adapterprotein Gab1 an die phosphorylierten Tyrosinreste 1068 oder 1086 von EGFRvIII und kann so die PI3-Kinase rekrutieren. Jedoch wird in den EGFRvIII-exprimierenden Zellen die PI3-Kinase und folglich auch Akt, deutlich stärker aktiviert, als in Zellen, die den EGFR exprimieren [72]. Dies führt in den EGFRvIII-exprimierenden U87MG- Zellen dazu, dass die Expression des Zellzyklus-inhibierenden Proteins p27, eines CDKIs (cyclin dependent kinase inhibitors), abnimmt. Somit schreitet der Zellzyklus weiter voran, da die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) nicht inhibiert werden. Dies resultiert in einer erhöhten Zellproliferation [73].

1.2.3.3 EGFRvIII-abhängige STAT3-Aktivierung

Im Gegensatz zum EGF-Rezeptor, führt EGFRvIII zu einer schwächeren Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3 [50,74]. Jedoch scheint das STAT3-Signal eine Rolle beim Wachstum von Tumorzellen zu spielen, da eine Deletion von STAT3 in EGFRvIII-exprimierenden Astrozyten reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zu Kontroll-Astrozyten zeigt. Zudem interagiert EGFRvIII mit STAT3 sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. In einer kleineren Anzahl humaner Glioblastome wurde eine Kolo-kalisierung zwischen EGFRvIII und STAT3 im Zellkern detektiert. Daraus wurde geschlossen, dass EGFRvIII in Gliomzellen ebenfalls eine Rolle als Transkriptionsfaktor spielen könnte [75].

1.2.4 Inaktivierung des EGFRvIII-Signals

Die Beendigung der EGF-induzierten Signaltransduktion des EGF-Rezeptors beginnt mit der Rezeptor-Internalisierung und endet letztendlich im Lysosom, in dem der Rezeptorabbau stattfindet. Für die konstitutiv-aktive EGFRvIII-Isoform war längere Zeit bekannt, dass sie auf diesem Wege nicht inaktiviert werden kann. Die Ursache dafür liegt jedoch an der geringen Phosphorylierung des Tyrosinrestes 1045 von EGFRvIII, der als Bindestelle für die Ubiquitin-Ligase c-Cbl (*casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*) fungiert. Die Bindung der Ligase an den Rezeptor führt zu seiner Ubiquitinierung, Internalisierung und lysosomalem Abbau [76,77,78,79]. Die Hypophosphorylierung des Tyrosinrestes an Position 1045 führt zum ineffizienten lysosomalen Abbau von EGFRvIII. Nach der Internalisierung der Isoform wird diese vermehrt zurück zur Oberfläche transportiert und entgeht so der Degradation [80].

1.3 Tumorerkrankungen

Ein Tumor (Neoplasie) entsteht durch eine Fehlregulation des Zellwachstums, die zur Zunahme des Gewebavolumens führt. Tumore können unterschiedliche Gewebe betreffen. Sie können gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) sein. Gutartige Tumore verdrängen durch ihr Wachstum umliegendes Gewebe, infiltrieren es aber nicht und bilden auch keine Tochtergeschwülste (Metastasen) aus. Bösartige Tumore hingegen können durch invasives Wachstum umliegendes Gewebe zerstören und zudem können sie hämatogen oder lymphogen metastasieren [81].

Bei gutartigen Neoplasien reicht als Therapie meistens eine operative Entfernung des Tumors aus. Wenn jedoch der Tumor an einer schwer zugänglichen Stelle im Körper liegt oder bei bösartigen Tumoren reicht oft eine operative Tumorentfernung nicht aus. Zur Behandlung dieser Tumoren werden seit den 1980er Jahren zusätzlich Chemotherapie, Strahlentherapie oder eine Kombination beider Methoden eingesetzt [82]. Die Wirkung der meisten therapeutischen Substanzen beruht auf der Hemmung der Zellteilung der Tumorzellen. Jedoch führen diese Therapieformen wegen ihrer hohen Toxizität und durch das Fehlen der Spezifität, da sie neben den Krebszellen auch gesunde, sich teilende Zellen im Körper angreifen, zu schweren Nebenwirkungen. Bei einem schlechten Allgemeinzustand des Patienten muss auf eine solche Therapie sogar ganz verzichtet werden. In vielen Fällen erfüllt die Chemo- und/oder Strahlentherapie nur einen palliativen und lebensverlängernden Effekt und führt somit nicht zur Heilung [83].

1.3.1 EGFR und EGFRvIII in Tumoren

Der EGF-Rezeptor spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung normaler zellulärer Funktionen und des Zellüberlebens. Dieser Rezeptor wird von gesunden Zellen exprimiert, die vorwiegend einen epithelialen Ursprung besitzen, wie z.B. die Haut, die Leber oder der Gastrointestinaltrakt. Die Signaltransduktionswege des EGFR stehen jedoch auch in Beziehung zur Entstehung maligner Zellen [84,85].

Schon vor über 25 Jahren wurde der EGFR als ein mögliches Zielprotein für eine gezielte Krebstherapie vorgeschlagen [86]. Dieser Rezeptor wird häufig in Tumoren der Brust, der Lunge, des Kopfes, des Halses, des Pankreas, der Niere, der Harnblase, des Darmes, des Eierstocks und der Vorsteherdrüse überexprimiert [64,87,88,89,90,91,92]. Eine gesunde Zelle exprimiert zwischen 40.000 und 100.000 EGF-Rezeptoren. Eine Tumorzelle kann bis zu zwei Millionen Rezeptoren

exprimieren [86]. Zusätzlich findet man in Tumorzellen sehr häufig eine gesteigerte Produktion der EGFR-Liganden, so dass die Rezeptoraktivierung über einen autokrinen Stimulationsweg durch die gleiche Zelle erfolgen kann [93,94]. Auch exprimieren manche Tumore durch genetische Reorganisationen entstandene Liganden-unabhängige Isoformen des EGFR, wie die bereits erwähnte konstitutiv aktive Isoform EGFRvIII [95]. Diese tumorspezifische Isoform wird ausschließlich in Tumorzellen exprimiert und wurde bereits in mehreren Tumoren einschließlich des Kopfes, des Halses, der Lunge, der Brust und der Prostata gefunden [96]. Eine erhöhte Aktivität des Rezeptors oder die Anwesenheit der konstitutiv aktiven EGFRvIII-Isoform führt zu einer schlechteren klinischen Prognose für den Patienten, die sich in reduzierter Überlebenszeit und erhöhtem Rezidiv- und Metastasierungsrisiko manifestiert [59,64]. Somit spielen die Expression von EGFRvIII und/oder die Überexpression des EGFR eine entscheidende Rolle in der Tumorentwicklung und Tumorprogression. Daher wird die Blockade des EGF-Rezeptors und der EGFRvIII-Rezeptorvariante als eine gezielte molekulare Tumorthherapie immer wichtiger.

1.4 Die EGFR-basierte Therapieansätze

Es wurden einige Strategien entwickelt, die die Aktivierung des EGF-Rezeptors blockieren oder dessen Expression herunter regulieren, um Proliferation der Tumorzellen zu inhibieren und allgemein einen besseren klinischen Erfolg zu erreichen [97]. In den letzten Jahren haben zwei Substanzklassen Eingang in die Therapie gefunden: die monoklonalen Antikörper und die synthetischen Tyrosinkinase-Inhibitoren [85].

1.4.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Die Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) sind kleine Moleküle, die direkt die intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität des EGFR hemmen [98]. Die kompetitive Bindung an die intrazelluläre ATP-Bindungsstelle des Rezeptors verhindert die Autophosphorylierung der Tyrosinreste. Das führt letztendlich zur Blockade der nachgeschalteten Signalkaskaden [99,100].

Gefitinib (IressaTM) und Erlotinib (TarcevaTM) sind die im Rahmen von klinischen Studien am besten charakterisierten und etablierten Substanzen. Im Jahre 2003 wurde Gefitinib von der FDA (Food and Drug Administration) zur Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms in der Drittlinientherapie zugelassen. Im Herbst

des Jahre 2004 wurde Erlotinib zur Behandlung des metastasierten oder lokal fortgeschrittenen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms als Zweit- und Drittlinientherapie evaluiert [101,102].

1.4.2 Monoklonale Antikörper

Durch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors, wird die Anlagerung natürlicher Liganden verhindert. Somit findet die Aktivierung des Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege nicht statt. Zudem wird der EGFR-Antikörper-Komplex internalisiert und abgebaut. Cetuximab war der erste monoklonale Antikörper, der für eine gezielte Tumorthherapie eingesetzt wurde [103,104].

1.5 Cetuximab

Zur Herstellung des murinen monoklonalen Antikörpers M225 wurde als Immunogen der EGF-Rezeptor aus humanen Karzinomzellen epidermoiden Ursprungs verwendet [105]. M225 konkurriert sehr effektiv mit EGF um die Bindung an den EGF-Rezeptor und inhibiert die Liganden-induzierte Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung des Rezeptors und somit auch das Zellwachstum *in vitro* [105,106,107]. Jedoch führte die Verabreichung von M225 bei allen Patienten zur Bildung humaner anti-muriner Antikörper. Diese neutralisieren mit zunehmender Therapielänge die Mausantikörper und führen dazu, dass die Therapie wirkungslos wird [108]. Zudem bewirkt die Ausbildung humaner anti-muriner Antikörper Überempfindlichkeitsreaktionen. Um die vorhandene Immunogenität des Antikörpers zu reduzieren wurde eine chimäre Version des M225 generiert, namentlich das IMC-C225. Dazu wurde die konstante Region des humanen IgG1 an die murine Fv-Region des Antikörpers angehängen. Daraus resultiert der monoklonale Antikörper IMC-C225, der auch als Cetuximab/ErbituxTM bezeichnet wird. Cetuximab inhibiert sogar effektiver das Tumorzellwachstum etablierter Xenotransplantat-Modelle als sein Vorgänger M225 [109].

1.5.1 Mechanismus der Bindung von Cetuximab an EGFR

Mit Hilfe von Antigen-bindenden Fragmentes des monoklonalen Antikörpers, den sogenannten Fab-Fragmenten, wurde gezeigt, dass Cetuximab ausschließlich an die L2-Subdomäne (auch als Subdomäne III bezeichnet) der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors bindet (Abb.3). Sowohl die leichte als auch die schwere Kette

des Cetuximab beteiligen sich an der Interaktion mit der L2-Subdomäne. Zudem lagert sich Cetuximab nur dann an den Rezeptor an, wenn er in der angebundene Konformation vorliegt [12]. Etwa 95 % der EGF-Rezeptoren liegen in dieser Konformation vor (Abb.1). Nur etwa 5 % der EGF-Rezeptoren liegen in der ungebundenen Form vor, bei der die Liganden an den Rezeptor binden können, um ihn zu aktivieren. Somit sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass der Rezeptor bei gleichzeitiger Anwesenheit von Cetuximab vom Liganden aktiviert werden kann, sehr stark [7]. Zudem weist die Bindung von Cetuximab an EGFR eine 50fach höhere Affinität auf als die Interaktion des Liganden EGF mit EGFR. Das liegt zum Teil daran, dass im Vergleich zu EGF, Cetuximab ein größeres Areal der L2-Subdomäne des EGFR bedeckt. Zudem ist die ausgebildete Grenzfläche polarer und es bilden sich doppelt so viele Wasserstoffbrückenbindungen aus. Bindung von Cetuximab an den Rezeptor führt weder zur Strukturänderung des Antikörpers noch der L2-Subdomäne des EGFR. Somit verhindert Cetuximab die Überführung der extrazellulären Domäne des EGFR von der angebundene in die ungebundene Konformation und die Ligandenbindung mit anschließender Rezeptoraktivierung kann nicht mehr erfolgen [12].

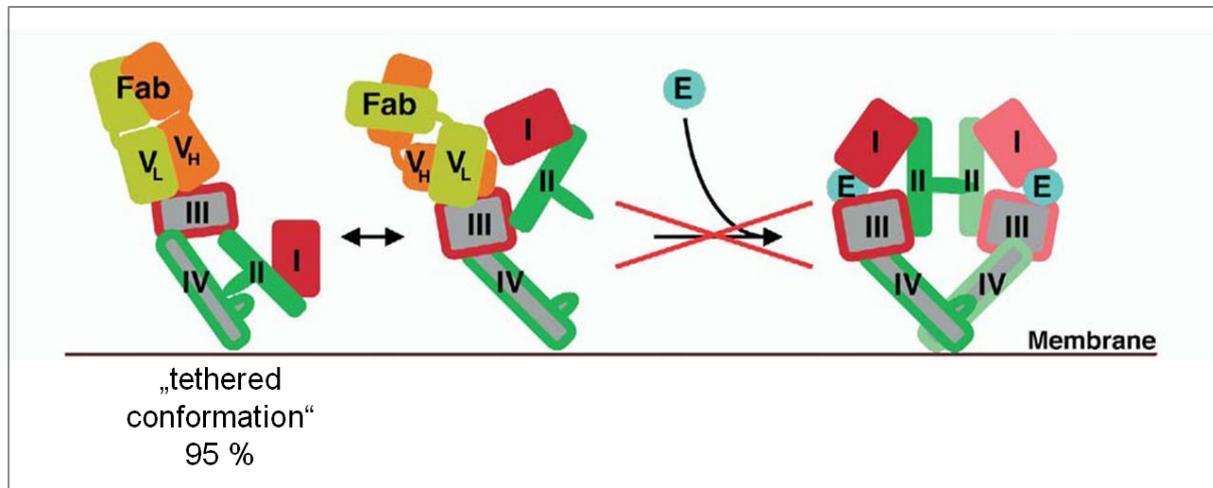


Abb. 3: Cetuximab hemmt liganden-induzierte Dimerisierung des EGFR

Dargestellt ist das Fab-Fragment (FabC225; gelb/orange) des Cetuximab und die Subdomänen der extrazellulären Domäne des EGFR (rot/grün). Die Bindung des Fab-Fragments erfolgt an die L2-Subdomäne des EGFR und verhindert somit die Anlagerung EGF-spezifischer Liganden. Zudem hemmt das gebundene Fab-Fragment die Überführung der extrazellulären Domäne des EGFR von der gebundenen in die ungebundene Konformation. Nähere Erläuterung im Text (aus [12]).

1.5.2 Auswirkungen der Cetuximab-Bindung

Der primäre Mechanismus, der die Aktivierung von EGFR verhindert, ist die direkte Interaktion von Cetuximab mit EGFR. Die Bindung von Cetuximab an den Rezeptor verhindert die Liganden-induzierte Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase und dementsprechend auch die Autophosphorylierung der spezifischen Tyrosinreste [110]. Somit verhindert der monoklonale Antikörper die Aktivierung bestimmter Signalkaskaden, die für die Regulation zellulärer Prozesse wie der Zellzyklusprogression, der Zellmigration und dem Zellüberleben entscheidend sind. Zudem führt die Bindung von Cetuximab an den EGF-Rezeptor zu dessen Internalisierung [104,111]. Im Endosom wird die Bindung des EGFR an den Liganden EGF bei einem pH-Wert von 5 aufgelöst. Jedoch ist die Bindung zwischen Cetuximab und EGFR bei einem pH-Wert von 7 bis 5 unverändert. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass Cetuximab im Endosom vom Rezeptor abdissoziiert und somit kann der Komplex zur lysosomalen Degradation geleitet werden [12]. Der lysosomale Abbau führt also zusätzlich zur Abnahme der Anzahl an EGF-Rezeptoren. Das Fehlen des EGFR resultiert wiederum im Zelltod, der durch Apoptose ausgelöst wird [104,111]. In vielen EGFR-abhängigen Krebsarten hemmt Cetuximab folglich das Zellwachstum, die Angiogenese, die Zellinvasion und die Bildung von Metastasen. Cetuximab bindet ebenfalls an die Tumor-spezifische Isoform EGFRvIII und führt zu ihrer Internalisierung. Jedoch ist der Wirkungsmechanismus von Cetuximab in EGFRvIII exprimierenden Zellen noch nicht eindeutig aufgeklärt [112].

Zusätzlich spielen die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*ADCC = antibody dependent cellular cytotoxicity*) und die Komplement-abhängige Zytotoxizität (*CDC = Complement dependent cytotoxicity*) eine wichtige Rolle, da sie ebenfalls zur Zellyse führen können. ADCC tritt auf, wenn der Antikörper an das Antigen auf der Tumorzelle bindet und die Fc-Domäne des Antikörpers den Fc-Rezeptor (FcR) auf der Oberfläche der Immuneffektorzelle aktiviert [113]. Dies leitet die Zellauflösung durch natürliche Killerzellen oder Phagozytose durch Makrophagen ein [114]. Obwohl viele monoklonale Antikörper ADCC *in vitro* vermitteln, konnte dieser Mechanismus *in vivo* noch nicht eindeutig nachgewiesen werden [113,115]. Bei der Komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC) legt die Bildung der Antikörper-Antigen-Komplexe Bindestellen für Proteine frei, die die Komplement-Kaskade initiieren. Dies triggert die Freilassung chemotaktischer Faktoren, die zur Bildung eines Membran-

Angriffskomplexes (MAC) und letztendlich ebenfalls zur Zellyse führen [113]. Jedoch fällt die Cetuximab vermittelte Komplement-abhängige Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* eher mild aus und führt nicht zur Zellyse [111,115]. Somit besteht der hauptsächlichste Wirkungsmechanismus von Cetuximab aus der effektiven Unterbrechung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion [116].

1.5.3 Die Verwendung von Cetuximab in der Klinik

Cetuximab war der erste Antikörper der im Jahre 2004 von der FDA und der EMEA (European Medicines Agency) für Patienten zugelassen wurde, die an fortgeschrittenem, EGFR-exprimierendem kolorektalem Karzinom leiden. Dies war das Ergebnis einer randomisierten Phase II Studie (BOND-Studie), die an 329 Patienten durchgeführt wurde. Dabei wurde Cetuximab alleine oder in Kombination mit Irinotecan (CPT-11), einem Zytostatika aus der Gruppe der Topoisomerase-Hemmer, verabreicht. Patienten, die sowohl mit Cetuximab als auch mit Irinotecan behandelt wurden, wiesen eine höhere Antwortrate (response rate), eine höhere Erkrankungs-Kontrollrate (disease control rate) und eine längere Zeit bis zur Tumorprogression auf [117]. Seitdem wurden viele Studien mit Cetuximab als Monotherapie oder in Kombination mit verschiedenen Zytostatika, Tyrosinkinase-Inhibitoren oder Bestrahlung an vielen unterschiedlichen Tumorerkrankungen durchgeführt, wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom oder Kopf- und Halstumoren [103,118,119,120,121]. Zudem wurde eine Cetuximab-Therapie an Patienten mit höhergradigen Gliomen getestet [122].

1.5.4 Die Nebenwirkungen einer Cetuximab-Therapie

Eine Verabreichung von Cetuximab kann für den Patienten unangenehme Nebenwirkungen haben. Als die häufigste Nebenwirkung der Cetuximab-Therapie treten verschiedene Dermatotoxizitäten auf, wahrscheinlich als Ergebnis der Hemmung der EGFR-Signalisierung im epidermalen Gewebe. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Dermatotoxizität mit einem klinischen Benefit der Therapie einhergeht und fungiert somit als Marker für die klinische Wirksamkeit. Als zusätzliche Nebenwirkungen kann die Verwendung von Cetuximab zu einer schweren Asthenie, Erschöpfungserscheinungen oder zu einer Elektrolytstörung führen, in der ein unnormal niedriges Niveau von Magnesium im Blut auftritt. Trotz Vorbehandlung mit einem Antihistaminikum treten bei einigen

Cetuximab-behandelten Patienten sogar schwerwiegende Antikörper-abhängige Infusionsreaktionen auf [123].

Die gezielte Behandlung EGFR-exprimierender Tumoren resultiert häufig in der Entwicklung von Resistenzen, die durch unterschiedliche Mechanismen erworben werden können. Diese erworbenen Resistenzen können aufgrund einer erhöhten Expressierung zellulärer Efflux-Pumpen, Mutationen von therapeutischen Targets, veränderter Expression von Genen, die in apoptotische Signalwege involviert sind oder aufgrund einer erhöhten Aktivität von DNA-Reparaturmechanismen entstehen [124,125,126,127,128]. Kürzlich wurde die Kras-Mutation als geeigneter negativer prädiktiver Biomarker gefunden, der zu einer Therapieresistenz führt [129,130]. Diese Mutation wurde etwa in 40 % der Dickdarmkarzinome gefunden und führt zu einer Daueraktivierung des Kras-Proteins [131,132]. Als Resultat kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege wie z.B. von Erk1/2 und führt u.a. zum Zellwachstum. Dieser Signalweg kann folglich nicht mehr durch die Aktivität des EGFR reguliert werden, der wiederum durch die Anwesenheit externer Stimuli gesteuert wird. Somit ist trotz einer Hemmung des EGF-Rezeptors durch Zugabe von Cetuximab die Therapie ineffektiv, was inzwischen in zahlreichen Studien gezeigt wurde [133]. Jedoch auch bei einem Dickdarmkarzinom mit einem Kras-Wildtyp sprechen nur etwa 60 % der Patienten auf die Anti-EGFR-Antikörpertherapie an. Somit werden weitere prädiktive Biomarker gesucht, die in einer Therapieresistenz resultieren.

1.6 Die Zielsetzung

Der EGF-Rezeptor ist ein Mitglied der Rezeptortyrosinkinase-Familie und steuert die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen und des Zellüberlebens in Zellen die vorwiegend epithelialen Ursprungs sind [84,85]. Die Überexpression des EGF-Rezeptors oder durch Mutationen entstandene Deletionsmutanten, wie die konstitutiv aktive EGFRvIII-Isoform spielen eine wichtige Rolle im Wachstum und Überleben von Tumorzellen, da sie zur Steigerung der Zellzyklusrate und der Angiogenese, Hemmung der Apoptose, Motilität der Tumorzellen und Metastasierung führen [59,60,134,135]. Es wurden einige Strategien entwickelt, die die Aktivierung des EGF-Rezeptors blockieren oder dessen Expressierung herunter regulieren, um Proliferation der Tumorzellen zu inhibieren und allgemein einen besseren klinischen Erfolg zu erreichen [97]. Die EGFRvIII-Deletionsmutante wird ausschließlich in

Tumorzellen exprimiert und folglich ist in EGFRvIII-exprimierende Tumoren eine zielgerichtete Therapie sinnvoll. Der monoklonale Antikörper Cetuximab (IMC-C225, ErbituxTM) bindet sowohl den EGF-Rezeptor als auch EGFRvIII [109,136]. Seit dem Jahr 2004 wird Cetuximab zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen als Monotherapie oder in Kombination mit verschiedenen Zytostatika, Tyrosinkinase-Inhibitoren oder Bestrahlung verwendet [103,118,119,120,121,137]. Die Wirksamkeit von Cetuximab kann jedoch stark beeinträchtigt sein, wenn es im Tumorgewebe zur Entwicklung von Resistenzen kommt [138]. Diese erworbenen Resistenzen können beispielsweise durch eine Mutation des Zielproteins, eine veränderte Expression des Zielproteins oder eines anderen Proteins entstehen. Sie führen dazu, dass die Cetuximab-Therapie ineffektiv ist [138].

So war es ein Ziel dieser Arbeit die Wirksamkeit von Cetuximab auf die tumorspezifische Isoform EGFRvIII und die Überexpression des wildtypischen Rezeptors EGFR in einem Zellkulturmodell zu untersuchen. Dazu sollte der Einfluss von Cetuximab auf die Signaltransduktion der beiden Rezeptorformen und das Überleben der EGFRvIII- bzw. EGFR-exprimierenden Zellen näher charakterisiert werden.

Zudem war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit die nähere Charakterisierung der vorhandenen Cetuximab-Resistenz in den EGFRvIII- und EGFR-exprimierenden Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Laborchemikalien wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Schweden), Bio-Rad (München), Gibco (Detroit), KPL (Maryland), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Oregon), Pierce (Rockford), Roche (Grenzach), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) in höchster Qualitätsstufe bezogen. Chemikalien und Reagenzien weiterer Hersteller sind bei den entsprechenden Methoden ausgewiesen.

Der monoklonale Antikörper Cetuximab/Erbitux wurde von der Firma Merck geliefert und der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib/Tarceva von der Firma Roche.

2.1.2 Geräte

Gerät	Firma
Analysewaage BP 121 S	Sartorius
Brutschrank (Zellkultur)	Sanyo
Cleanbench	Heraeus
Durchflusszytometer BD FACSCanto TM II mit DB FACSDiva Software	BD Pharmingen
Heizplatte	Heidolph
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Mikroplate-Reader Benchmark	Bio-Rad
Mikroplate-Reader FIUOstar OPTIMA	BMG Labtech
Mikroskop Axiovert 200 M mit AxioVision Rel 4.6 Software	Carl Zeiss
Mikroskop-Zubehör: ApoTome	Carl Zeiss
PAA Gelelektrophorese-System SE260 Mighty Small II	Hofer
pH-Meter pH211	Hanna instruments
Pipetten	Eppendorf, Greiner
Power Supply	Amersham Biosciences
Präzisionswaage CP2202S-OCE	Sartorius
Rotor-Gene 6000	Corbett /Qiagen
Röntgenfilmentwickler OPTIMAX	PROTEC medical system

Gerät	Firma
Rührer	Heidolph
Schüttler	Heidolph, Sarstedt
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Ultrazentrifuge	Kendro
Vortex	Janke & Kundel
Wasserbäder	Gibco, Sigma
Western Blot System TE22 Mini Tank Transfer Unit	Amersham Biosciences

2.1.3 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
NR6	Adhärent wachsende Zelllinie aus Fibroblasten der Maus, stellt eine Variante der Zelllinie Swiss-3T3, enthält kein funktionsfähiges EGFR mehr	[139]
NR6M	Adhärent wachsendes Derivat der Zelllinie NR6, die mit Expressionsvektor pH β AP-1, das humane EGFRvIII trägt stabil transfiziert wurden	[140]
NR6W	Adhärent wachsendes Derivat der Zelllinie NR6, die mit Expressionsvektor pH β AP-1, das humane EGFR trägt stabil transfiziert wurden	[140]
A431	Adhärent wachsende humane, epidermoide Karzinom-Zelllinie	[141]
wtU87MG	Adhärent wachsende humane Glioblastom-Zelllinie, das stabil mit einem humanen EGFR-tragendem Plasmid transfiziert wurde	[142]

2.1.4 Medien und Lösungen zur Zellkultivierung

Lösung	Firma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma Aldrich
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma Aldrich
Fötale Kälberserum (FBS)	Biowest
L-Glutamin 200 mM, flüssig	Gibco

Lösung	Firma
Minimal Essential Medium (MEM)	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma Aldrich
Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL)	Sigma Aldrich

2.1.5 Kits und Marker

2.1.5.1 Kits

Kit	Firma
Comet Assay	Cell Biolabs Inc.
DC-Protein Assay Kit	Bio-Rad

2.1.5.2 Marker

Proteinmolekulargewichtsmarker

Precision Plus Protein Standards Dual Color: (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 25, 20, 15, 10 kDa)	Bio-Rad
Precision Plus Protein Standards All Blue: (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 25, 20, 15, 10 kDa)	Bio-Rad

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Antikörper für die Immunofluoreszenz

Primärantikörper

Antikörper	Firma
Rabbit anti-EGFR/EGFRvIII	Santa Cruz und Cell Signaling Technology (CST)
Human anti-EGFR	Merck
Rabbit anti-Eme1	Abcam
Mouse anti-Tim23	BD Biosciences Pharmingen
Mouse anti-BrdU	BD Biosciences Pharmingen

Sekundärantikörper

Antikörper	Firma
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 555 goat-anti-rabbit IgG	Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat-anti-human IgG	Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit IgG	Molecular Probes/Invitrogen

Fluoreszierende Tracer

Tracer	Firma
Hoechst 33342	Sigma

2.1.6.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Abteilung
425(scFv)SNAP-Alexa 647	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. Barth Aus dem Fraunhofer-Institut für Molekular- Biologie und angewandte Ökologie

2.1.6.3 Antikörper für den Westernblot**Primärantikörper**

Antikörper	Firma
Mouse anti-Phospho-Akt	CST
Rabbit anti-Akt (PKB)	CST
Rabbit anti-Phospho-p44/42 MAP- Kinase (Phospho Erk)	CST
Rabbit anti-p44/42 MAP-Kinase	CST
Rabbit anti-Phospho-STAT3	CST
Rabbit anti-STAT3	CST
Mouse anti- α -Tubulin	CST
Rabbit anti-Phospho-EGFR	CST
Mouse anti-Phospho-EGFR	CST
Mouse/rabbit anti-EGFR	Santa Cruz/CST
Rabbit anti-Eme1	Abcam
Rabbit anti-Bcl _{XL}	CST
Rabbit anti-Bcl2	CST

Antikörper	Firma
Rabbit anti-Ubiquitin	Santa Cruz
Rabbit anti-Phospho-ATR	CST
Mouse anti-Phospho-ATM	CST
Rabbit anti-Phospho-Chk1	CST
Rabbit anti-Phospho-Chk2	CST
Mouse anti-Phospho-p53	CST
Rabbit anti-Phospho-Histone-H2AX	CST
Rabbit anti-Phospho-BRCA1	CST
Rabbit anti-Phospho-Cyclin D1	CST
Rabbit anti-Cyclin D1	CST
Mouse anti-Tim23	BD Biosciences Pharmingen

Sekundärantikörper

Antikörper	Firma
Goat Anti-rabbit HRP-conjugated IgG	Pierce
Goat Anti-mouse HRP-conjugated IgG	Pierce

2.1.7 Sonstige Materialien

Röntgenfilme: CL-X Posure Films (Clear Blue X-Ray Film) von Pierce, Nitrozellulose-Membran: Protran von Schleicher und Schvell, PVDF-Membranen von Millipore

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die sterile Kultivierung der Zelllinien war es notwendig, alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchzuführen. Durch sorgfältiges Reinigen der Arbeitsflächen und Werkzeuge mit 70 % Ethanol wurde einer eventuellen Kontamination durch Bakterien und Pilze vorgebeugt. Alle verwendeten Materialien wurden durch Autoklavieren für 20 min bei 120 °C sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden steril filtriert.

2.2.1.1 Subkultivierung der Zellen

Die adhärenenten Zellen wuchsen in Medium supplimentiert mit 10 % FBS in einem Inkubator bei gesättigter Wasserdampf- Atmosphäre, 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37 °C.

Zur Anzucht der NR6-, NR6W-, NR6M- und A431-Zellen wurde DMEM mit 10 % FBS verwendet. Die Kultivierung von wtU87MG-Zellen erfolgte hingegen in MEM mit 10 % FBS, 1 mM Natriumpyruvat und 2 mM L-Glutamin. Um den Selektionsdruck bei stabil transfizierten Zellen aufrechtzuerhalten, wurde zusätzlich 400 µg/ml G418 als Supplement verwendet.

Die 100 mm x 20 mm großen Zellkulturschalen wurden von den Firmen Sarstedt geliefert. Für jede Zellkulturschale waren 10 ml Medium erforderlich. Die 6-Well-Platten der Firma Becton Dickinson benötigten 3 ml Medium pro Well, die 24-Well-Platten derselben Firma benötigten 1 ml DMEM/FBS pro Well. Mediumwechsel war alle 2 bis 3 Tage notwendig. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurde dieses durch frisches, bei 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt.

2.2.1.2 Anzucht von primären Tumorzellen des Glioblastoms

Um ein zweidimensionales Zellkultur-Modell aus Patientenmaterial zu gewinnen, wurde zunächst das frische postoperative Tumorgewebe in 10 ml eines DMEM-Trypsin-Gemisches (im Verhältnis 1:1) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus dem Zellverband gelöst. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer 10 ml-Pipette, später einer 5 ml-Pippette das im DMEM/Trypsin vorhandene Tumorgewebe auf und ab pipettiert. Die durch das Pipettieren entstehenden Scherkräfte führen dazu, dass das leicht angedaute Gewebe auseinander gerissen wird. Die Zellen können auf diese Art vereinzelt werden. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen, die Zellen wurden auf PLL-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät und im DMEM/FBS inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

2.2.1.3 Passagieren der Zellen

Bei einer 80 % bis 90 % konfluenten Zellkulturschale wurde das Medium abgesaugt und vorgewärmtes Trypsin-EDTA (4 ml, wenn die Zellen 1:4 gesplittet werden sollten) wurde zu den Zellen pipettiert. Die Zellkulturschalen wurden einige Zeit geschwenkt und die Zellen vom Grund der Platte durch Auf- und Abpipettieren

gelöst. Neuen Zellkulturschalen wurden jeweils 10 ml frisches DMEM/FBS oder MEM/FBS zugegeben und anschließend jeweils 1 ml der Zellsuspension.

2.2.1.4 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell im 37 °C warmen Wasserbad knapp über den Gefrierpunkt erwärmt und in mit 40 ml Medium gefüllte Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden dann 10 min bei 1250 rpm zentrifugiert, um das zytotoxische DMSO zu verdünnen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 90 % Medium mit FBS aufgenommen und in Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.1.5 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese adhärent wachsenden Zellen zunächst mit Hilfe von Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und dann bei 1250 rpm 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden in Einfriermedium (90 % FBS, 10 % DMSO) resuspendiert und in 1,3 ml-Portionen in Kryoröhrchen pipettiert. Die Konzentration betrug $1-5 \times 10^7$ Zellen pro ml Einfriermedium. Die Kryoröhrchen wurden in spezielle mit Isopropanol gefüllte Einfrierboxen in einen Tiefkühlschrank (-80 °C) gestellt, was eine optimale Absenkung der Temperatur um 1 °C pro Stunde gewährleistete. Für eine Konservierung der Klone über längere Zeit wurden die Röhrchen nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

2.2.1.6 Beschichtung mit Poly-L-Lysin (PLL)

Poly-L-Lysin ist ein synthetisches Molekül, welches das Anhaften verschiedener Zelltypen an Polystyrol-Oberflächen von Zellkulturmaterialien verbessert. Das negativ geladene, physikalisch behandelte Polystyrol erlangt durch Beschichtung mit Poly-L-Lysin eine positive Ladung an der Oberfläche, wodurch sich viele Zelltypen besser an diese anheften können. Insbesondere bei Verwendung von Serum-freiem oder -armen Medium oder auch bei Versuchsdurchführungen konnte so die Kultivierungseffizienz gesteigert werden.

Für die Beschichtung mit PLL wurden 100 mm x 20 mm große Zellkulturschalen der Firma Sarstedt verwendet, 6-Well-Platten und 24-Well-Platten der Firma Becton Dickinson. Den 24-Well-Platten wurden je nach Versuchsaufbau vorher 12 mm Deckgläschen der Firma Marlenfeld eingesetzt. Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht von 65000 der Firma Sigma wurde als 0,001 %ige Lösung in

destilliertem Wasser hergestellt, steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Pro cm² Zellkulturschale oder Well-Platte wurde 0,5 ml der PLL-Lösung verwendet und für 30 min in den Inkubator gestellt. Dann wurde die PLL-Lösung abgesaugt und die Zellkulturplatte dreimal mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend konnten die Zellen ausgesät werden.

2.2.1.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden wie beim Passagieren mit 4 ml Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und mit DMEM/FBS oder MEM/FBS in einem 15 ml Röhrchen auf 10 ml aufgefüllt. Davon wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und die Zellen wurden mit Hilfe eines Mikroskops bei einer 10-fachen Vergrößerung ausgezählt.

Die Zellzahl eines Quadranten (16 kleine Quadrate) wurde mit 10⁴ multipliziert und das ergab die Zellzahl pro Milliliter.

2.2.1.8 Transfektion

Mit Hilfe der Transfektion werden exogene Nukleinsäuren in eine eukaryotische Zelle eingebracht. In dieser Arbeit wurde mittels der kommerziell erworbenen Reagenzien Lipofectamin 2000 (Invitrogen) und HiPerFect (Qiagen) die Transfektion mit kationischen und neutralen Lipiden durchgeführt.

2.2.1.8.1 Transfektion von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Liposomen in die A431-Zellen eingebracht. Liposomen sind kationische Lipidkomplexe, die aufgrund positiv geladener Kopfgruppen mit negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückrats interagieren und zur Bildung von DNA-Lipidkomplexen (Lipoplexe) führen. Diese Komplexe verschmelzen mit der Zellmembran. Auf diesem Wege wird DNA in die Zelle eingeschleust. Für die sogenannte Lipofektion wurde das kommerzielle Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 verwendet. Jede Transfektion wurde im reduzierten Serummedium, dem sogenannten Opti-MEM (Invitrogen) angesetzt. Opti-MEM stellt eine Variante des MEM-Mediums dar, das mit HEPES und Natriumbicarbonat gepuffert wurde und mit Hypoxanthin, Thymidin, Natriumpyruvat, L-Glutamin und Wachstumsfaktoren supplimentiert wurde.

Die A431-Zellen wurden in 35 mm Zellkulturschalen ausgesiedelt. Am darauffolgenden Tag wurde das serumhaltige Medium gegen 2 ml serumfreies

Medium ausgetauscht. Für jede Transfektion wurde 1 µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 100 µl Opti-MEM aufgenommen. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 2 µl Lipofectamin 2000 ebenfalls in einem Volumen von 100 µl Opti-MEM aufgenommen und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze vermischt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In jede zu transfizierende 35 mm Zellkulturschale wurden 200 µl des Transfektionsgemisches gegeben und für 6 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen frisches serumhaltiges Medium ausgetauscht und weitere 24 h inkubiert.

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pCMV6-XL5 mit dem Homo sapiens essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 -Insert der Firma Origene verwendet.

2.2.1.8.2 Transfektion von siRNA

Die *small interfering RNAs* (siRNA) werden zur Unterdrückung der Genexpression verwendet, da sie Ziel-RNA sequenzspezifisch erkennen und abbauen können. Diese posttranskriptionale Unterdrückung der Genexpression mittels RNA-Interferenz wurde erstmals 1998 in der Nematoden *C. elegans* beschrieben [143].

Zunächst wurden die A431-Zellen in einer 24-Loch-Platte oder einer 35 mm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das serumhaltige Medium gegen 1 ml (24-Loch-Schale) oder 2 ml (35 mm Schale) serumfreies Medium ausgetauscht. Um die Transfektion in einer 24-Loch-Schale durchzuführen, wurden zunächst 5 µl HiPerFect (Qiagen) und 1µg der siRNA (OriGene) zu 100 µl OptiMEM pipettiert. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich wurden jeweils 100 µl des Transfektionsgemisches pipettiert. Zur Durchführung der Transfektion in einer 35 mm Zellkulturschale wurden 12 µl HiPerFect und 2 µg der siRNA zu 200 µl Opti-MEM gegeben. Nach einer 6-stündigen Inkubation der Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Transfektionsmedium gegen neues serumhaltiges Medium ausgetauscht. Es folgte eine weitere Inkubation der Zellen für 48 h.

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten siRNAs der Firma Thermo Scientific/Dharmacon aufgeführt:

siRNA	Reprimiertes Gen
siEme1 (siGENOME SMART Pool; beinhaltet einen Mix aus vier konstruierten siRNAs, die auf das Eme1-Gen zielen)	humanes Eme1
siC (siGENOME Non-Targeting siRNA Pool)	Nicht spezifische siRNA

2.2.1.9 Behandlung der Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit frischem Medium, das 0,1 % BSA (DMEM/BSA) beinhaltet, gewaschen. Anschließend wurden sie für jeweils 2 h mit DMEM/BSA vorinkubiert. Erst dann wurden jeweils 100 ng/ml EGF dazu pipettiert.

2.2.1.10 Durchflusszytometrie (FACS)

Ablösepuffer:	1 x	Accutase (PAA)
FACS-Puffer:	1 x	PBS, pH 7,4 mit 0,5 mM MgCl ₂ und 0,9 mM CaCl ₂
	5 %	FBS
Versuchspuffer:	10 mM	HEPES
	140 mM	NaCl
	2,5 mM	CaCl ₂
		pH 7,4

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) genannt, ermöglicht eine quantitative Analyse von Zellen, unter anderem in Bezug auf ihre Fluoreszenz, in einem zerstäubten Flüssigkeitsstrom. In dieser Arbeit wurde diese Methode zur Untersuchung der Anzahl der EGFR/EGFRvIII-Rezeptoren auf der Zelloberfläche verwendet. Für die Analyse wurden Zellen zunächst auf 10 cm-Schalen ausgesät und in DMEM/FBS über Nacht inkubiert. Die Zellen sanken auf den Boden der Platte und wurden adhärent. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen für jeweils 2 h mit DMEM/BSA vorinkubiert und anschließend mit Cetuximab (100 µg/ml) oder EGF (100 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen auch

unbehandelt gelassen. Zum Zeitpunkt der Auswertung wurden die Zellen auf Eis transferiert, 1 x mit PBS gewaschen, mit kalter Accutase abgelöst und in FACS-Puffer überführt. Die Suspension wurde für 10 min bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Zur Untersuchung der Rezeptoranzahl auf der Zelloberfläche wurden die Zellen im Versuchspuffer für 30 min auf Eis mit dem 425(scFv)SNAP Alexa 647-Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet sowohl an die extrazelluläre Domäne von EGFR als auch von EGFRvIII [144,145]. Nach erfolgreicher Bindung des Antikörpers an EGFR oder EGFRvIII wurde bei 10.000 Zellen die Anzahl der Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche vorhanden sind, druchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der WinMDI 2.9 Software. Für die statistische Analyse wurden die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) verwendet.

2.2.1.11 Ermittlung der Zellzahl

Um den Einfluss von Cetuximab auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurde am Versuchsende die Gesamtzellzahl ermittelt. Bei dieser Methode wurden die Zellen in einer geringen Anzahl in speziellen Zellkulturschalen ausgesät, die mit einem definierten Gittermuster versehen sind. Dieses Gitter teilt die Schale in 4 mm² große Quadrate mit einer Größe von 2 mm x 2 mm (+/- 0,15 mm). Am nächsten Tag wurde in zufällig ausgewählten Quadranten die Zellanzahl bestimmt. Danach erfolgte die Zugabe von Cetuximab (50 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml). Nach einer dreitägigen Inkubation der Zellen in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab wurde wieder in den gleichen Quadranten die Zellzahl bestimmt. Zur quantitativen Ermittlung der Zellzahl wurde die Anzahl der Zellen, die nach 72 h gezählt wurde, als 100 % angenommen.

2.2.1.12 AlamarBlue-Assay

Eine Möglichkeit, die Gesundheit von Zellen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, ist die Messung der mitochondrialen Aktivität lebender Zellen. Das selbst nicht toxische AlamarBlue (Invitrogen) kann dafür verwendet werden. AlamarBlue enthält den nicht fluoreszenten Farbstoff Resazurin, der durch die Aktivität mitochondrialer Enzyme zum stark fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird [146].

Um die Auswirkung von Cetuximab auf die metabolische Zellaktivität zu untersuchen, wurden die Zellen in 24-Loch-Schalen mit 10.000 Zellen pro Loch ausgesät und über

Nacht im serumhaltigen Medium inkubiert. Am folgenden Tag wurden 10% alamarBlue direkt im Zellkulturmedium verdünnt. Nach einer 2,5-stündigen Inkubation im Brutschrank wurde das alamarBlue-haltige Medium abgenommen und in einer Doppelbestimmung wurde die Intensität der Fluoreszenz (Anregung bei 570 nm und Emission bei 610 nm) gemessen. Zu den Zellen wurde direkt nach Abnahme des alten Mediums neues serumhaltiges Medium hinzugegeben. Daraufhin wurden unterschiedliche Konzentrationen an Cetuximab (50 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml) zu den Zellen gegeben oder sie wurden unbehandelt belassen. Drei Tage nach der Zugabe von Cetuximab wurden jeweils wieder 10 % alamarBlue direkt ins Medium hinzugegeben, nach 2,5 Stunden wieder abgenommen und eine Doppelbestimmung wurde durchgeführt.

2.2.2 Genetische und molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung

Die RNA-Isolierung wurde mittels des RNease Mini-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellysate wurden mit Hilfe der QIAShredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Um eine Kontamination der RNA mit DNA auszuschließen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde das RNase freie DNase Set (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde am Photometer Biophotometer (Eppendorf) durchgeführt. Dazu wurde die RNA mit DEPC-Wasser 1:50 verdünnt. Die Messung erfolgte bei 260 nm, wobei $OD_{260} = 1$ einer RNA Konzentration von 40 ng/µl entspricht. Zusätzlich wurde eine Messung bei 280 nm durchgeführt. Der Quotient aus der gemessenen OD bei der Wellenlänge von 260 nm und 280 nm zeigt grundsätzlich eventuelle Proteinverunreinigungen der RNA an. Der Quotient der verwendeten RNA lag zwischen 1,7 und 2,0.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Mittels der Reversen Transkription wird aus der isolierten RNA cDNA synthetisiert. Dazu wurde das Reverse Transcription System laut Herstellerangaben (Promega) verwendet.

Dabei hybridisieren kurze DNA-Hexanucleotide jeder möglichen Sequenzreihenfolge (*random-Primer*) mit der RNA, welche in einem zweiten Reaktionsschritt durch die

Reverse Transkriptase mittels dNTPs entlang der Matrize in 5' -> 3'-Richtung zu einer cDNA verlängert werden.

Für einen einfachen Ansatz der Reversen Transkription wurden eingesetzt:

<u>Ansatz:</u>	4,0 µl	MgCl ₂ , 25 mM
	2,0 µl	Reverse Transcription 10x Buffer
	2,0 µl	dNTP Mix, 10 mM
	0,5 µl	Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor
	1,0 µl	AMV Reverse Transcriptase
	0,5 µg	Random Primers
	2,0 µl	1,2kb Kanamycin Positive Control RNA
	1,0 µg	RNA, linealisiert bei 70 °C für 10 min
		mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl auffüllen

Eine RT-PCR verlief wie folgt:

<u>Reaktion:</u>	1.	10 min	RT
	2.	15 min	42 °C
	3.	5 min	95 °C
	4.	5 min	4 °C

2.2.2.3 Real-time-PCR

Mittels der Real-Time-PCR kann kontinuierlich über die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes die Menge an Produkt bestimmt werden. Die Messung erfolgt am Ende eines jeden PCR-Zyklus bei einer Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Amplifikate. Dadurch wird erreicht, daß nur das doppelsträngig vorliegende Produkt ein Fluoreszenzsignal aussendet. Durch die Bestimmung eines bestimmten Grenzwertes korrelieren die gemessenen Werte direct mit der Menge an cDNA in der Reaktion. Dieser Wert wird auch als Ct-Wert (Threshold-Value) definiert. Über eine Standard-Kurve ist es mögliche, aus dem Ct-Wert Aussagen über die in der Probe vorliegende Menge an Matrizen-cDNA (z.B. mRNA eines bestimmten Gens) der Reaktion zu treffen. Daraufhin können vergleichende Genexpressionsanalysen durchgeführt werden. Zusätzlich wurde der Ct-Wert des zu untersuchenden Gens (gene of interest; GOI) mit dem Ct-Wert von

einem sogenannten „house-keeping“ Gen, einem konstitutiv exprimierten Gen, normalisiert. Bei dem „gene of interest“ handelte es sich um das humane Eme1 (Primer: QuantiTect Primer Assay der Firma Qiagen). Als „house-keeping“ Gen wurde die humane β -Glucuronidase verwendet (Vorwärtsprimer: 5'-CTCATTGGAA TTTTGCCGATT-3'; Rückwärtsprimer: 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA-3'). In der vorliegenden Arbeit wurde die Real-Time-PCR mit dem Rotorgene 6000- (Corbett/Qiagen) durchgeführt. Als PCR-Mastermix wurde das SensiMixTM Plus SYBR Kit der Firma Quantace verwendet.

Typischerweise wurde ein Reaktionsansatz wie folgt zusammengestellt:

Ansatz:

5 μ l	Mastermix
2 μ l	cDNA
1 μ l	Primer-Mix (Vorwärts und Rückwärts Primer; QuantiTect Primer Assay 1:4 in TE pH 8,0; individuell bestellt Oligonukleotide: 100 nM, 1:40 verdünnt)
2 μ l	RNAse freies Wasser

Üblicherweise verlief eine Real-time PCR wie folgt:

Reaktion:

10 min	95 °C
40 Zyklen:	15 sec 95 °C
	15 sec 60 °C
	30 sec 72 °C
	Fluoreszenzmessung (bei jedem Zyklus)
	Schmelzkurve: 60°C-95°C in 0,5°C-Schritten, alle 5 sec ein Schritt

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Rotorgene-Software (Vers. 4.6).

2.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz

2.2.3.1 Fluoreszenzfärbung

Paraformaldehyd-Lösung	100 ml	PBS
pH 7,4	4 % (w/v)	Paraformaldehyd

Antikörper-Puffer	200 ml	dest. H ₂ O
pH 7,4	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris Base
	2 % (w/v)	BSA
	3,6 % (w/v)	L-Lysin
ABS	9 ml	Antikörper-Puffer
(Antikörper-Lösung mit Serum)	1 ml	Goat Serum
	0,1 %	Triton X-100

Die Immunofluoreszenz diente dazu, bestimmte Zellstrukturen und Proteine mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und die Lokalisierungen dieser Proteine unter einem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe eines Apotoms auszuwerten.

Auf eine PLL-beschichtete 24-Loch-Platte mit eingesetzten 12 mm großen Deckgläschen wurden pro Well 10.000 Zellen ausgesät und in 1 ml serumhaltigem Medium über Nacht inkubiert. In dieser Zeit sanken die Zellen auf die Deckgläschen, die sich auf dem Boden der Platte befanden und wurden adhärent. Am folgenden Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen einmal mit je 1 ml DMEM/FBS gewaschen und 500 µl DMEM/BSA wurden zu den Zellen gegeben. Diese wurden 2 h in DMEM/BSA inkubiert und es folgte die Zugabe von jeweils 100 ng/ml EGF oder 100 µg/ml Cetuximab zu den DMEM/BSA enthaltenden Wells. Die Inkubationsdauer mit EGF betrug 10 min und mit Cetuximab 60 min. Für eine längere Inkubation der Zellen mit Cetuximab (3 h, 5 h, 24 h, 48 h) wurden die Zellen im DMEM/FBS belassen. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Wells wurden einmal mit jeweils 1 ml kaltem PBS pH 7,4 gewaschen. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen für 10 min in 500 µl Paraformaldehyd-Lösung. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS pH 7,4 gewaschen. Jeweils 250 µl frisch hergestellte ABS-Lösung wurde zu den Zellen für 30 min gegeben, um unspezifische Bindestellen abzudecken und zugleich die Zellen zu permeabilisieren. Während dieser Zeit wurde die Well-Platte leicht geschwenkt. Nach den 30 min wurden die Zellen dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen und der primäre Antikörper wurde in der ABS-Lösung verdünnt. Jedes Well wurde mit je 250 µl der ABS-Lösung und dem darin befindlichen primärem Antikörper über Nacht bei 4°C durch leichtes Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen

dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen und 250 µl des sekundären Antikörpers in der ABS-Lösung wurden zu den Wells gegeben. Die Well-Platte wurde mit Alufolie bedeckt und 2 h bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Dann wurden die Wells zum letzten Mal dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Die Deckgläschen wurden aus den Wells genommen und umgekehrt auf vorher gereinigte und mit einem Tropfen DAKO versehene Objektträger gebracht. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen mit Nagellack umpinselt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Dann wurden sie mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops und dem ApoTom ausgewertet.

2.2.3.2 Fluoreszenzmikroskop

Zur Auswertung wurde das Axiovert 200M Mikroskop von Zeiss verwendet, das mit der Axio Vision 4.6 Software bedient wurde. Die Bilder wurden mit dem Axio Vision Viewer LE Rel. 4.6 in ein durch Adobe Photoshop lesbares Format exportiert und bearbeitet.

Die Betrachtung der verschiedenen Färbungen erfolgte mit folgenden Filtern:

BP365/12 Hoechst-Fluoreszenz

BP450-490 Alexa 488-Fluoreszenz

BP546/12 Alexa 555-Fluoreszenz

Um Lokalisierung bestimmter Proteine näher zu charakterisieren, wurde zusätzlich das ApoTom verwendet. Das ApoTom berechnet computerbasiert optische Schnitte durch die Präparate, mit denen Kollokalisierungsstudien durchgeführt werden können. Bei dieser Technologie wird das Prinzip der ‚Streifenprojektion‘ umgesetzt, indem eine Gitterstruktur von definierter Gitterstreifenbreite mit Hilfe eines ApoTom-Schiebers in die Ebene der Leuchtfeldblende des Auflichtstrahlengangs des Mikroskops eingebracht wird. Die Ebene der Leuchtfeldblende ist konjugiert zu der Fokusebene, so dass bei dem Blick durch die Okulare das Gitter überlagert mit der Probe gesehen werden kann. Über einen Scanning-Mechanismus im ApoTom-Schieber wird die Gitterstruktur in der Präparatebene in drei definierten Schritten verschoben, wobei an jeder Gitterposition ein digitales Bild aufgenommen wird. Die drei Rohbilder werden von dem Computer zu einem Ergebnisbild verrechnet. Das berechnete Bild stellt einen optischen Schnitt durch die Probe dar.

2.2.3.3 BrdU-Assay

Mit Hilfe des BrdU-Assays kann die DNA-Syntheserate bestimmt werden. Dazu wird sowohl während der S-Phase der Mitose als auch bei DNA-Reparaturvorgänge das

mit Brom markierte Desoxyuridin (5-Bromo-2'-desoxyuridin) anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut.

Zunächst wurden jeweils 10.000 Zellen auf PLL-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden zu den adhären wachsenden Zellen unterschiedliche Konzentrationen an Cetuximab (50 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml) pipettiert oder die Zellen wurden unbehandelt belassen. Nach einer 72-stündigen Inkubation wurden pro Well 10 µM von BrdU gegeben. In der folgenden Inkubationszeit von 20 min vollzog sich der Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU in die DNA der Zellen. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd, das für 15 min zugegeben wurde, fixiert. Um die DNA zu denaturieren, wurden die Zellen für 20 min bei 37°C mit 2N HCl behandelt und zweimal für 10 min mit 0,1 M Natriumborat (pH 8,5) gewaschen. Nach einer darauffolgenden 30-minütigen Permeabilisierung mit 0,1 % Triton-X100 und der Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10 % Ziegenserum in PBS und 1 % BSA, wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch an BrdU bindet. Daraufhin wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 30 min mit Hoechst 33342 und dem sekundären Antikörper behandelt. Anschließend wurde erneut 3 x mit kaltem PBS gewaschen und die Deckgläschen auf einen Objektträger mit Eindeckmedium gelegt. Nach dem Trocknen konnten die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Mittels Hoechst 33342 wurden alle Zellkerne blau gefärbt. Zur quantitativen Bestimmung der DNA-Syntheserate wurde der prozentuale Anteil der BrdU-markierten Zellkerne ermittelt.

2.2.3.4 Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese)

Um die DNA-Schädigung, die als Einzel- oder Doppelstrangbrüche der DNA auftreten, sichtbar zu machen, wurde der Comet Assay entwickelt. Dieser Assay wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

Dazu wurden zunächst die Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und mit Cetuximab oder UVC-Licht (Ultraviolett-C-Strahlung) behandelt. Zusätzlich wurden Zellen unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Platte abgelöst, mit PBS gewaschen und die Zellzahl wurde auf 50.000 Zellen/ml eingestellt. Als nächstes wurden die Zellen in Agarose eingebettet und auf einen Objektträger getropft. Nach einer 20-minütigen Inkubation des Objektträgers bei 4°C, werden die Zellen mit Lysispuffer lysiert und die nun freiliegende DNA wurde einer

20 min dauernden Elektrophorese unterzogen. Dabei wanderten kurze DNA-Fragmente, d.h. die geschädigte DNA, weiter in Richtung Anode, als die langen DNA-Fragmente. Anschließend erfolgt die Färbung der DNA im Gel mit Hilfe des Vista Gree DNA Dye. Die Bezeichnung des Assays wird verständlich bei der Auswertung, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops erfolgt. Hierbei sieht nämlich die elektrophoretisch aufgetrennte DNA wie ein Comet aus. Dabei sind der Comet-Kopf der Zellkern und der Comet-Schweif der Wanderungsbereich der kurzen DNA-Fragmente. Zur Auswertung wurde entweder die Intensität des Comet-Schweifs mittels Photoshop ermittelt oder die Länge des Comet-Schweifs wurde bestimmt. Die Comet-Schweif-Länge ist definiert als eine Strecke von der Mitte des Comet-Kopfes bis zum Ende des Comet-Schweifes.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Zellyse

RIPA-Puffer	0,05 M	Tris-HCl (pH 7,4)
	0,15 M	NaCl
	0,25% (m/v)	Na-Deoxycholat
	1% (m/v)	NP-40
	1 mM	DTT
Complete	1 Tablette in 1 ml H ₂ O gelöst	
p-ortho- Vanadate	200 mM	
2 x Laemmli-Ladepuffer	0,5 M	Tris-HCl, pH6,8
	22% (v/v)	SDS (10%ig)
	11% (v/v)	Glycerin (99%ig)
	0,05% (w/v)	Bromphenoblau
	100mM	DTT

Um intrazelluläre Proteine nachzuweisen, werden zunächst die Zellmembranen durch einen speziellen Lysepuffer (RIPA) aufgebrochen. Dem Lysepuffer wurden Protease-Inhibitoren (Complete, Roche) zugesetzt, die die zelleigenen Proteasen hemmen und verhindern, dass Proteine während der Aufbereitung abgebaut werden. Aus dem gleichen Grund erfolgen alle anderen Arbeitsschritte auf Eis und alle

Lösungen und Arbeitsgeräte wurden auf 4 °C vorgekühlt. Zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen wurde zusätzlich ein Phosphatase-Inhibitor (p-ortho-Vanadate, Sigma) dazu gegeben.

Die in 100 mm x 20 mm großen Zellkulturschalen befindlichen Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS pH 7,4 gespült. In jedes Schälchen wurden 1ml RIPA-Lysepuffer für gegeben und 20 min auf Eis geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen mit einem speziellen Zellschaber von der Unterlage abgekratzt. Das so erhaltene Zelllysate wurde 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Damit wurde das Homogenisat von allen größeren Zellbestandteilen wie Zellkern, Organellen und Membranen getrennt. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde durch vorsichtiges abpipettieren in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Jeweils 10 µl des Proteinlysates wurden für die Messung der Proteinkonzentration verwendet. Der andere Teil des Lysates wurde, falls notwendig, für die Immunopräzipitation verwendet oder für den Western-Blot mit 2x Lämmli-Puffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für 5 min erhitzt auf 95 °C. Die Proben wurden dann sofort bei – 20 °C eingefroren.

2.2.4.2 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde zur Detektion des EGFR in NR6-Zellen durchgeführt. Dazu wurde zum Zelllysate ein spezifisch gegen EGFR gerichteter Antikörper gegeben und die anschließende Inkubation erfolgte im Über-Kopf-Rotierer für 1 h bei 4 °C. Anschließend wurden pro Ansatz 25 µl Protein-G-Sepharose (Amersham Biosciences AB) zugegeben und die Inkubation im Über-Kopf-Rotierer wurde über Nacht fortgesetzt. Die Sepharose wurde am folgenden Tag bei 14.000 rpm für 1 min sedimentiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Es folgte dreimaliges Waschen mit je 1 ml RIPA-Waschpuffer, das Complete und p-ortho-Vanadate enthielt. Bei jedem Waschschrift wurden zu dem Sepharose-Protein-Pellet je 1 ml RIPA-Puffer zugegeben, dieses wurde 1 min bei 14.000 rpm und 4° C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand komplett mit Hilfe einer Hamilton-Spritze entnommen und des Pellet in 20 µl 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Gebundene Proteine ließen sich durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C abtrennen und die Proben wurden mit der Hamilton-Spritze auf ein vorher vorbereitetes Gel aufgetragen.

2.2.4.3 Mitochondriale Extraktion und Anreicherung

Mannitolpuffer:	10 mM	HEPES, pH 7,5
	210 mM	Mannitol
	70 mM	Sucrose
	0,1 mM	EGTA
	1 x	Complete Protease Inhibitor Cocktail

Zur Isolierung der Mitochondrien wurden Zellen auf 10 cm Schalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zugabe von Cetuximab in unterschiedlichen Konzentrationen (50 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml) für eine Dauer von 48 h. Als Kontrolle wurden die Zellen auch in Abwesenheit von Cetuximab inkubiert. Am Ende der zweitägigen Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, von der Zellkulturschale abgeschabt und in eiskaltem Mannitolpuffer resuspendiert. Mit Hilfe der mechanischen Einwirkung des Dounce-Homogenisators wurden bei einem Teil der Zellen die Zellwände aufgebrochen. Eine Zentrifugation für 5 min bei 500 x g hatte zur Folge, dass sich die nicht aufgebrochenen Zellen im Pellet befanden. Das Pellet wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurde die Zellkern-Fraktion durch eine Zentrifugation bei 2000 g für 15 min pelletiert und diese wurde ebenfalls verworfen. Im letzten Zentrifugationsschritt, der bei 15.000 g für 15 min erfolgte, wurden im Pellet die Mitochondrien aufkonzentriert. Diese wurden im Ripa-Puffer lysiert.

Um die Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel nach der Auftrennung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blue G250, der in 12,5% Trichloressigsäure gelöst ist, komplett blau eingefärbt. Im nächsten Schritt wurde das Gel dann wieder entfärbt in einer Lösung bestehend aus 30 % Ethanol, 60 % Aqua bidest. und 10 % Eisessig. In diesem Schritt verliert das Gel die blaue Farbe, die Proteinbanden bleiben aber gefärbt und werden somit sichtbar.

2.2.4.4 Proteinbestimmung mit Bicinchinon-Säure (BCA)

Der Proteingehalt einer Probe wurde mit dem BCA-Test bestimmt [147]. Diese Methode basiert darauf, dass die Aminogruppen der Proteine in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Cu^+ reagiert dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid = BCA) zu einem violetten Komplex, der photometrisch bestimmt wird.

Puffer für die Elektrophorese und den Transfer:

Elektrophoresepuffer (1x)	25 mM	Tris Base
	190 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
		pH 8,3
Transferpuffer (1x)	25 mM	Tris Base
	190 mM	Glycin
	0,01 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	Methanol
		pH 8,3

Lösung zur Färbung der Membran:

Ponceau S-Lösung	0,5 g	Ponceau S
(für 100 ml)	1 ml	Essigsäure
		mit dest. Wasser auffüllen

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe und Ladung erfolgte in Acrylamidgelen nach der Methode von Laemmli [148].

Zur Vorbereitung der Proben wurden diese 1:1 mit 2x Laemmli-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. In den Laemmli-Puffer wurde immer frisches DTT (100 mM) gegeben, welches aufgrund seiner reduzierenden Eigenschaften die Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten spaltet. Mit Erhitzen der Probe wurden durch Zerstören von Wasserstoffbrückenbindungen die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine aufgelöst. Die natürliche Eigenladung der Aminosäuren wurde durch das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) überdeckt, so dass pro Masseneinheit eine konstante negative Ladung entstand. Somit wanderten alle Proteine im elektrischen Feld in die gleiche Richtung und konnten entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Zusätzlich enthielt der Ladepuffer Bromphenolblau, das während der Elektrophorese ebenfalls zur Anode wanderte und die Lauffront markierte. Bei dem verwendeten Laemmli-System der SDS-PAGE handelte es sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese, bei welcher ein SDS-haltiges Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt wurde. Aufgrund der Zweiteilung der Gelmatrix in ein weitporiges Sammelgel und das engporige Trenngel

wurde eine zusätzliche Aufkonzentrierung der Probe an der Grenzschicht zum Trenngel erreicht.

Nach dem Säubern der Glasscheiben mit Ethanol und destilliertem Wasser wurde die Gelapparatur (Firma Hoefer), bestehend aus einer weißen Aluminaplatte, 2 Spacern und einer Glasplatte, zusammengesetzt und in eine Haltevorrichtung eingespannt. Durch Einfüllen von destilliertem Wasser wurde die Dichtigkeit des Systems überprüft. Zuerst wurde die Trenngellösung (je nach gewünschter Porengröße 7,5%ig oder 12,5%ig) hergestellt, durch leichtes Schwenken vermischt und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten pipettiert. Um die Entstehung einer ebenen Grenzfläche zu gewährleisten, wurde das Trenngel sofort mit Isopropanol überschichtet. Der Alkohol wurde nach dem Auspolymerisieren vollständig entfernt. Anschließend wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesteckt. Das vollständig polymerisierte Gel wurde zusammen mit der Gelapparatur aus der Halterung entnommen und in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt wurde. Vor dem Auftragen der Proben wurde der Kamm herausgezogen und die Taschen mit Puffer gespült. Jede Geltasche wurde mit maximal 15 µg Protein, das 1:1 mit Lämmli aufgekocht wurde, befüllt. Als Molekulargewichtsmarker wurden die Precision Plus Protein™ Standards All Blue oder Dual Color eingesetzt. Diese decken einen Größenbereich von 10 kDa bis 250 kDa ab.

Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 60 V angelegt. Erst nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hat, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde so lange fortgesetzt, bis die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers am unteren Ende des Trenngels angekommen war. Die Glasapparatur wurde dann aus der Elektrophoresekammer entnommen, das Gel wurde vorsichtig freigelegt und das Sammelgel vom Trenngel abgeschnitten.

2.2.4.5.2 Western Blotting

Für einen immunologischen Nachweis wurden die Proteine mit Hilfe des Tank-Blot-Verfahrens aus dem Gel eluiert und auf eine PVDF-Membran immobilisiert.

Vor dem Transfer wurden die PVDF-Membran und das Whatman-Papier entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten. Die PVDF-Membran musste vor dem Gebrauch für 2 min in Methanol getaucht, dann 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und zuletzt in Transferpuffer gelegt werden. Die im Transferpuffer

getränkten Schwämmchen, Whatman-Papiere, das Gel sowie die PVDF-Membran wurden sandwichartig aufgeschichtet. Luftblasen wurden durch vorsichtiges Rollen eines Glasstabes über die Filterpapierschichten entfernt. Nach Auflegen der Kathode und dem Zusammenbau der Apparatur erfolgte der Transfer bei konstanter Stromstärke mit 400 mA und 250 V Spannung über 1 h bei 4 °C.

Durch Färben der Membran mit Ponceau S konnte der Transfer überprüft werden. Die Membran wurde zu diesem Zweck 5 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert und mit Wasser entfärbt.

2.2.4.5.3 Immunologische Detektion

Aufgrund der hochspezifischen Erkennungsreaktion zwischen Antikörper und Antigen ist es möglich, das auf einer Membran immobilisierte Protein nachzuweisen. Allerdings können Antikörper auch unspezifisch an einen Träger adsorbieren. Um dies zu verhindern, wurden nach Transfer der Proteine, die auf einer Membran noch verbleibenden freien Stellen mit Hilfe von Magermilchpulver (5 % Magermilchpulver in TBS-T) oder BSA (5 % BSA in TBS-T gelöst) blockiert. Dies erfolgte durch einstündiges Schütteln bei Raumtemperatur. Auch der Einsatz von Tween 20, einem nichtionischen Detergenz, in der Waschlösung sollte eine unspezifische Adsorption der Antikörper an die Membran unterbinden. Der primäre Antikörper, der direkt an das gewünschte Protein bindet, wurde in einer 5 %igen Magermilchlösung oder BSA-Lösung über Nacht bei 4 °C mit der Membran geschüttelt. Nach fünfmaligem Waschen für jeweils 5 min mit TBS-T wurde die Membran 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der mit dem Indikatorenzym Meerrettich-Peroxidase („HRP“) gekoppelte sekundäre Antikörper hat spezifisch an den primären Antikörper gebunden. Anschließend wurde die Membran erneut fünfmal für 5 min mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Zur Detektion der Antikörperbindung wurde das Super Signal West Pico oder Femto Chemilumineszenz Substrat der Firma PIERCE verwendet. Dabei wurden die beiden Komponenten des Kits (Peroxidase Solution und Enhancer Solution) im Verhältnis 1:1 gemischt und diese Lösung wurde für 5 min auf die PVDF-Membran gegeben. Durch Auflegen eines Röntgenfilms wurden nach der Inkubation der Membran mit der Detektionslösung die durch den spezifischen Antikörper nachgewiesenen Proteinbanden sichtbar. Die Peroxidase oxidierte dabei in Gegenwart von Wasserstoffperoxid ein zyklisches Diazylhydrazid (Luminol), das dadurch in einen angeregten Zustand versetzt wurde. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wurde

die freiwerdende Energie in Licht umgesetzt, das an der entsprechenden Stelle den Röntgenfilm geschwärzt hat.

2.3 Statistik

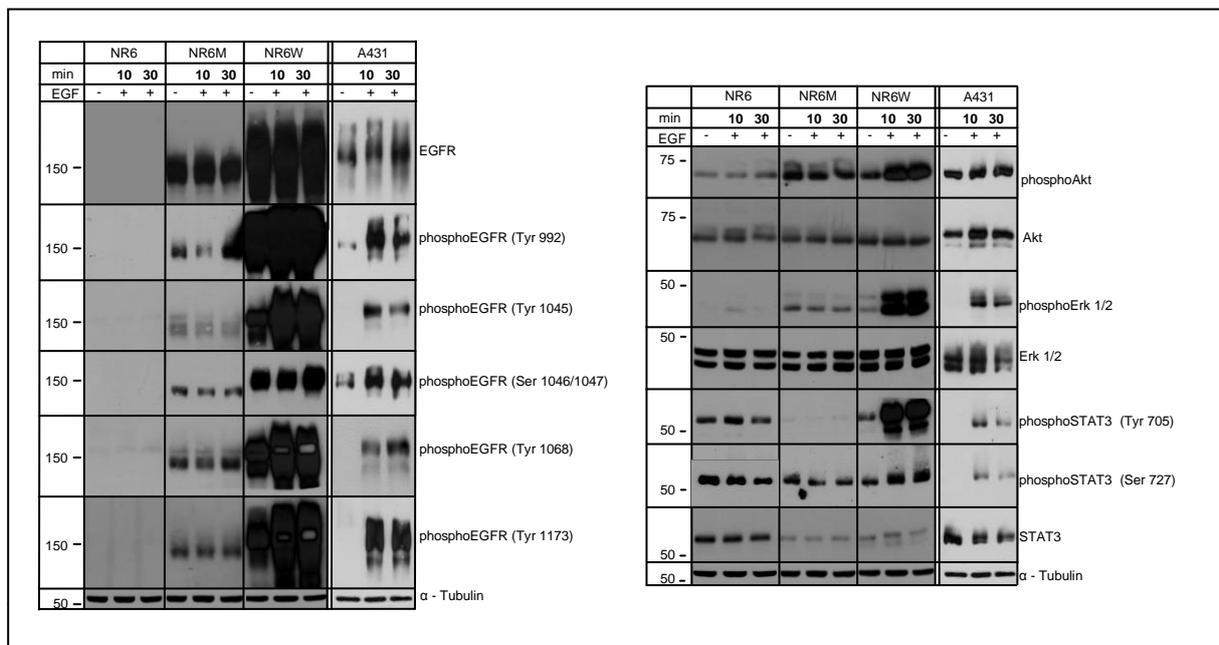
Die statistische Signifikanz wurde aus jeweils drei unabhängigen Experimenten mittels eines ungepaarten t-Tests mit dem Programm GraphPad QuickCalc ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung der Funktionalität der stabil transfizierten NR6- und A431-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten NR6-Zellen stellen eine Variante der Fibroblasten-Zelllinie Swiss-3T3 dar, die keinen funktionsfähigen EGF-Rezeptor exprimieren und daher nicht auf Gabe von EGF ansprechen [139]. Zudem wurden in dieser Arbeit die von Batra *et al.* hergestellten EGFR-exprimierenden NR6W-Zellen und EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen verwendet. Für die Herstellung dieser Zellen wurde die EGFR- bzw. EGFRvIII-cDNA in den Expressionsvektor pH β AP-1 kloniert und stabil in die NR6 Zellen transfiziert [140]. Die humane, epidermoide Karzinom-Zelllinie A431 exprimiert eine sehr hohe Anzahl an EGF-Rezeptoren ($3 \cdot 10^6$) [141]. Mittels der A431-Zellen konnte besonders im zweiten Teil der Arbeit der Bezug zu humanen Tumoren hergestellt werden.

Zuerst wurden in den verwendeten Zelllinien die Expressionslevel von EGFR, EGFRvIII und der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren miteinander verglichen (Abb. 4).



Nach einer 10 und 30 min dauernden Stimulation der Zellen mit EGF wurden diese lysiert und die Proteine extrahiert. Diese wurden durch SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und nach Western Blot mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. Hierbei sollten auf einem Film die unterschiedlichen Expressions- und Aktivierungslevel von EGFR und EGFRvIII dargestellt werden.

Erst nach einer längeren Exposition der Filme wurde EGFRvIII sichtbar. Daraus ergeben sich jedoch die sehr prominenten EGFR- und Phospho-EGFR Banden.

In NR6-Zellen konnte mit Hilfe des Immunoblots weder die Expression von EGFR noch von EGFRvIII detektiert werden. Ebenfalls findet während der Inkubation dieser Zellen mit dem Liganden des EGF-Rezeptors, EGF, weder eine Aktivierung der beiden Rezeptorformen noch die der Signaltransduktionsfaktoren Akt oder STAT3 statt. Jedoch nimmt die Aktivität der MAP-Kinasen Erk1/2 nach 10-minütiger EGF-Stimulation leicht zu (Abb. 4). Bereits in anderen Publikationen wurde gezeigt, dass die NR6-Zellen neben anderen Mitgliedern der HER-Familie wie ErbB2, ErbB3 und ErbB4 auch geringe Mengen an EGFR exprimieren können, was im Gegensatz zur Primärliteratur steht [139,149]. Eine daraufhin durchgeführte Immunoprecipitation des EGFR aus dem NR6-Zellysate zeigt eine schwache 170 kDa EGFR-Bande im Immunoblot und somit sehr geringe Expressionslevel von EGFR (Daten nicht gezeigt). Diese geringe Anzahl an EGF-Rezeptoren könnte möglicherweise ausreichen, um kleine Mengen an Erk1/2 zu aktivieren.

Im Vergleich zu der hohen Anzahl an EGFR, die in NR6W-Zellen nachgewiesen werden konnten, exprimieren die NR6M-Zellen eine relativ geringe Anzahl an EGFRvIII. Zudem ist die tumorspezifische Isoform mit 145 kDa etwas kleiner als der wildtypische Rezeptor mit einer Größe von 170 kDa. Bereits ohne EGF-Zugabe ist EGFRvIII an allen untersuchten Serin- und Tyrosinresten phosphoryliert. Zusätzliche Stimulation der Zellen mit EGF ändert den Phosphorylierungsstatus von EGFRvIII nicht. Die Signaltransduktionsfaktoren Akt und Erk1/2 sind in den NR6M-Zellen stärker phosphoryliert als in untransfizierten NR6-Zellen. Jedoch weisen die NR6M-Zellen eine sehr geringe STAT3-Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 auf im Vergleich zu der STAT3-Phosphorylierung der NR6-Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten in der Literatur überein. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass EGFR-assoziierte Liganden nicht an EGFRvIII binden können, die Variante aber einen konstitutiv aktiven Zustand aufweist. Die konstitutiv aktive Isoform weist eine stärkere Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionsfaktoren wie Akt und Erk1/2 auf, jedoch nur eine schwache Aktivierung von STAT3 [60,66] (Abb. 4).

Stimulation der NR6W-Zellen mit EGF hat zur Folge, dass eine starke Aktivierung des wildtypischen Rezeptors sowohl an allen untersuchten Serin- und Tyrosinresten, als auch der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3 stattfindet. Auch diese Ergebnisse stimmen mit der vorhandenen Literatur überein

[66]. Jedoch ist der EGFR bereits ohne Gabe des Liganden an den Serin- und Tyrosinresten phosphoryliert. Dies ist möglicherweise auf eine Autoaktivierung des Rezeptors zurückzuführen, die in der hohen Rezeptoranzahl begründet ist. Bereits in früheren Publikationen wurde gezeigt, dass Transfektion zur Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors führen kann [150]. Die vorhandene Liganden-unabhängige Autoaktivierung des EGF-Rezeptors kann ebenfalls die Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionsfaktoren einleiten.

Es wurde bereits gezeigt, dass die A431-Zellen eine sehr hohe Anzahl an EGF-Rezeptoren (10^6 Rezeptoren/Zelle) exprimieren [141]. Auch bei dieser Zelllinie ist in Abwesenheit des Liganden eine deutliche Autoaktivierung des Rezeptors vorhanden. EGF-Stimulation der A431-Zellen hat zur Folge, wie zuvor auch bei den NR6W Zellen gezeigt, dass es zu einer starken Aktivierung des EGFR und der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren kommt (Abb. 4).

Nachdem die Funktionalität der verwendeten stabil transfizierten NR6-Zellen untersucht wurde, sollte der Einfluss des monoklonalen Antikörpers Cetuximab sowohl auf die Signalisierung von EGFR und EGFRvIII als auch auf das Überleben der EGFR- und EGFRvIII-exprimierenden Zellen untersucht werden. Zur besseren Übersicht wurde die Arbeit in zwei Teile gegliedert, wobei im ersten Teil der Effekt von Cetuximab auf EGFRvIII und im zweiten Teil der Effekt von Cetuximab auf EGFR untersucht wurde.

3.2 Die *in vitro* Charakterisierung der Wirkungseffizienz von Cetuximab auf EGFRvIII

3.2.1 Internalisierung von Cetuximab nach Bindung an EGFRvIII

Um zu überprüfen, ob Cetuximab die Internalisierung von EGFRvIII verändert, wurden die in Serum-freiem Medium vorinkubierten NR6M-Zellen für 60 min mit Cetuximab behandelt. NR6M-Zellen ohne Cetuximab-Behandlung dienten als Kontrolle (Abb. 5A). In Abwesenheit von Cetuximab zeigten die Zellen eine ubiquitäre Verteilung von EGFRvIII im Zytoplasma. In Gegenwart von Cetuximab bindet dieser an EGFRvIII und dies resultierte in der Internalisierung der EGFRvIII-Cetuximab-Komplexe. Sichtbar wurde dies an zytoplasmatischen Vesikeln, die sowohl EGFRvIII als auch Cetuximab enthalten. Die Bindung von Cetuximab an EGFRvIII veränderte weder die Größe der Vesikel noch deren Verteilung im Zytoplasma (Abb. 5A). Als Kontrolle wurden die kaum EGFR exprimierenden NR6-Zellen für 60 min mit

Cetuximab behandelt. In diesen Zellen konnte jedoch kein EGFR nachgewiesen werden, da die vorhandene Anzahl an Rezeptoren unter der Nachweisgrenze liegt (Daten nicht gezeigt). Es konnte ebenfalls kein Signal für Cetuximab detektiert werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Cetuximab unspezifisch an andere in der Zelle vorhandene Proteine bindet.

Obwohl feststeht, dass die Bindung von Cetuximab an EGFRvIII dessen Internalisierung einleitet, konnte die vorhandene Literatur nicht zeigen, welche Mengen an Rezeptorisoform internalisiert werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Cetuximab-induzierte EGFRvIII-Internalisierungsrate mit Hilfe des an Alexa 647 gekoppelten single-chain-Antikörper-Fusionproteins (425(scFv)SNAP-Alexa 647) bestimmt [144,145]. Dieser Antikörper wird zum Medium lebender Zellen hinzugegeben und kann sowohl an die extrazelluläre Domäne von EGFR als auch von EGFRvIII binden. Der direkt an den Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht die direkte Messung der an der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptordichte mit Hilfe der FACS-Analyse [144,145].

Vor dem eigentlichen Experiment wurde zunächst die Effizienz der Bindung des 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers an NR6- und NR6M-Zellen untersucht (Abb. 5B). Die Ergebnisse der FACS-Analyse verdeutlichen, dass die Inkubation lebender Zellen mit diesem Antikörper zu dessen Bindung an die extrazelluläre Domäne der in der Plasmamembran verankerten Rezeptoren geführt hat. In lebenden Zellen ist nämlich nur diese Rezeptorpopulation zugänglich, da der Antikörper die Plasmamembran der Zelle nicht passieren kann und somit an bereits internalisierte Rezeptoren nicht mehr binden kann. Für die Darstellung des EGFRvIII-Signals ist hier ein Histogramm gewählt, in dem die Fluoreszenzintensität (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) aufgetragen ist und so die Beurteilung der an der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren ermöglicht. Wie bereits mit Hilfe der Immunopräzipitation gezeigt wurde, exprimieren die NR6-Zellen eine sehr geringe Anzahl an EGFR. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der FACS-Analyse, in der die Inkubation der NR6-Zellen mit dem 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörper zur Detektion einer geringen Anzahl an EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche führt. Sichtbar wurde dies in der sehr schwach ausgeprägten Rechtsverschiebung der Fluoreszenzkurve (schwarze Kurve) entlang der X-Achse im Vergleich zur Kurve der unbehandelten Zellen (rot ausgefüllte Kurve) (Abb. 5B, links). Die Inkubation der NR6M-Zellen mit dem Antikörper resultiert in einer noch stärkeren Verschiebung der

Fluoreszenzkurve (schwarz) entlang der X-Achse zum höheren Fluoreszenzsignal hin, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (rot) (Abb. 5B, rechts).

Zur Untersuchung der durch Cetuximab induzierten Internalisierungsrate von EGFRvIII wurden die NR6M-Zellen entweder mit EGF, mit Cetuximab oder mit einer Kombination beider Substanzen inkubiert (Abb. 5C). Aus drei unabhängigen Messungen wurde der Median des Fluoreszenzsignals gegen die Zellzahl aufgetragen und statistisch ausgewertet. Eine 10-minütige Inkubation der EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen mit EGF hat nicht zu einer signifikanten Veränderung der Anzahl an membranständigen Rezeptoren im Vergleich zu unbehandelten Zellen geführt. Dies entsprach den Erwartungen, da die Aktivität von EGFRvIII Liganden-unabhängig ist [60]. Sowohl die Behandlung von NR6M-Zellen mit Cetuximab (siehe dazu auch das Histogramm links) als auch die Kombination von Cetuximab und EGF weist eine Abnahme der an der Oberfläche befindlichen Rezeptormenge um ca. 25 % auf. Dies ist durch eine Internalisierung von EGFRvIII zu erklären. Im Histogramm wird dies deutlich durch eine Linksverschiebung der Kurve der Cetuximab-inkubierten Zellen im Vergleich zur Kurve der in Abwesenheit von Cetuximab behandelten Zellen (rot ausgefüllte Glockenkurve) (Abb. 5C).

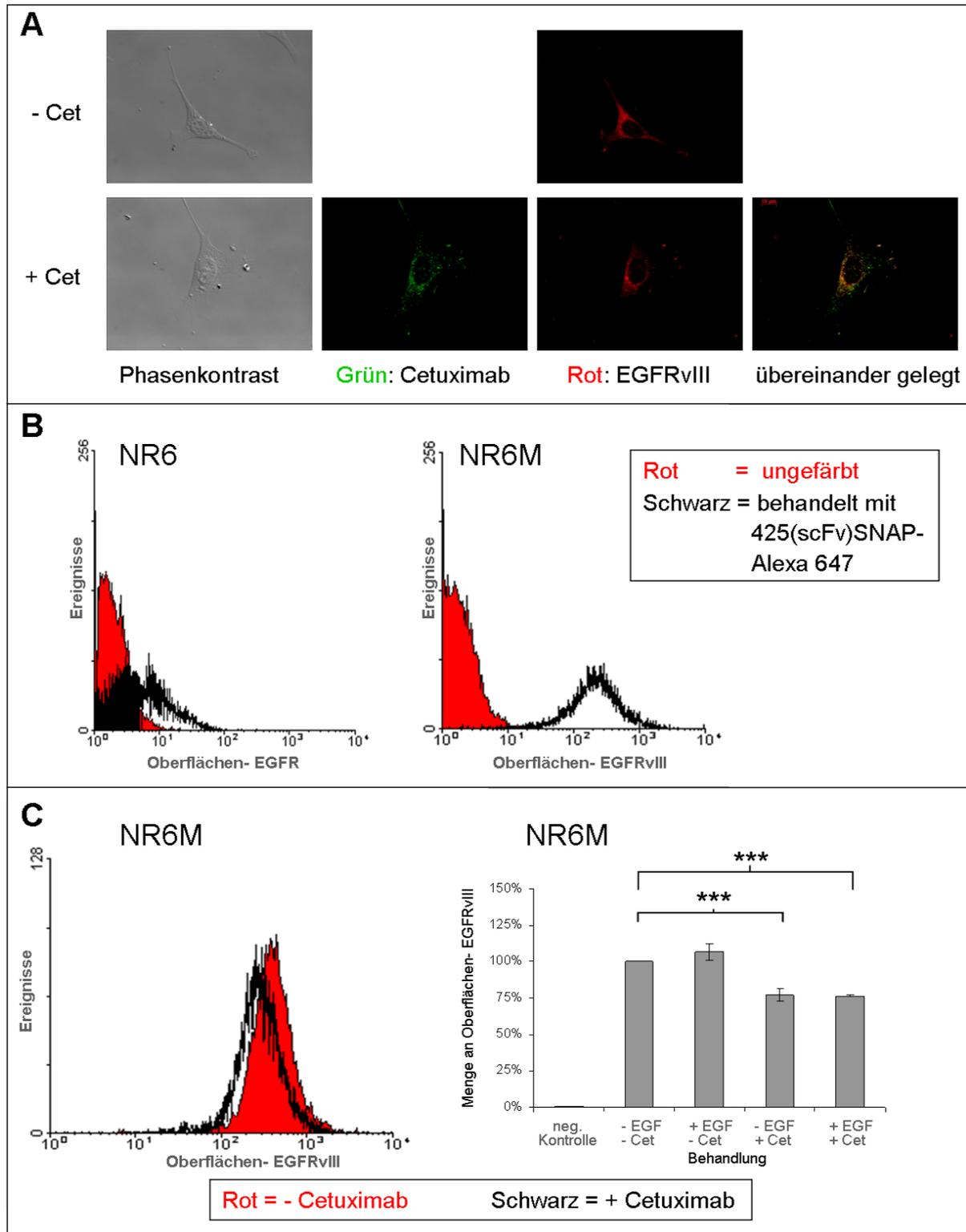


Abb. 5: Endozytose und Lokalisierung von EGFRvIII nach Inkubation mit Cetuximab in NR6M-Zellen

In Serum-freiem Medium vorinkubierte EGFRvIII-exprimierende Zellen wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab [100 µg/ml] für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde Cetuximab (grün) und EGFRvIII (rot) dargestellt (A). Zur Untersuchung der Bindung des 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers wurden die in Serum-freiem Medium vorinkubierten NR6- und NR6M-Zellen in Abwesenheit oder Gegenwart des

425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Konzentration der an der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoranzahl durchflusszytometrisch bestimmt (B). Um die Cetuximab-induzierte Internalisierungsrate zu bestimmen, wurden die in Serumfreiem Medium vorinkubierten EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen unbehandelt gelassen oder für 10 min mit EGF [100 ng/ml], für 60 min mit Cetuximab [100 µg/ml] oder der Kombination beider Substanzen inkubiert. Anschließend wurde ebenfalls mit Hilfe des 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers die Konzentration der an der Zelloberfläche vorhandenen Anzahl an EGFRvIII durchflusszytometrisch bestimmt. In der negativen Kontrolle sind unbehandelte und ohne Antikörper inkubierte Zellen dargestellt. Aus drei unabhängigen Messungen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität aufgezeigt. Mit Hilfe des ungepaarten t-Tests wurde eine statistische signifikanz ermittelt; (***) = $p < 0,001$ (C).

3.2.2 Einfluss von Cetuximab auf die Signaltransduktion von EGFRvIII und der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren

3.2.2.1 Unveränderte Aktivierung von EGFRvIII und der nachgeschalteten Faktoren während einer einstündigen Cetuximab-Behandlung

Im Folgenden wurden die Auswirkungen einer einstündigen Inkubation mit Cetuximab in Abwesenheit oder Gegenwart von EGF auf die Aktivierung von EGFRvIII und seiner nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3 in NR6M-Zellen untersucht (Abb. 6B). Als Kontrolle wurden die NR6-Zellen verwendet (Abb. 6A).

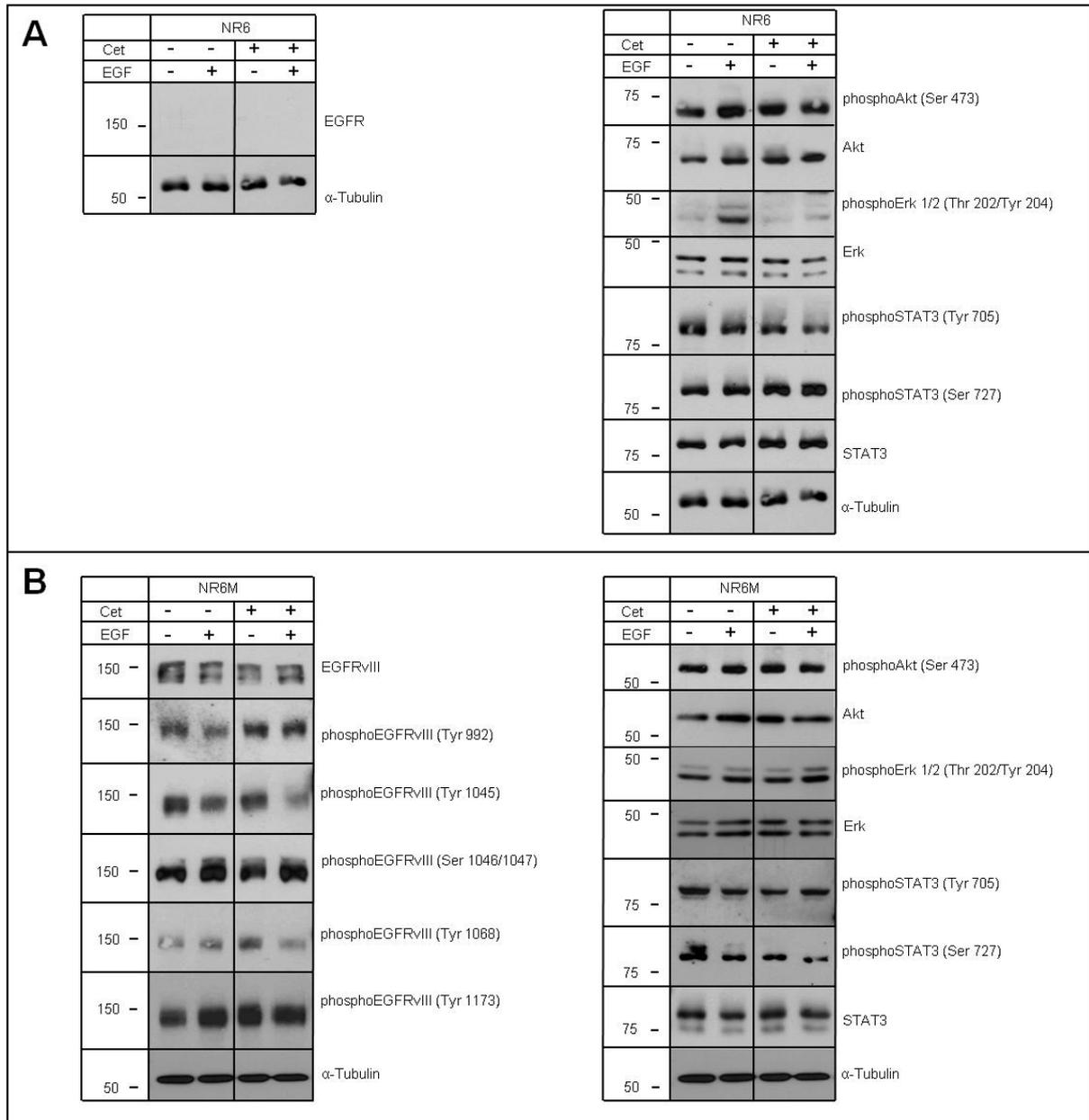


Abb. 6: Darstellung des Phosphorylierungsstatus von EGFRvIII und seiner Effektoren während einer einstündigen Inkubation mit Cetuximab in An- und Abwesenheit von EGF

In Serum-freiem Medium vorinkubierte Zellen wurden unbehandelt gelassen oder für 60 min mit Cetuximab [100 µg/ml], für 10 min mit EGF [100 ng/ml] oder mit der Kombination beider Substanzen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten; Cet = Cetuximab.

Die geringe Anzahl an EGF-Rezeptoren, die in NR6-Zellen exprimiert werden, konnte auch hier nicht sichtbar gemacht werden (Abb. 6A). Die Inkubation der Zellen mit Cetuximab in Gegenwart oder Abwesenheit von EGF änderte weder den Phosphorylierungsgrad der Signaltransduktionsfaktoren Akt und STAT3 noch deren Gesamtmenge. Die 10-minütige EGF-Stimulation dieser Zellen zeigte jedoch eine

stärkere Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2. Dies könnte auf eine geringe Anzahl funktionsfähiger EGF-Rezeptoren zurückzuführen sein. Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit Cetuximab verhinderte jedoch die Liganden-induzierte Aktivierung von Erk1/2 (Abb. 6A).

Die Inkubation der EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen mit dem EGF resultierte weder in einer veränderten Phosphorylierung der Rezeptorvariante noch seiner nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt und STAT3 (Abb. 6B). Lediglich wurde eine leichte Aktivierung von Erk1/2 während der 10-minütigen EGF-Stimulation beobachtet. Wie oben bereits erwähnt wurde, ist diese Aktivierung von Erk1/2 wahrscheinlich durch das Vorhandensein einer geringen Menge an EGF-Rezeptoren zu erklären, die die NR6-Zellen exprimieren. Die Inkubation der EGFRvIII-exprimierenden Zellen mit Cetuximab für 60 min in Gegenwart oder Abwesenheit von EGF hat nicht zur Änderung des Phosphorylierungsgrades der untersuchten Serin- und Tyrosinreste von EGFRvIII oder seiner nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren geführt (Abb. 6B).

3.2.2.2 Unveränderte Aktivierung von EGFRvIII und der nachgeschalteten Faktoren während einer dreitägigen Cetuximab-Behandlung

Eine einstündige Inkubation der NR6M-Zellen mit Cetuximab hatte weder die Hemmung der EGFRvIII-Aktivierung, noch die Hemmung der nachfolgenden Signaltransduktionsfaktoren zur Folge. Daraufhin wurde die Wirkung einer längeren Inkubation mit Cetuximab auf diese Zellen untersucht. Da die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von EGFRvIII Liganden-unabhängig ist, wurden die Zellen nicht mehr zusätzlich mit EGF stimuliert [60]. Stattdessen wurden die Zellen in Serumhaltigem Medium mit Cetuximab für 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 48 h und 72 h inkubiert (Abb. 7).

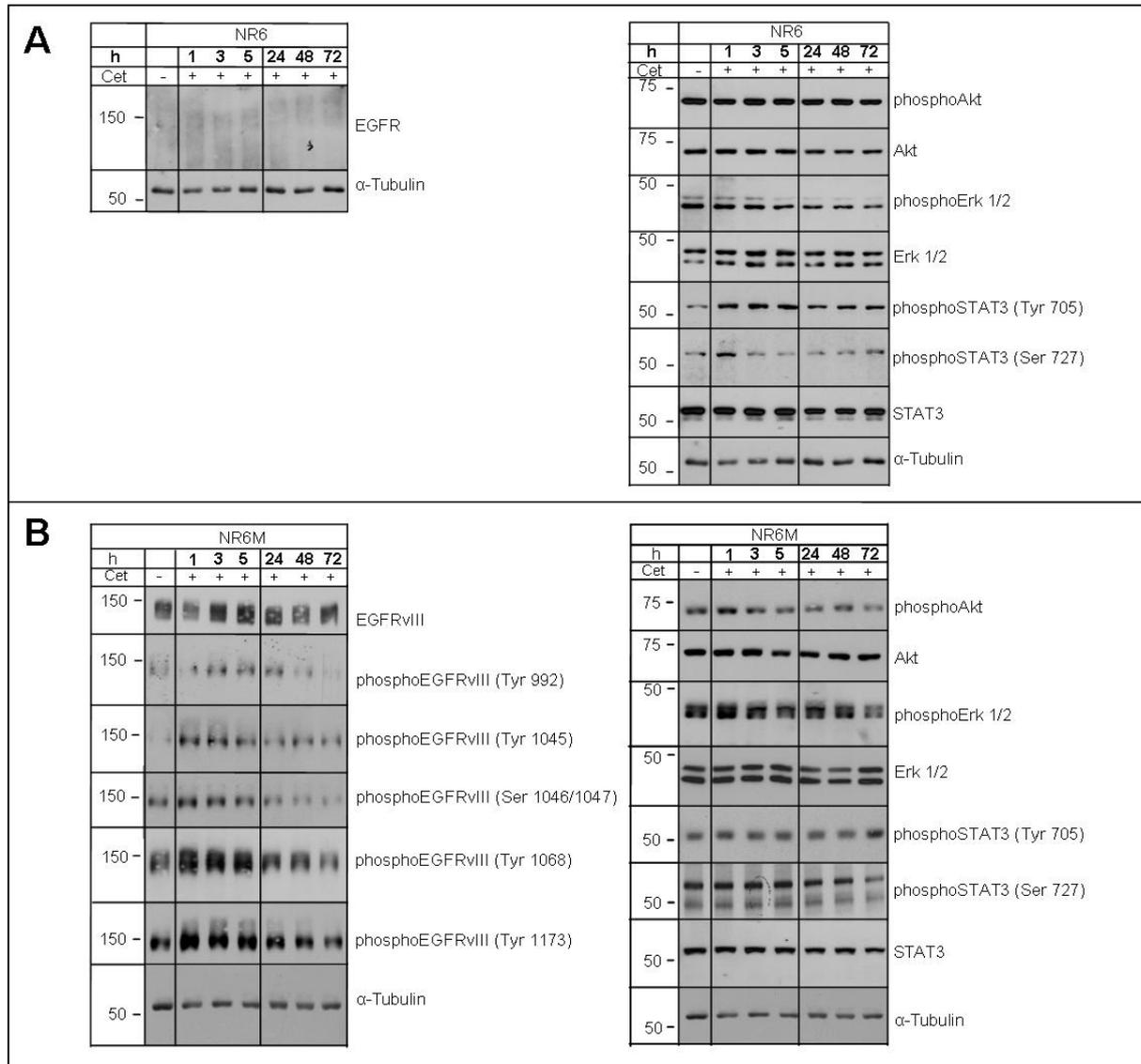


Abb. 7: Darstellung des Phosphorylierungsgrades von EGFRvIII und seiner Effektoren während einer dreitägigen Inkubation mit Cetuximab in Serum-haltigem Medium

In Serum-haltigem Medium (10 %) kultivierte Zellen wurden unbehandelt gelassen oder für 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 48 h oder 72 h mit Cetuximab [100 µg/ml] inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Immunoblot wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

Die als Kontrolle verwendeten NR6-Zellen exprimieren auch hierbei eine zu geringe Menge an EGFR, um diese im Immunoblot nachweisen zu können (Abb. 7A). Eine Inkubation dieser Zellen mit Cetuximab über einen Zeitraum von 72 h veränderte auch nicht den Phosphorylierungsgrad der Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 oder STAT3 (Abb. 7A). Die Behandlung der EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen mit Cetuximab hatte keinen Einfluss auf die Anzahl an EGFRvIII Rezeptoren. Jedoch nahm die Phosphorylierung von EGFRvIII an allen untersuchten Serin- und

Tyrosinresten innerhalb der ersten Stunden signifikant zu (Abb. 7B). Die Phosphorylierung von EGFRvIII reduzierte sich nach einer 24-stündigen Cetuximab-Behandlung. Erst eine 72-stündige Inkubation mit Cetuximab hatte zur Folge, dass die Ausgangsphosphorylierung von EGFRvIII erreicht wurde, die dem Wert der unbehandelten Zellen entsprach. Die Inkubation der Zellen mit Cetuximab führte nicht zur Änderung der Expressionslevel der Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3. Zudem resultierte die Cetuximab-Behandlung nicht in einer Hemmung der Phosphorylierung der Signaltransduktionsfaktoren. Es scheint sogar, dass die Aktivierung von Akt und Erk1/2 innerhalb der ersten Stunde leicht zunahm (Abb. 7B). Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit humanem Immunglobulin (IgG), als negative Kontrolle, über einen Zeitraum von 72 h, veränderte weder die Aktivität der tumorspezifischen Variante noch die seiner nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Einfluss von Cetuximab auf subzelluläre Lokalisierung von EGFRvIII

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde geprüft, ob sich die Verteilung der tumorspezifischen Isoform innerhalb der Zelle während einer 48-stündigen Inkubation mit Cetuximab verändert. Dazu wurden die NR6M-Zellen für 3 h, 5 h, 24 h und 48 h mit Cetuximab inkubiert (Abb. 8).

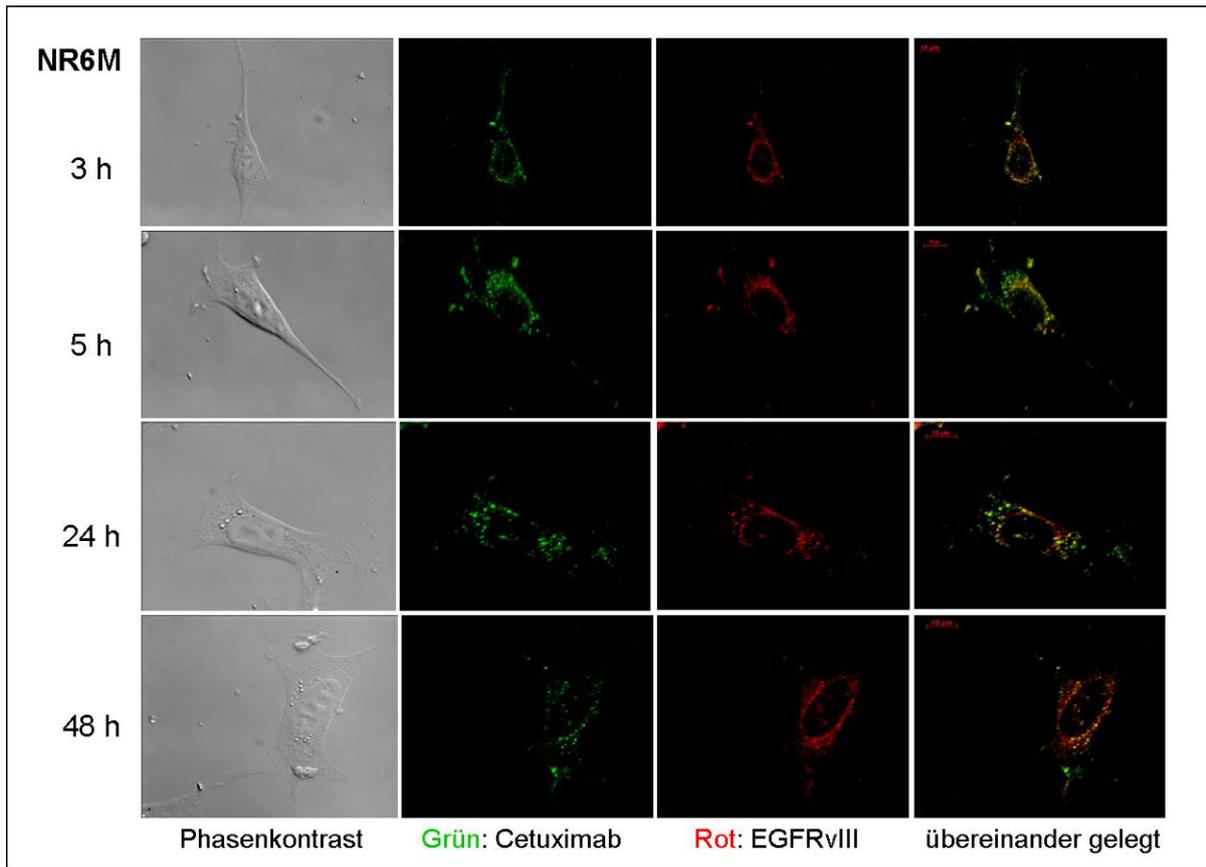


Abb. 8: Subzelluläre Lokalisierung von EGFRvIII während einer zweitägigen Cetuximab-Inkubation

In Serum-haltigem Medium kultivierte EGFRvIII-exprimierende Zellen wurden mit Cetuximab (100 µg/ml) für 3 h, 5 h, 24 h und 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz Cetuximab (grün) und EGFRvIII (rot) dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

Während einer 48-stündigen Behandlung der NR6M-Zellen mit Cetuximab veränderte sich die Menge an EGFRvIII nicht (Abb. 8). Dieses Ergebnis stimmt mit den im Immunoblot gewonnenen Daten überein. Auch dort konnte gezeigt werden, dass während einer 72-stündigen Inkubation mit Cetuximab keine signifikanten Mengenunterschiede an EGFRvIII detektiert werden konnten (Abb. 7). Zudem wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz sichtbar, dass zu jedem Zeitpunkt eine ausgeprägte Kolo-kalisation von Cetuximab und EGFRvIII vorhanden war (Abb. 8). Dies zeigt an, daß sich EGFRvIII und Cetuximab in demselben Kompartiment befanden. Ebenfalls veränderte die Inkubation der Zellen mit Cetuximab nicht die Größe oder die Verteilung der EGFRvIII-immunreaktiven Vesikel (Abb. 8).

3.2.4 Untersuchungen zum Cetuximab-vermittelten Zellüberleben

Um festzustellen, ob Cetuximab einen Einfluss auf das Zellüberleben hat, wurden die Proliferation, der Zellmetabolismus und die DNA-Neusyntheserate der EGFRvIII-exprimierenden Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht. Als Kontrolle wurde das Überleben der NR6-Zellen bestimmt (Abb. 9).

3.2.4.1 Einfluss von Cetuximab auf die Zellproliferation

Zunächst wurde untersucht, ob die Behandlung mit Cetuximab einen Einfluss auf die Zellzahl hat, die als Maß für die Zellproliferation verwendet wurde (Abb. 9A). Um die ermittelten Werte zu standardisieren, wurde der ermittelte Zahlenwert der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt und die Anzahl der Cetuximab-behandelten Zellen wurde in Relation zu diesem Wert bestimmt.

Eine dreitägige Cetuximab-Behandlung der NR6M-Zellen resultierte in der gleichen Zellzahl wie bei unbehandelten Zellen. Auch bei NR6-Zellen führte eine 72-stündige Inkubation mit Cetuximab zu keinen Unterschieden in der Anzahl der Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (Abb. 9A). Die Inkubation der NR6- und NR6M-Zellen mit humanem Immunglobulin für 72 h wies bezüglich der Zellzahl keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen auf (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.2 Einfluss von Cetuximab auf den Zellmetabolismus

Um zu überprüfen, ob eine 72-stündige Inkubation mit Cetuximab die metabolische Aktivität der EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen und der NR6-Kontrollzellen beeinflusst, wurde ein AlamarBlue-Assay durchgeführt (Abb. 9B). Mit Hilfe dieses Assays wird die Umsetzung des blauen, nicht-fluoreszierenden Farbstoffs Resazurin zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Farbstoff Resorufin fluorometrisch bestimmt. Die fluorometrisch ermittelte metabolische Aktivität unbehandelter Zellen wurde vor Zugabe von Cetuximab als 100 % angenommen. Die metabolische Aktivität der in Ab- oder Anwesenheit von Cetuximab für 72 h inkubierten Zellen wurde in Relation zu dem Wert der unbehandelten Zellen gesetzt.

Die Inkubation der NR6-Kontrollzellen mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Cetuximab wies keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die metabolische Zellaktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf. Der Metabolismus unbehandelter Zellen und der mit 50 µg/ml oder 100 µg/ml Cetuximab behandelten Zellen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die Inkubation der

EGFRvIII-exprimierenden Zellen mit der höchsten Konzentration an Cetuximab (500 µg/ml) resultierte dagegen in einer signifikant höheren metabolischen Aktivität (Abb. 9B). Die Inkubation der NR6- und NR6M-Zellen mit humanem Immunglobulin für 72 h zeigte die gleiche metabolische Zellaktivität wie bei unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.3 Einfluss von Cetuximab auf die DNA-Neusynthese

Um festzustellen, ob eine dreitägige Inkubation mit Cetuximab die DNA-Neusynthese der Zellen beeinflusst, wurden die Zellen mit dem Basenanalogen 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) inkubiert (Abb. 9C). Dieser Marker wird während der DNA-Neusynthese in die DNA eingebaut und kann mit Hilfe immunologischer Methoden nachgewiesen werden. Der Einbau von BrdU in die DNA kann durch proliferative Zellaktivität, aber auch DNA-Reparaturvorgänge erfolgen. Der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen wird nach einer 72-stündigen Inkubation in Ab- oder Anwesenheit von Cetuximab im Verhältnis zur gesamten Zellzahl bestimmt (Abb. 9C).

NR6-Kontrollzellen wiesen eine deutlich geringere DNA-Syntheserate auf als die EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen. Der Anteil BrdU-positiver NR6-Kontrollzellen lag bei circa 15 %. Die Inkubation dieser Zellen mit Cetuximab veränderte den Anteil neusynthetisierter DNA nicht. Die EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen wiesen einen deutlich höheren Anteil BrdU-positiver Zellen auf. Dieser lag bei circa 50 %. Die Inkubation dieser Zellen über einen Zeitraum von 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab resultierte in der gleichen DNA-Neusyntheserate wie die der unbehandelten Zellen (Abb. 9C).

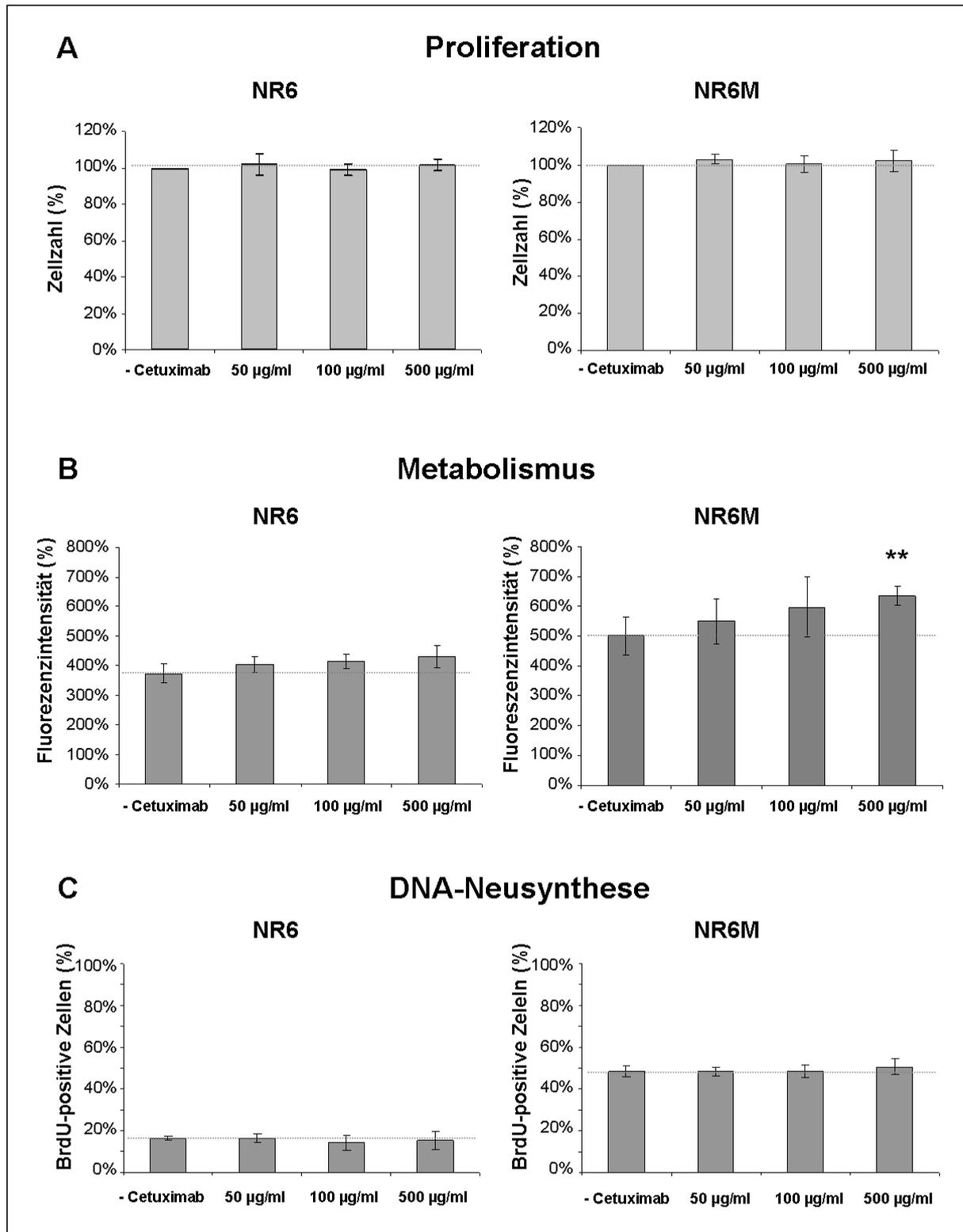


Abb. 9: Cetuximab-vermitteltes Zellüberleben der NR6- und NR6M-Zellen

NR6- und NR6M-Zellen wurden mit unterschiedlich Konzentrationen an Cetuximab (50 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml) für 72 h inkubiert oder unbehandelt gelassen (A-C). Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Kammer am Ende der Inkubation durch Auszählen ermittelt (A). Zur Bestimmung des Zellmetabolismus wurde die Umsetzung eines nicht-fluoreszierenden Farbstoffs zum fluoreszierenden Farbstoff fluorometrisch bestimmt. Diese AlamarBlue-Messung erfolgte nach einer dreitägigen Inkubation ohne oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab (B). Zur Bestimmung der

DNA-Neusyntheserate wurden die Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab fixiert und die DNA wurde mit HCl behandelt/angedaut. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden alle Zellkerne mit Hoechst 33342 markiert und zusätzlich die BrdU-positiven Zellkerne sichtbar gemacht. Die prozentuale Anzahl an BrdU-positiven Zellen wurde in Prozent angegeben (C). Graphische Darstellung von insgesamt drei Experimenten; ungepaarter t-Test; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit $(**) = p < 0,01$. In Relation gesetzt wurden jeweils unbehandelte (- Cet) mit Cetuximab-behandelten Zellen (50 µg/ml; 100 µg/ml; 500 µg/ml).

3.2.5 Einfluss von Cetuximab auf die subzelluläre Lokalisierung von Mitochondrien und EGFRvIII

Die Inkubation der NR6M-Zellen mit höheren Konzentrationen von Cetuximab führt zu einem Anstieg des fluoreszierenden Farbstoff Resorufin und somit der metabolischen Zellaktivität. Ein Anstieg der metabolischen Zellaktivität gilt als Maß für die mitochondriale Zellaktivität, da mit Hilfe des AlamarBlue-Assays die Aktivität bestimmter mitochondrialer Enzyme bestimmt wird [151]. Daher wurde der Einfluss der höchsten Cetuximab-Konzentration auf die mitochondriale Lokalisierung in NR6M-Zellen untersucht (Abb. 10).

In Abwesenheit von Cetuximab wird in den NR6M-Zellen nur eine geringe Kolokalisierung zwischen EGFRvIII und Tim 23, der als mitochondrialer Marker verwendet wurde, sichtbar. Die Inkubation der Zellen für eine Stunde mit Cetuximab führte zu einer erhöhten Kolokalisierung zwischen dem an Cetuximab gebundenen EGFRvIII und Tim 23. Das Ausmaß der Kolokalisierung zwischen diesen beiden Markern nahm während einer zweitägigen Inkubation der Zellen mit 500 µg/ml Cetuximab weiter stark zu (Abb. 10).

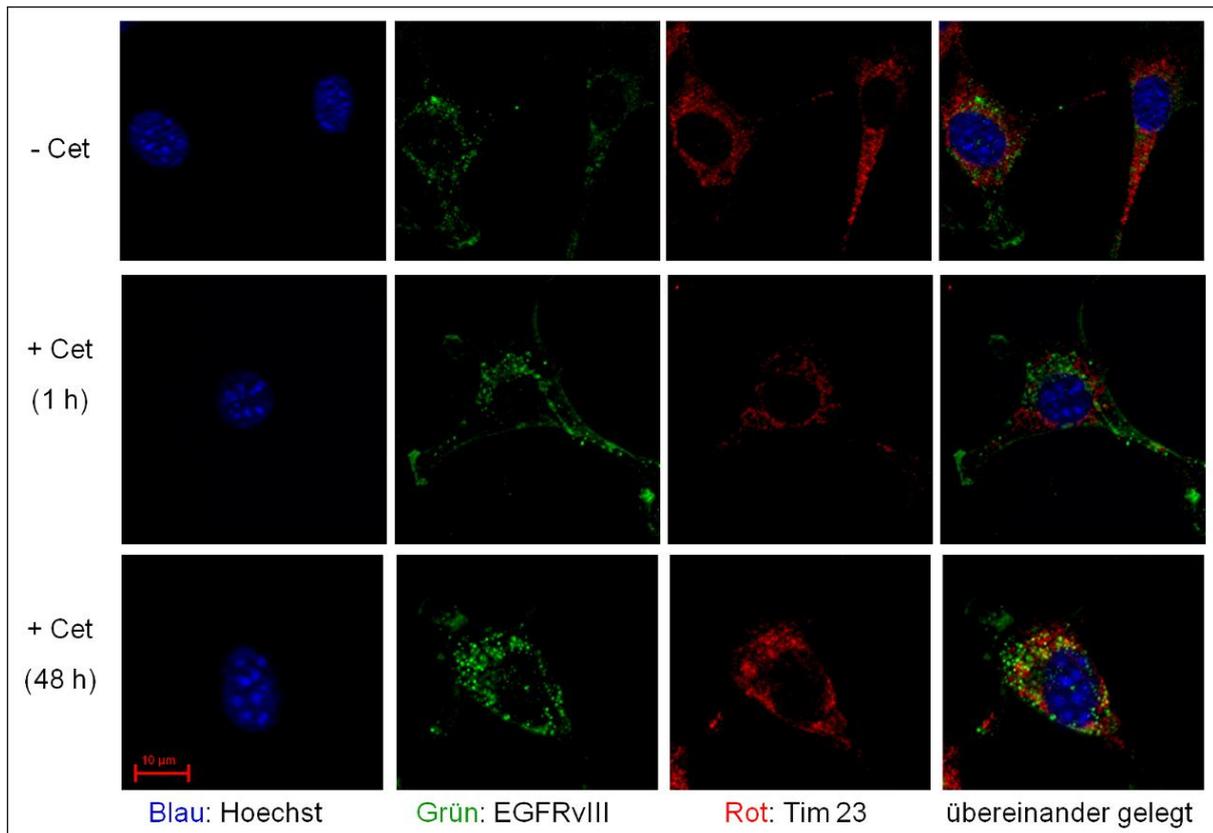


Abb. 10: Cetuximab-vermittelte Kolokalisierung von Cetuximab-gebundenem EGFRvIII und Mitochondrien

In Serum-haltigem Medium kultivierte EGFRvIII-exprimierende NR6M-Zellen wurden ohne oder mit Cetuximab [500 µg/ml] für 1 h oder 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz wurde EGFRvIII (grün) beziehungsweise Cetuximab-gebundenes EGFRvIII (grün) und Mitochondrien mit Tim 23 (rot) sichtbar gemacht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

Um sicher zu stellen, dass eine Cetuximab-Behandlung dieser Zellen tatsächlich zu einer Anreicherung von EGFRvIII in den Mitochondrien führt, wurde die mitochondriale Fraktion dieser Zellen analysiert. Dazu wurden die Mitochondrien nach einer 48-stündigen Inkubation in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab isoliert und mit Hilfe des Immunoblots wurden die dort vorhandenen Proteine sichtbar gemacht (Abb. 11).

Eine 48-stündige Inkubation der NR6M-Zellen mit Cetuximab hatte eine signifikant höhere Anzahl sowohl an Mitochondrien als auch an EGFRvIII zur Folge (Abb. 11A). Die Quantifizierung ergab, dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen die Proteinbande für den mitochondrialen Marker Tim23 um circa 40 % erhöht war und für EGFRvIII um circa 30 % (Abb. 11B).

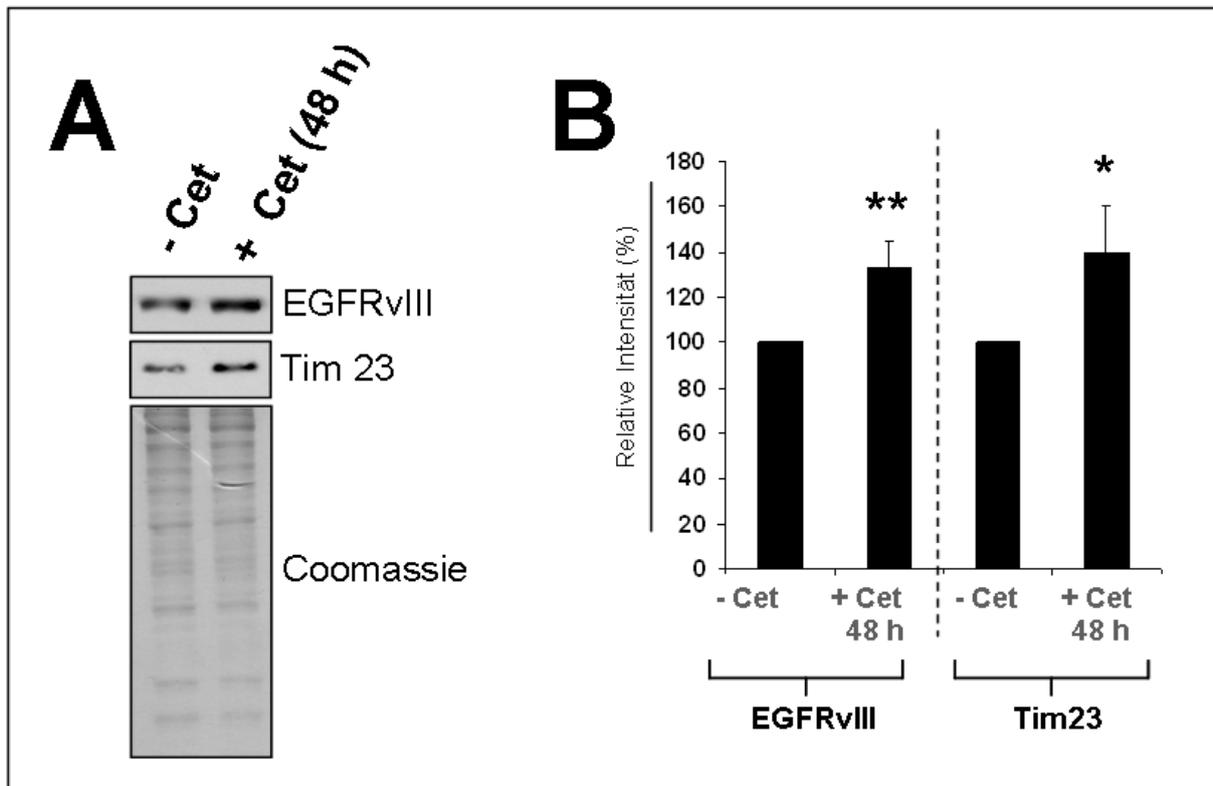


Abb. 11: Cetuximab-vermittelte Anreicherung des mitochondrialen Markers Tim23 und von EGFRvIII

EGFRvIII-exprimierende NR6M-Zellen wurden ohne oder mit Cetuximab (500 µg/ml) für 48 h inkubiert und die mitochondriale Fraktion wurde isoliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Immunoblot wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Zur Auswertung wurde das Gel mit dem Farbstoff Coomassie-Blau in saurerer Lösung gefärbt (A). Zusätzlich wurden die Ergebnisse von insgesamt drei unabhängigen Experimenten quantifiziert. Graphische Darstellung von insgesamt drei Experimenten; ungepaarter t-Test; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (**) = $p < 0,01$ und (*) = $p < 0,05$. In Relation gesetzt wurden jeweils unbehandelte (- Cet) mit Cetuximab-behandelten Zellen (+ Cet) (B).

3.3 Die *in vitro* Charakterisierung der Wirkungseffizienz von Cetuximab auf EGFR

3.3.1 Internalisierung von Cetuximab nach Bindung an EGFR

Zur Untersuchung der Cetuximab-induzierten Endozytose des EGF-Rezeptors wurden die in Serum-freiem Medium vorinkubierten NR6W-Zellen für 60 min mit Cetuximab behandelt (Abb. 12A). Als Kontrolle wurden die Zellen unbehandelt belassen. In unbehandelten Zellen ist die Lokalisierung der EGF-Rezeptoren auf die Plasmamembran beschränkt. Eine Inkubation der Zellen mit Cetuximab bewirkte eine Umverteilung der EGF-Rezeptoren von der Plasmamembran in Vesikel, welche ubiquitär im Zytoplasma verteilt waren. Die Vesikel entstehen durch die Bindung von Cetuximab an den EGFR und die darauffolgende Internalisierung dieser Rezeptor-Antikörper-Komplexe. Die Immuno-fluoreszenzfärbungen zeigen außerdem, dass die Größe der EGFR-haltigen Vesikel während der Cetuximab-Inkubation zugenommen hat (Abb. 12A). Als Kontrolle wurden NR6-Zellen mit Cetuximab behandelt. Hier fand sich - bei sehr geringer Expression von EGFR - keine Anfärbung nach Inkubation mit dem verwendeten Antikörper (Daten nicht gezeigt).

Experimente anderer Gruppen haben bereits demonstriert, dass eine Bindung von Cetuximab an EGFR zu dessen Internalisierung führt. Bisher wurde allerdings die Internalisierungsrate der EGFR-Rezeptoren noch nicht quantitativ bestimmt [104,111]. Um die Cetuximab-induzierte Internalisierungsrate zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörper behandelt, der die extrazelluläre Domäne von EGFR erkennt. Dieser Antikörper erkennt auch die extrazelluläre Domäne von EGFRvIII und wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits zur Untersuchung der Cetuximab-induzierten Internalisierungsrate von EGFRvIII verwendet (siehe Abb. 5B/C).

Auch hier wurde zunächst die Bindung des Antikörpers an EGFR-exprimierenden NR6W-Zellen untersucht und mit NR6-Zellen verglichen (Abb. 12B). Die Inkubation lebender Zellen mit dem an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa 647 gekoppelten 425(ScFv)SNAP-Antikörper führte zur dessen Bindung an die in der Plasmamembran lokalisierte Fraktion der EGF-Rezeptoren. Die NR6-Zellen wiesen, entsprechend ihrer sehr geringen EGFR-Expression, nur eine geringe Anzahl an Rezeptoren an der Zelloberfläche auf (Abb. 12B). Die NR6W-Zellen, die eine viel höhere Anzahl an EGF-Rezeptoren exprimieren, wiesen eine höhere EGFR-Anzahl

an der Zelloberfläche auf. Dies wird hierbei durch die stärkere Rechtsverschiebung der Fluoreszenzkurve (schwarze Glockenkurve) entlang der X-Achse sichtbar (Abb. 12B).

Zur Untersuchung der Cetuximab-induzierten Rezeptor-Internalisierungsrate wurden die EGFR-exprimierenden NR6W-Zellen mit EGF, Cetuximab oder einer Kombination beider Substanzen behandelt (Abb. 12C). Die Inkubation der NR6W-Zellen mit Cetuximab führte zur Abnahme der an der Oberfläche befindlichen Rezeptoren aufgrund der Rezeptor-Internalisierung. Sichtbar wurde dies in der FACS-Analyse durch eine Linksverschiebung der Fluoreszenzkurve entlang der X-Achse. Zudem kam es zu einer Veränderung des Kurvenverlaufs und somit zu einer Umverteilung der Färbeintensität. Dies wurde sichtbar in einer Abnahme der Kurvenhöhe und einer Verschiebung der rechten Kurvenhälfte zu höheren Fluoreszenzintensitäten hin entlang der X-Achse. Dieses Ergebnis zeigt an, dass bei einem Teil der Zellen eine höhere Menge an Rezeptoren auf der Zelloberfläche detektiert wurde (Abb. 12C, links).

Als nächstes wurde aus drei unabhängigen Messungen der Median des Fluoreszenzsignals statistisch ausgewertet (Abb. 12C, rechts). Die Auswertung ergab, dass die Behandlung der EGFR-exprimierenden NR6W-Zellen mit EGF zu einer Internalisierung von ca. 50 % der auf der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren geführt hat. Die Inkubation dieser Zellen mit Cetuximab in Ab- oder Anwesenheit von EGF hatte ebenfalls zur Folge, dass EGFR internalisiert wurde. Dies erfolgte jedoch in einem geringeren Maße, da die Anzahl der Rezeptoren an der Oberfläche nur um ca. 25 % reduziert wurde.

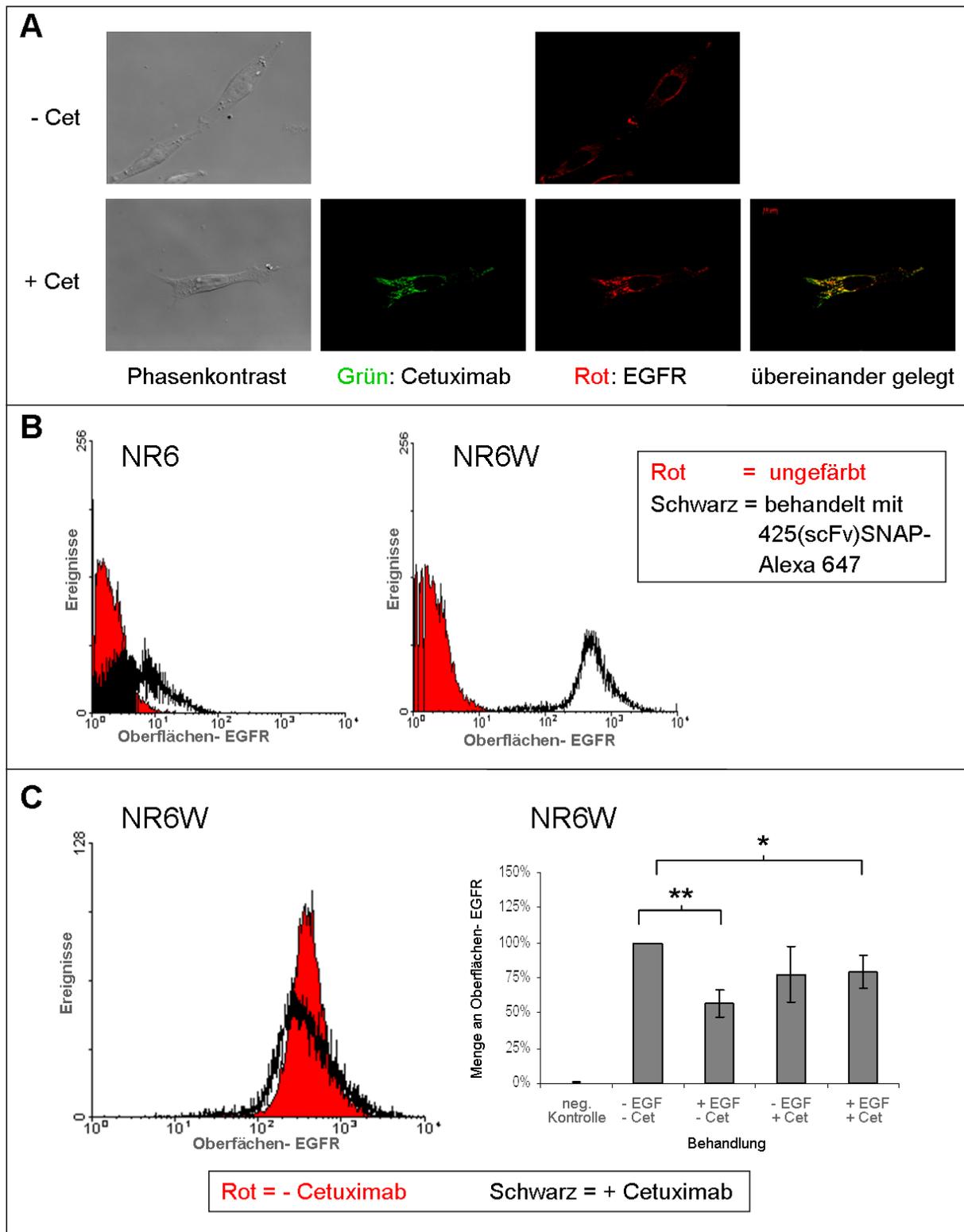


Abb. 12: Endozytose und Lokalisierung von EGFR nach Inkubation mit Cetuximab in NR6W-Zellen

Die in Serum-freiem Medium vorinkubierten EGFR-exprimierenden Zellen wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab [100 µg/ml] für 60 min behandelt. Die Zellen wurden daraufhin fixiert und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde Cetuximab (grün) und EGFR (rot) sichtbar gemacht (A). Um die Funktionalität des 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers zu untersuchen, wurden die in Serum-freiem Medium vorinkubierten NR6- und NR6W-Zellen in Ab- und Anwesenheit

dieses Antikörpers inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und die Konzentration der an der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren wurde durchflusszytometrisch bestimmt (B). Zur Bestimmung der Cetuximab-induzierten Internalisierungsrate wurden die in Serum-freiem Medium vorinkubierten EGFR-exprimierenden NR6W-Zellen unbehandelt gelassen oder für 10 min mit EGF (100 ng/ml), für 60 min mit Cetuximab (100 µg/ml) oder der Kombination beider Substanzen inkubiert. Danach wurde mit Hilfe des 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers durchflusszytometrisch die Konzentration der in der Zellmembran lokalisierten EGF-Rezeptoren bestimmt. In der neg. Kontrolle sind unbehandelte und ungefärbte (in Abwesenheit des Antikörpers inkubiert) Zellen dargestellt. Aus drei unabhängigen Messungen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität aufgetragen und mit Hilfe des ungepaarten t-Tests statistisch ausgewertet; (**) = $p < 0,01$ (C).

Es wurde zusätzlich in A431-Zellen die Lokalisierung der internalisierten EGF-Rezeptoren während der Behandlung mit Cetuximab untersucht (Abb. 13A). Unbehandelte Zellen zeigten eine zytoplasmatische Verteilung des EGFR. Eine einstündige Inkubation der Zellen mit Cetuximab führte zu Cetuximab-gebundenen EGF-Rezeptoren in zytoplasmatischen Vesikeln (Abb. 13A). Die anschließend durchgeführte FACS-Analyse mittels des 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers offenbarte, dass die Behandlung der A431-Zellen mit Cetuximab oder mit Cetuximab und EGF in einer Internalisierungsrate von ca. 30 % der Rezeptoren innerhalb der ersten Stunde resultierte (Abb. 13B). Die Inkubation der Zellen mit EGF führte hingegen zu einer Internalisierung von durchschnittlich 50 % der Rezeptoren. Somit fanden sich bei den Versuchen mit A431-Zellen ähnliche Ergebnisse wie mit NR6W-Zellen.

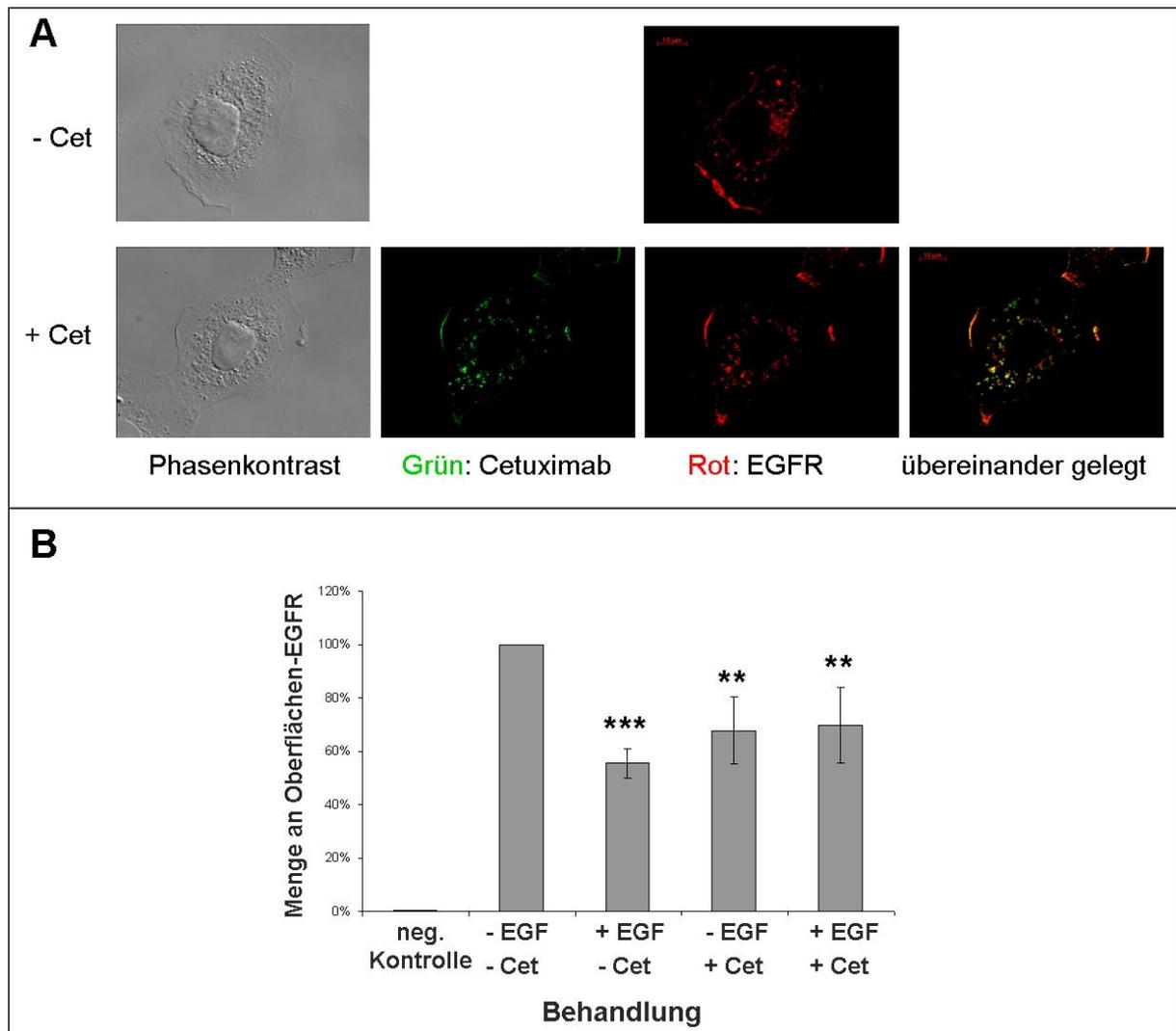


Abb. 13: Lokalisierung von EGFR in A431-Zellen nach Inkubation mit Cetuximab

EGFR-exprimierende A431-Zellen wurden in Serum-freiem Medium vorinkubiert und für 60 min mit Cetuximab (100 µg/ml) inkubiert oder unbehandelt belassen. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde Cetuximab (grün) und EGFR (rot) sichtbar gemacht (A). Zur Bestimmung der Cetuximab-induzierten Internalisierungsrate wurden die in Serum-freiem Medium vorinkubierten A431-Zellen für 10 min mit EGF (100 ng/ml), für 60 min mit Cetuximab (100 µg/ml) oder der Kombination beider Substanzen inkubiert. Als zusätzliche Kontrollen dienten ungefärbte (neg. Kontrolle) und unbehandelte (-EGF/- Cet) Zellen. Nach der Behandlung der Zellen wurde mit Hilfe des 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers die Konzentration der in der Zellmembran lokalisierten EGF-Rezeptoren durchflusszytometrisch bestimmt. Aus drei unabhängigen Messungen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität aufgetragen und mittels des ungepaarten t-Tests statistisch ausgewertet; (***) = $p < 0,001$ und (**) = $p < 0,01$. Dabei wurden unbehandelte Zellen (- EGF/- Cet) jeweils mit den EGF oder Cetuximab-behandelten Zellen verglichen (B).

3.3.2 Einfluss von Cetuximab auf Signaltransduktion von EGFR und seiner nachgeschalteten Faktoren

3.3.2.1 Eine einstündige Cetuximab-Behandlung hemmt die Liganden-induzierte Aktivierung von EGFR und von nachgeschalteten Faktoren Erk1/2 und STAT3

Zunächst wurden die Auswirkungen einer einstündigen Cetuximab-Inkubation in Abwesenheit oder Gegenwart von EGF auf die Aktivität von EGFR und dessen nachgeschalteter Signaltransduktionsfaktoren untersucht (Abb. 14).

Die mittels der NR6-Zellen erzielten Ergebnisse (Abb. 14A) wurden bereits weiter oben beschrieben (siehe Abb. 6A) und werden nur zur besseren Veranschaulichung dargestellt. Eine Inkubation der NR6W-Zellen mit Cetuximab oder EGF führt jedoch nicht zu einer Änderung der Gesamtmenge an EGFR (Abb. 14B).

Eine Stimulation der EGFR-exprimierenden NR6W-Zellen mit EGF hatte zur Folge, dass alle untersuchten Serin- und Tyrosinreste phosphoryliert wurden (Abb. 14B). Dies führte außerdem zu einer Aktivierung der Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3. Dabei war die Phosphorylierung von Erk1/2 und STAT3 (Tyr 705) besonders stark ausgeprägt. Eine einstündige Inkubation der Zellen mit Cetuximab bewirkte allenfalls eine leichte Abnahme der EGFR-Phosphorylierung. Auch der Phosphorylierungsstatus der Signaltransduktions-faktoren blieb unverändert.

Eine zusätzliche Stimulation der Cetuximab-behandelten Zellen mit EGF verhinderte die Aktivierung des EGF-Rezeptors, so dass alle untersuchten Phosphorylierungsstellen am EGFR den gleichen Aktivitätsstatus aufwiesen wie die der EGFRs in den Cetuximab-behandelten Zellen. Eine zusätzliche Inkubation Cetuximab-behandelter Zellen mit EGF verhinderte die Aktivierung der Signaltransduktionsfaktoren Erk1/2 und STAT3.

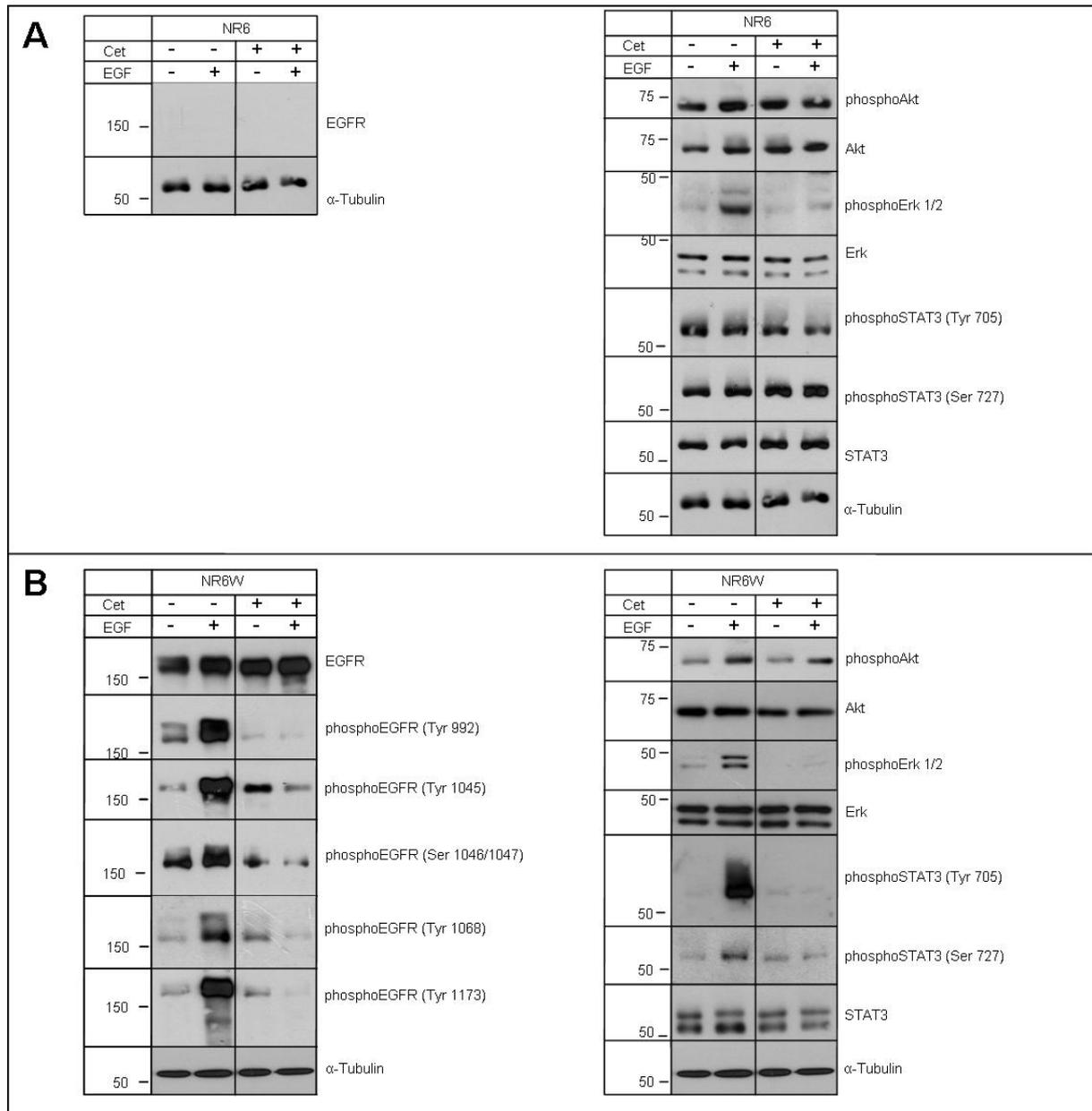


Abb. 14: Darstellung der Aktivität von EGFR und seiner Effektoren während einer einstündigen Inkubation mit Cetuximab in An- und Abwesenheit von EGF

In Serum-freiem Medium vorinkubierte Zellen wurden unbehandelt gelassen oder für 60 min mit Cetuximab (100 µg/ml), für 10 min mit EGF (100 ng/ml) oder mit der Kombination beider Substanzen inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und die Proteine extrahiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und nach Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

Die Stimulation von A431-Zellen mit EGF für 10 min, Cetuximab für 60 min oder der Kombination beider Substanzen zeigte, dass die Anwesenheit von Cetuximab die Liganden-abhängige Aktivierung sowohl von EGFR als auch der Signaltransduktionsfaktoren Erk1/2 und STAT3 verhindert (Daten nicht gezeigt). Zudem bewirkte eine 60-minütige Inkubation mit Cetuximab keine deutliche

Abnahme der EGFR-Phosphorylierung oder seiner Signaltransduktionsfaktoren im Vergleich zu unbehandelten A431-Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.2 Eine dreitägige Cetuximab-Behandlung hemmt die Aktivität des EGFR und der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt und Erk1/2, erhöht jedoch die Aktivität von STAT3

Zur Untersuchung längerfristiger Effekte von Cetuximab auf EGFR-exprimierende Zellen wurden NR6W-Zellen mit Cetuximab in Gegenwart von 10 % Serum für 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 48 h oder 72 h behandelt (Abb. 15B). Das verwendete fetale Kälberserum enthält unter anderem BSA (bovine calf serum), und verschiedene Hormone sowie Wachstumsfaktoren, die unterschiedliche Signaltransduktionsfaktoren aktivieren können. Da Tumorgewebe im menschlichen Körper jedoch von Blut und somit auch von Serum umspült wird, entspricht die Inkubation der Zellen mit Cetuximab in Gegenwart von Serum möglicherweise mehr der Situation *in vivo*. NR6W-Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Die mit diesen Zellen erzielten Ergebnisse wurden bereits beschrieben (siehe Abb. 7A), sind jedoch zur besseren Veranschaulichung nochmals abgebildet (Abb. 15A).

Die Inkubation der EGFR-exprimierenden NR6W-Zellen mit Cetuximab zeigte sowohl eine Abnahme der Gesamtmenge an EGFR als auch der Phosphorylierung an allen untersuchten Tyrosinresten des EGFR (Abb. 15B, links). Eine Behandlung mit Cetuximab führte jedoch zu einer Aktivierung der Serinreste 1046/1047. Des Weiteren hatte die Cetuximab-Behandlung eine Abnahme der Aktivierung von Akt und Erk1/2 zur Folge. Überraschend war, dass 24 h, 48 h und 72 h nach Cetuximab-Gabe sowohl die Expressionslevel von STAT3 als auch dessen Aktivierung durch Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 stark zunahm (Abb. 15B, rechts). Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit humanem Immunglobulin (IgG) über einen Zeitraum von 72 h änderte hingegen weder die Aktivierung von EGFR noch die seiner nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation von A431-Zellen mit Cetuximab für 24 h, 48 h und 72 h resultierte in einem Anstieg sowohl der Gesamtmenge an STAT3 als auch der STAT3-Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 (Daten nicht gezeigt).

unbehandelten Zellen jedoch auch während einer sechstägigen Inkubation mit Cetuximab deutlich reduziert (Abb. 16).

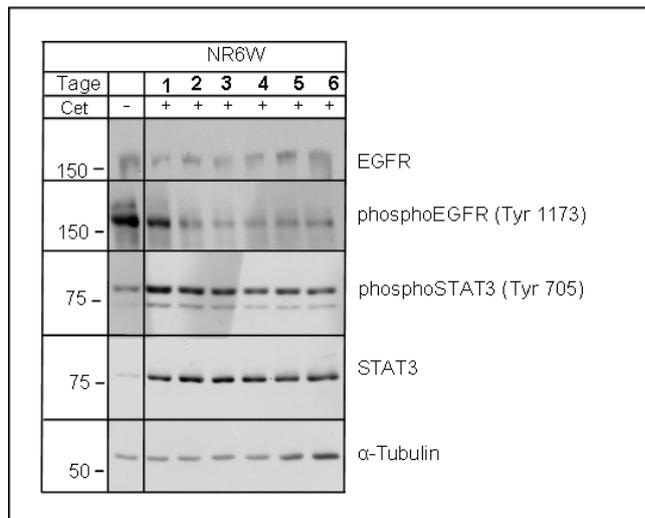


Abb. 16: Darstellung der Aktivität von EGFR und STAT3 während einer sechstägigen Inkubation mit Cetuximab in Serum-haltigem Medium

Die in Serum-haltigem Medium kultivierten Zellen wurden für 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d oder 6 d mit Cetuximab (100 μ g/ml) inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen in Abwesenheit von Cetuximab für 6 d belassen. Nach der daraufhin folgenden Zellyse, wurden die Proteine extrahiert und mit der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Western-Blot-Verfahren mit

Hilfe spezifischer Antikörper diente der Detektion von EGFR, STAT3 und α -Tubulin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

Um festzustellen, ob die eben gezeigten Effekte von Cetuximab auf den EGF-Rezeptor und seine nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren unabhängig von den im Serum vorhandenen Faktoren sind, wurden die NR6W-Zellen zusätzlich im Medium ohne Serum für bis zu 72 h inkubiert (Abb. 17). Auch hier konnte gezeigt werden, dass Cetuximab die Phosphorylierung aller Tyrosinreste hemmte und zu einer stärkeren Phosphorylierung der beiden Serinreste führte. Die Inkubation mit Cetuximab resultierte jedoch in einer Abnahme der Phosphorylierung von Akt, Erk1/2 und STAT3. Die Phosphorylierung von STAT3 nahm nach einer 24-stündigen Cetuximab-Behandlung etwas zu, überstieg jedoch zu keinem Zeitpunkt die Ausgangsphosphorylierung (Abb. 17). Somit konnte gezeigt werden, dass Cetuximab alleine nicht zur Aktivierung von STAT3 führt. Die im Serum vorhandenen Faktoren müssen zusätzlich zur Cetuximab-Behandlung eine wichtige Rolle dabei spielen.

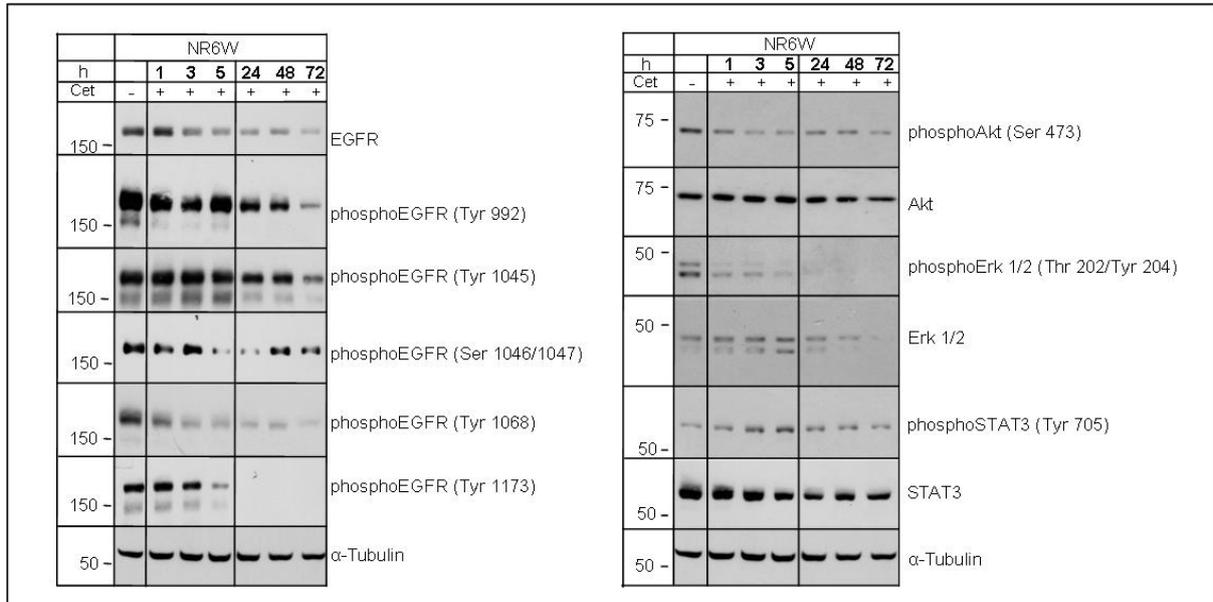


Abb. 17: Darstellung der Aktivität von EGFR und seiner Effektoren während einer dreitägigen Inkubation mit Cetuximab in Serum-freiem Medium

In Serum-freiem Medium kultivierte NR6W-Zellen wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab (100 μ g/ml) für 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 48 h oder 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Immunoblot wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

Um festzustellen, ob ausschließlich die Hemmung des EGF-Rezeptors zu einer stärkeren Phosphorylierung von STAT3 geführt hat, wurden NR6W-Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (20 μ M) im Serum-haltigem Medium für bis zu 72 h inkubiert (Abb. 18). Die Erlotinib-Behandlung resultierte in einer Abnahme der Phosphorylierung aller untersuchten Tyrosinreste des EGFR und einer stärkeren Aktivierung der beiden Serinreste des EGFR. Die Inkubation mit Erlotinib hemmte ebenfalls die Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3 (Abb. 18). Somit konnte gezeigt werden, dass die stärkere Phosphorylierung von STAT3 nicht durch eine einfache Hemmung des EGFR zu erklären ist, sondern spezifisch durch Cetuximab induziert wurde.

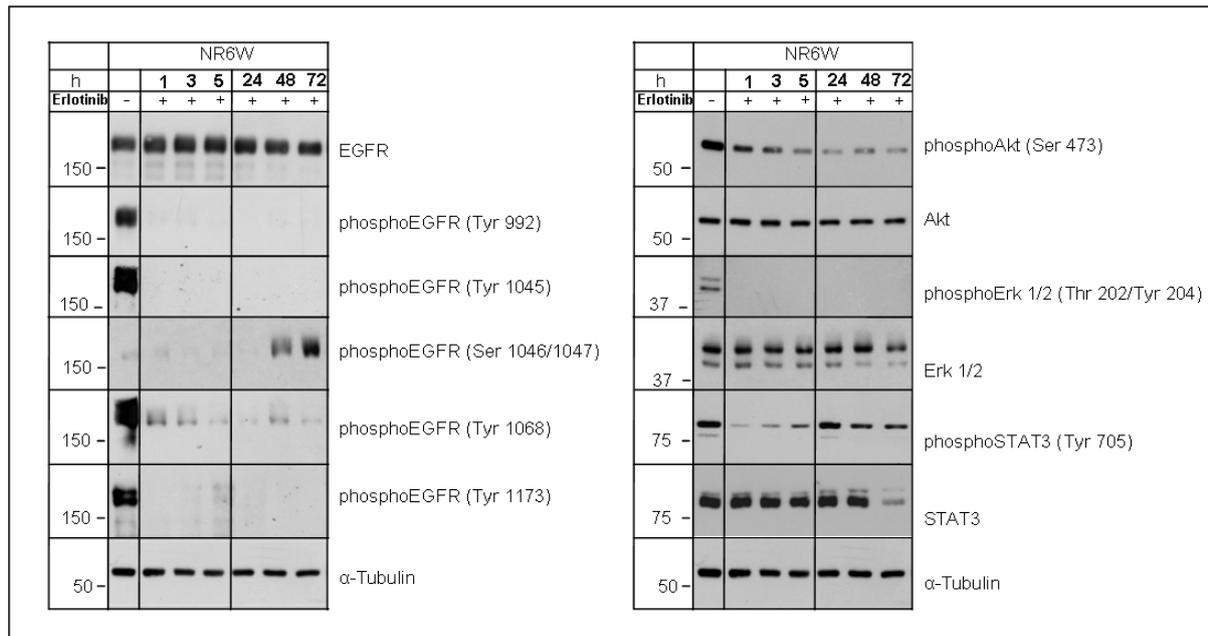


Abb. 18: Darstellung der Aktivität von EGFR und seiner Effektoren während einer dreitägigen Inkubation mit Erlotinib in Serum-haltigem Medium

In Serum-haltigem Medium kultivierte NR6W-Zellen wurden unbehandelt gelassen oder für 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 48 h oder 72 h mit Erlotinib (20 µM) inkubiert. Nach der daraufhin folgenden Zellyse, wurden die Proteine extrahiert und mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Western Blot-Verfahren diente mit Hilfe spezifischer Antikörper der Detektion von EGFR, Akt, Erk1/2, STAT3 und α-Tubulin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

3.3.3 Einfluss von Cetuximab auf die subzelluläre Lokalisierung von EGFR

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde untersucht, ob Cetuximab zur Änderung der subzellulären Lokalisierung von EGFR führt. Dazu wurden die NR6W-Zellen für 3 h, 5 h, 24 h und 48 h mit Cetuximab inkubiert (Abb. 19). Während einer 48-stündigen Behandlung der EGFR-exprimierenden NR6W-Zellen mit Cetuximab wurde beobachtet, dass die Menge an EGFR (rot) und an Cetuximab (grün) immer weiter abnahm. Dieses Ergebnis stimmt mit den im Immunoblot gewonnenen Daten überein. Auch dort zeigte eine zweitägige Inkubation mit Cetuximab eine Reduktion der Gesamtmenge an EGFR (Abb. 15B, links). Zudem wurde in den Ergebnissen der Immunofluoreszenz deutlich, dass zu jedem Zeitpunkt eine starke Kolo-kalisierung zwischen EGFR und Cetuximab vorhanden war, die in den übereinander gelegten Bildern als gelbe Punkte dargestellt ist (Abb. 19). Als positive Kontrolle wurden auch hier die A431-Zellen verwendet. Die Inkubation dieser Zellen mit Cetuximab resultierte ebenfalls in einer starken Reduktion der EGFR-Menge über einen

Zeitraum von 48 h. Ebenfalls war zu jedem Zeitpunkt die Koloalsation zwischen EGFR und Cetuximab vorhanden (Daten nicht gezeigt).

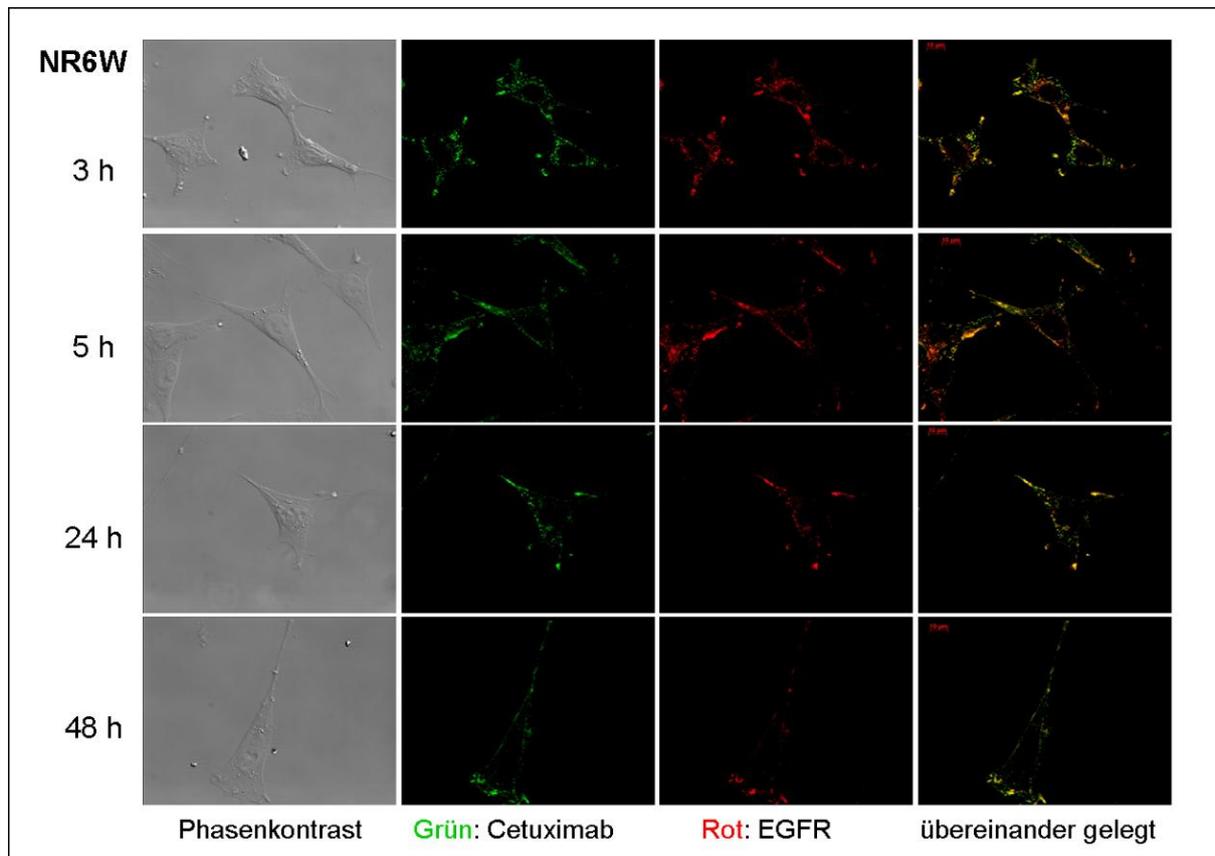


Abb. 19: Subzelluläre Lokalisierung von EGFR während einer zweitägigen Cetuximab-Inkubation

In Serum-haltigem Medium kultivierte EGFR-exprimierende Zellen wurden mit Cetuximab (100 µg/ml) für 3 h, 5 h, 24 h oder 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde Cetuximab (grün) und EGFR (rot) sichtbar gemacht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

3.3.4 Untersuchungen zum Cetuximab-vermittelten Überleben EGFR-exprimierender Zellen

Wie bereits dargelegt, nahm die Aktivierung der Tyrosinreste des EGF-Rezeptors während der Behandlung mit Cetuximab ab, jedoch resultierte die Behandlung nicht in einer generellen Abnahme der Phosphorylierung der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren. Auf der einen Seite nahm die Phosphorylierung von Akt und der MAP-Kinasen Erk1/2 deutlich ab, auf der anderen Seite nahm jedoch die Konzentration an STAT3-Proteinen und deren Phosphorylierung stark zu. Sowohl die Aktivierung von Akt und Erk1/2 als auch die von STAT3 spielen eine wichtige Rolle für das Zellüberleben. Um den Einfluss der genannten Signaltransduktionsfaktoren

während der Inkubation mit Cetuximab auf die Überlebensfähigkeit der EGFR-exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurden die Proliferationsrate, der Metabolismus und die DNA-Syntheserate der Zellen untersucht (Abb. 20 - Abb. 21). Als Kontrolle wurde das Überleben der NR6-Zellen bestimmt. Die mit den NR6-Zellen erzielten Ergebnisse wurden bereits beschrieben (siehe Abb. 9) und sie sind nur zur besseren Veranschaulichung nochmals abgebildet (Abb. 20).

3.3.4.1 Einfluss von Cetuximab auf die Zellproliferation

Zunächst wurde untersucht, ob Cetuximab einen Einfluss auf den Zellzuwachs und somit die Proliferationsrate hat (Abb. 20A). Es zeigte sich, dass die Behandlung der EGFR-exprimierenden Zellen ohne oder mit Cetuximab in einer konstanten Zellzunahme während der 72-stündigen Inkubationsdauer resultierte. Dabei war die Zellzunahme Cetuximab-behandelter Zellen jedoch vergleichbar mit der der unbehandelten Zellen (Abb. 20A). Zusätzlich wurde die Proliferationsrate von A431-Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen in Abwesenheit oder Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Cetuximab für 72 h behandelt (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Experiment war die Zellzunahme der Cetuximab-behandelten und –unbehandelten Zelle über den Zeitraum von 72 h etwa gleich (Daten nicht gezeigt).

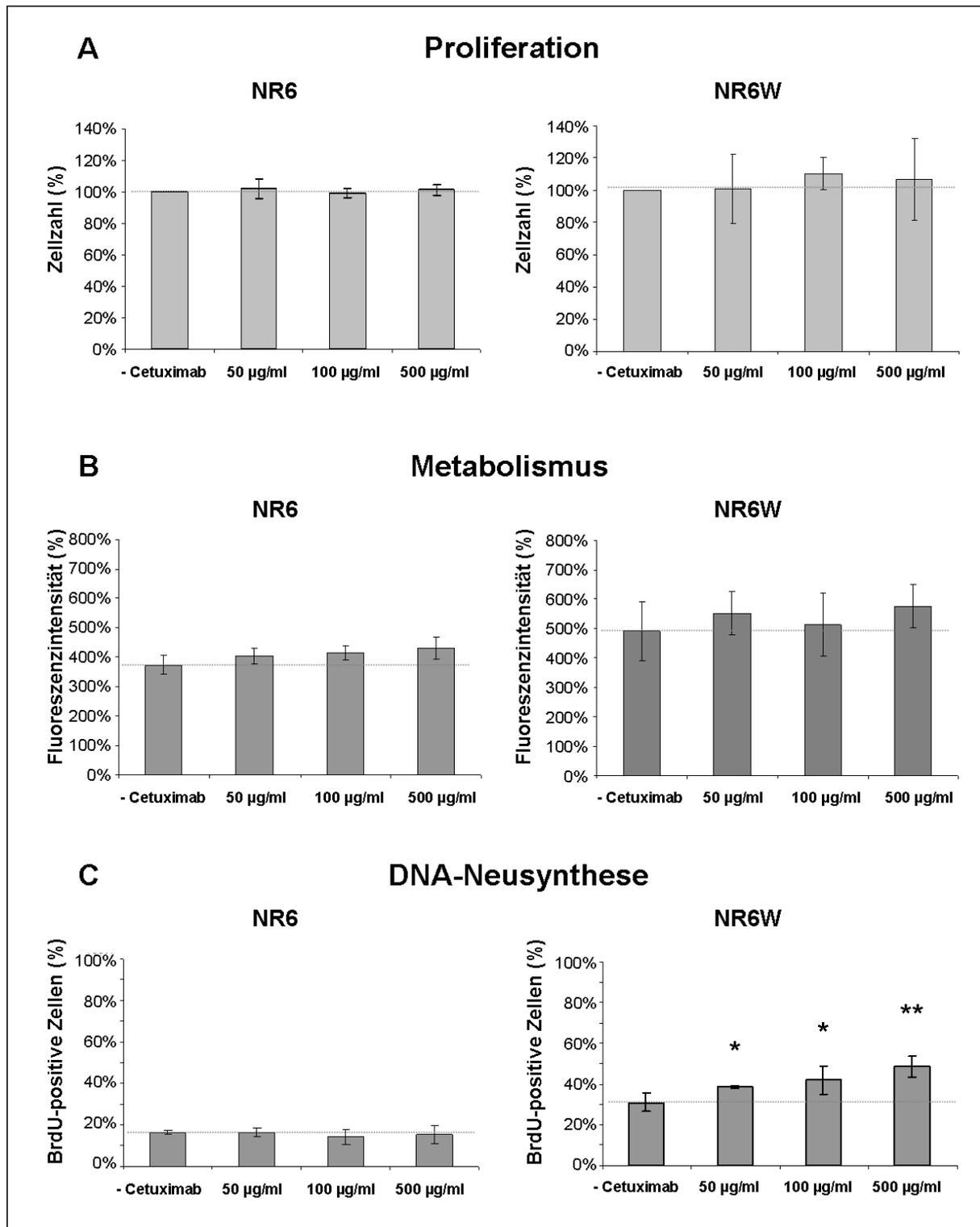


Abb. 20: Cetuximab-vermitteltes Zellüberleben der NR6- und NR6W-Zellen

NR6- und NR6W-Zellen wurden mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Cetuximab (50 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml) für 72 h inkubiert oder unbehandelt gelassen (A-C). Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Kulturschalen ausgesät, die mit einem definierten Gittermuster versehen sind, welches die Schale in 4 mm² große Quadrate einteilt. Daraufhin folgte die Inkubation ohne oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab (50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml). In zufällig ausgewählten Quadranten wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0, 24 h, 48 h und 72 h nach Cetuximab-

Gabe fotografiert und die Zellzahl wurde daraufhin durch Auszählen ermittelt (A). Zur Bestimmung der metabolischen Zellaktivität wurde die Umsetzung eines nicht-fluoreszierenden Farbstoffs zum fluoreszierenden Farbstoff flourometrisch bestimmt. Die AlamarBlue-Messung erfolgte nach einer dreitägigen Inkubation ohne oder mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Cetuximab (B). Zur Bestimmung der DNA-Neusyntheserate wurden die Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab fixiert und die DNA wurde denaturiert. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden alle Zellkerne mit Hoechst 33342 und das während der DNA-Synthese eingebaute mit Brom markierte Desoxyuridin (BrdU) angefärbt. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen wurde rechnerisch im Vergleich zu Gesamtzellzahl ermittelt (C). Graphische Darstellung von insgesamt drei Experimenten; ungepaarter t-Test; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (**) $= p < 0,01$ und (*) $= p < 0,05$. In Relation gesetzt wurden jeweils unbehandelte (- Cet) mit Cetuximab-behandelten Zellen (50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$).

3.3.4.2 Einfluss von Cetuximab auf den Zellmetabolismus

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine 72-stündige Inkubation EGFR-exprimierender Zellen mit Cetuximab die metabolische Aktivität der Zellen beeinflusst (Abb. 20B). Eine Inkubation der NR6W-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab für 72 h zeigte keine veränderte metabolische Zellaktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Als negative Kontrolle wurden NR6W-Zellen mit humanem Immunoglobulin für 72 h inkubiert. Der Zellmetabolismus der mit humanem IgG-behandelten Zellen unterschied sich nicht vom Wert unbehandelter Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine Inkubation von A431-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab führte ebenfalls nicht zu einem veränderten Zellmetabolismus im Vergleich zu unbehandelten A431-Zellen (Abb. 21A). Als zusätzliche Kontrolle wurden A431-Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib inkubiert (Abb. 21B). Die Inkubation dieser Zellen mit Erlotinib für 72 h verursachte eine Abnahme der metabolischen Zellaktivität auf fast 50 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Erlotinib wurde in einer PBS-Lösung, die einen pH-Wert von 2,0 besitzt, aufgelöst. Um auszuschließen, dass der niedrige pH-Wert der PBS-Lösung, die Abnahme der metabolischen Aktivität auslöst, wurden die A431-Zellen als Kontrolle in einer PBS-Lösung mit demselben pH-Wert inkubiert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der niedrige pH-Wert des PBS keinen Einfluss auf die metabolische Zellaktivität hatte (Abb. 21B).

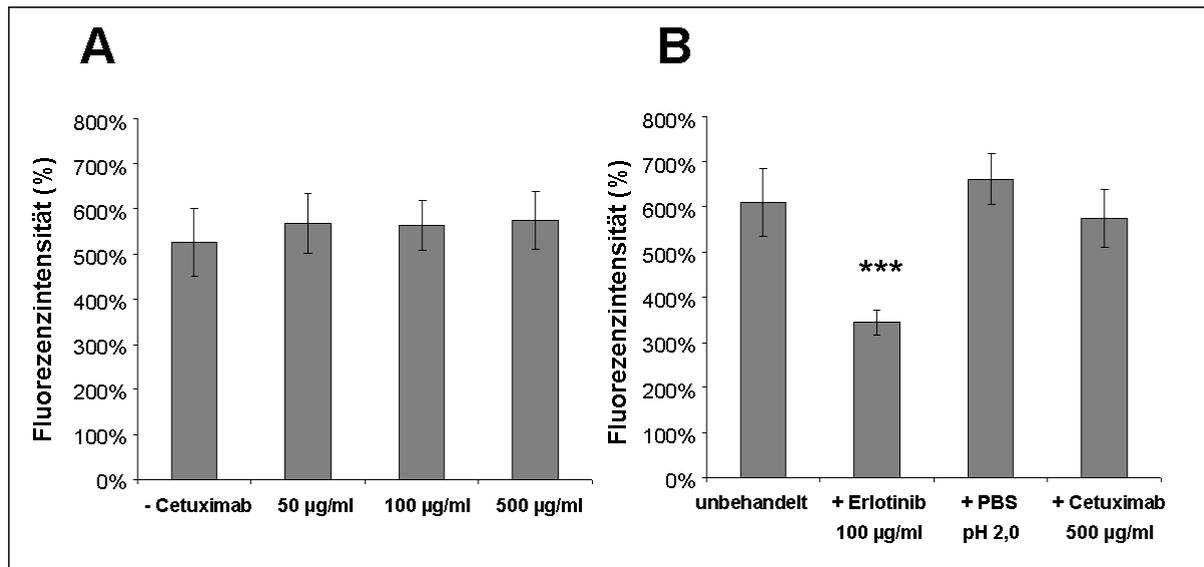


Abb. 21: Metabolische Aktivität der A431-Zellen während einer Inkubation mit Cetuximab und Kontrollsubstanzen

A431-Zellen wurden mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Cetuximab (50 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml) für 72 h inkubiert oder unbehandelt gelassen. Daraufhin erfolgte die AlamarBlue-Messung (A). Als Kontrolle wurde die metabolische Zellaktivität von A431-Zellen bestimmt, die für 72 h mit Erlotinib (20 µM), PBS (pH 2,0) oder Cetuximab (500 µg/ml) behandelt wurden (B). Die graphische Darstellung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten. Die Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (***) = $p < 0,001$. In Relation gesetzt wurden jeweils unbehandelte mit behandelten Zellen (Cetuximab, Erlotinib, PBS).

3.3.4.3 Einfluss von Cetuximab auf die DNA-Neusynthese

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine dreitägige Inkubation der Zellen mit Cetuximab einen Einfluss auf die DNA-Neusyntheserate der Zellen hat (Abb. 20C). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil BrdU-positiver NR6W-Zellen in Abwesenheit von Cetuximab durchschnittlich bei 31 % lag. Die Inkubation der NR6W-Zellen mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Cetuximab resultierte in einer konzentrationsabhängigen Zunahme an BrdU-positiven Zellen. In Gegenwart der höchsten Konzentration an Cetuximab nahm die DNA-Neusyntheserate der Zellen nach 72 h auf durchschnittlich 50 % zu (Abb. 20C). Eine Inkubation der A431-Zellen mit Cetuximab über einen Zeitraum von 72 h hatte ebenfalls einen Anstieg der Anzahl an BrdU-positiven Zellen zur Folge (Daten nicht gezeigt). Dabei stieg die DNA-Neusyntheserate von durchschnittlich 37 % von unbehandelten Zellen auf 45 % (50 µg/ml Cetuximab), 48 % (100 µg/ml Cetuximab) und sogar 62 % (500 µg/ml Cetuximab). Somit konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Anzahl BrdU-positiver A431-Zellen mit steigenden Konzentrationen

von Cetuximab korreliert. Als Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit humanem IgG behandelt (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass die dreitägige Inkubation der NR6W- oder A431-Zellen mit dem Immunglobulin die DNA-Neusyntheserate nicht veränderte.

3.3.5 Charakterisierung der Cetuximab-induzierten STAT3-Aktivierung in EGFR-exprimierenden Zellen

Die Überlebensassays offenbaren, dass Cetuximab die Proliferation und den Zellmetabolismus der NR6W- oder A431-Zellen nicht veränderte. Mit Hilfe der Abb. 15 und Abb. 16 wurde gezeigt, dass eine Inkubation mit Cetuximab zu einer erhöhten Expression und Aktivität von STAT3 führt. STAT3 ist wichtig für die Vermittlung des Zellüberlebens, der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation [44,50]. Aus diesem Grund hat sich die Frage gestellt, welche Rolle STAT3 während der Cetuximab-Inkubation spielt. Somit wurde der Einfluss der STAT3-Aktivierung auf die Proteine, die die Zellproliferation und das Zellüberleben steuern, überprüft.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der NR6W- und der A431-Zellen mit Cetuximab in einer erhöhten Anzahl an BrdU-positiven Zellen und somit einer vermehrten DNA-Neusyntheserate resultiert. Die DNA-Neusynthese und somit auch der Einbau von BrdU nehmen nicht nur während der Zellproliferation zu, sondern auch bei DNA-Reparaturvorgängen. In beiden Prozessen werden neue DNA-Fragmente gebildet. Somit wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein möglicher Einfluss von Cetuximab auf die DNA-Reparatur näher überprüft.

3.3.5.1 Beeinflussung der Proliferation und des Zellüberlebens durch die Aktivität der STAT3-Proteine

Zunächst wurde untersucht, ob Cetuximab auf der Proteinebene die Proliferation EGFR-exprimierender NR6W-Zellen unterstützt. Dazu wurde die Aktivierung des Proteins Cyclin D1, das während der Proliferation aktiv ist, untersucht. Dieses Protein fördert als Zellzykluspromotor während des Zellzyklus den Übergang von der G1- in die S-Phase. Zusätzlich wurde die Expression der Proteine Bcl-X_L und Bcl-2 betrachtet, da diese Proteine als wichtige Überlebensmarker fungieren (Abb. 22) [152,153,154].

Um die Aktivierung der Proliferation zu untersuchen, wurden NR6W-Zellen für 1 h, 24 h und 72 h mit Cetuximab inkubiert oder unbehandelt belassen (Abb. 22A). Während einer 72-stündigen Inkubation der NR6W-Zellen mit Cetuximab

veränderten sich die Gesamtmenge und der Phosphorylierungsstatus von Cyclin D1 nicht signifikant (Abb. 22A). Somit konnte gezeigt werden, dass Cetuximab die Proliferationsrate der NR6W-Zellen nicht beeinflusst. Die Behandlung der NR6W-Zellen für 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h mit Cetuximab resultierte auch nicht in der Änderung der Expression der Überlebensmarker Bcl-X_L und Bcl-2 (Abb. 22B).

Als nächstes wurde untersucht, wie wichtig das STAT3-Signal für die NR6W-Zellen und A431-Zellen ist. Dazu wurden die Zellen mit dem kleinen organischen Molekül Stattic (6-nitro-benzo[b]thiophene-1,1-dioxide 1) inkubiert. Stattic, dessen Name für STAT3-inhibierende Komponente (*STAT three inhibitory compound*) steht, blockiert die Funktion der SH2-Domäne von STAT3. Damit verhindert Stattic die Bindung von STAT3 an seine Zielproteine und somit auch dessen Aktivierung [155]. Eine Inkubation der NR6W- und der A431-Zellen mit 10 µM, 20 µM oder 30 µM Stattic führte innerhalb von 24 h zum Zelltod (Daten nicht gezeigt). Auch sehr geringe Konzentrationen an Stattic, wie beispielsweise 5 µM, überlebten die Zellen nicht (Daten nicht gezeigt). Es ist bereits bekannt, dass in Krebszellen das STAT3-Signal überlebenswichtig sein kann und somit das Ausschalten des STAT3-Proteins zum Zelltod durch Apoptose führt [156]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass eine Inkubation der STAT3-abhängigen Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231 mit 10 µM Stattic bereits nach 24 h Zellapoptose induziert [155].

Im Gegensatz zu normalen Zellen, in denen STAT3 nur transient phosphoryliert wird, ist STAT3 in verschiedenen Tumoren konstitutiv aktiv [157]. Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von STAT3 signifikant stärker in den EGFR-exprimierenden A431- und NR6W-Zellen ausfällt als in den wtU87MG-Zellen, die aus einem Glioblastom gewonnen wurden (Daten nicht gezeigt). Diese humane Zelllinie exprimiert, aufgrund der stabilen Transfektion mit einem EGFR-tragendem Plasmid eine hohe Anzahl an EGF-Rezeptoren (wtU87MG) [142,158].

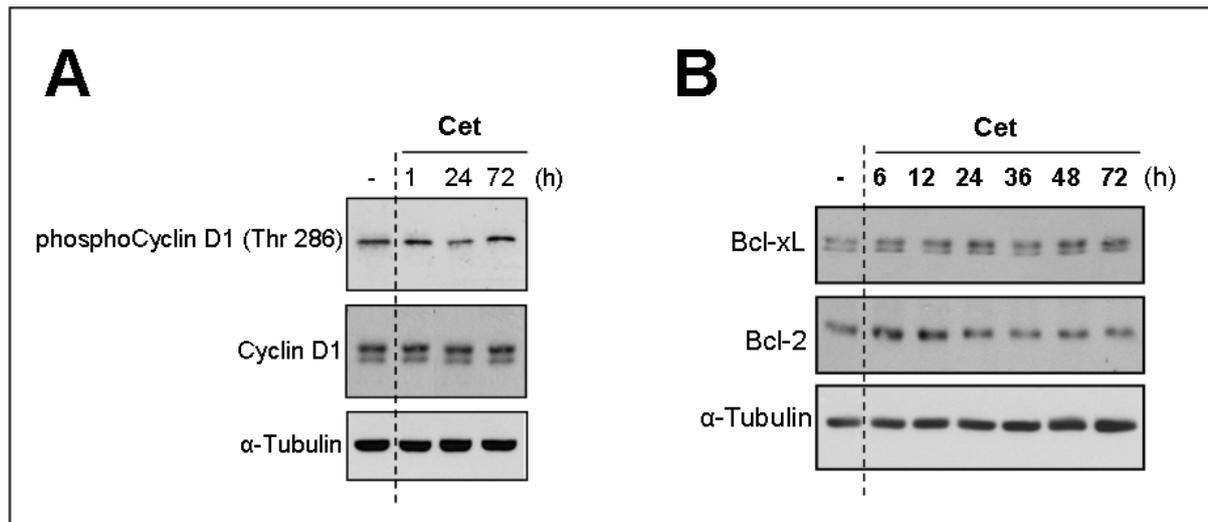


Abb. 22: Darstellung der Cetuximab-spezifischen Aktivierung von Proteinen, die Proliferation und Zellüberleben anzeigen

In Serum-haltigem Medium kultivierte NR6W-Zellen wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab (100 µg/ml) für 1 h, 24 h und 72 h (A) oder für 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h (B) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Immunoblot wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten.

3.3.5.2 Beeinflussung der DNA-Neusynthese durch Aktivität der STAT3-Proteine

Im Folgenden wurde untersucht, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Phosphorylierung von STAT3 und der Anzahl BrdU-positiver Zellen bei Cetuximab-Gabe. Dazu sollte zunächst geklärt werden, ob die Hemmung der STAT3-Aktivität bei gleichzeitiger Gabe von Cetuximab die Rate der DNA-Neusynthese beeinflusst. Wie oben bereits gezeigt (3.3.5.1), löste die Inkubation mit Stattic den Zelltod aus. Daraufhin sollte die Phosphorylierung von STAT3 durch AG490 (2-Cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(benzyl)-2-propenamide), einen Tyrosinkinase-Inhibitor, gehemmt werden. Die Inkubation mit AG490, führte jedoch nicht zur Hemmung der STAT3-Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Somit konnte in dieser Arbeit der direkte Einfluss von STAT3 auf die DNA-Neusynthese nicht untersucht werden.

Einen Hinweis auf den Einfluss von STAT3 auf die DNA-Neusynthese lieferten die wtU87MG-Zellen (Abb. 23). Eine Inkubation dieser Zellen mit Cetuximab über einen Zeitraum von 72 h resultierte sowohl in einer Abnahme der Gesamtmenge an EGFR als auch der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an den untersuchten Tyrosin-(Y994, Y1045, Y1068 und Y1173) und Serinresten (S1046/1047). Dabei wurde repräsentativ Y1173 für alle untersuchten Phosphorylierungsstellen des EGFR

dargestellt (Abb. 23A). Zudem hatte die Behandlung dieser Zellen mit Cetuximab zur Folge, dass die Phosphorylierung von STAT3 (Y705) abnahm. Zellen, die in Gegenwart von Cetuximab inkubiert wurden, wiesen zudem eine geringere BrdU-Markierung und somit eine signifikant geringere DNA-Neusyntheserate auf (Abb. 23B). Somit ist möglich, dass STAT3 einen Einfluss auf die DNA-Neusynthese hat. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies jedoch nicht aufgeklärt werden.

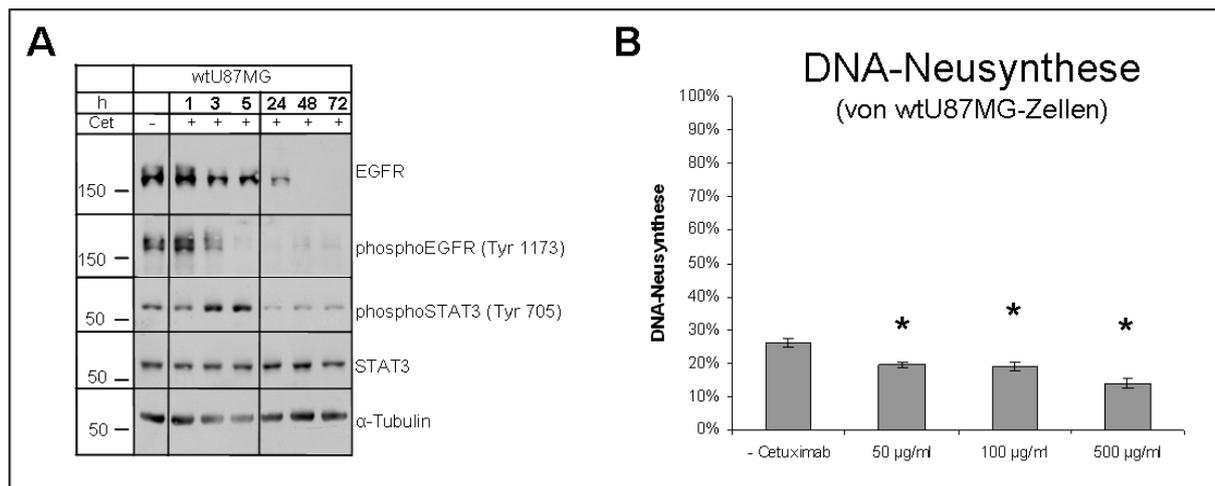


Abb. 23: Einfluss von Cetuximab auf die Proteinexpression und DNA-Neusynthese

In Serum-haltigem Medium kultivierte Zellen wurden unbehandelt gelassen oder für 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 48 h oder 72 h mit Cetuximab (100 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Proteine wurden extrahiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und nach Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (A). Zur Bestimmung der DNA-Neusyntheserate wurden die Zellen 72 h ohne oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab [50 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml] inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz die Zellkerne mit Hoechst 33342 blau und das Eingebaute BrdU rot angefärbt. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen wurde rechnerisch im Vergleich zur Gesamtzahl ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test von insgesamt drei Experimenten; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (*) = $p < 0,05$ (B). In Relation gesetzt wurden jeweils unbehandelte (- Cet) mit Cetuximab-behandelten Zellen (50 µg/ml; 100 µg/ml; 500 µg/ml).

3.3.5.3 Cetuximab-induzierte DNA-Reparatur

Als Antwort auf DNA-Schädigung werden in der Zelle bestimmte Signalwege aktiviert. Bei einer geringgradigen DNA-Schädigung wird die DNA-Reparatur initiiert, wo hingegen bei einer massiven Schädigung der DNA die Apoptose ausgelöst wird [159]. Um festzustellen, ob Cetuximab zur Schädigung der DNA führt, wurden NR6W-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von Cetuximab für 1 h oder 48 h inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen für 1 h UVC-Strahlung ausgesetzt (Abb. 24A). Hierbei

wurde getestet, ob eine vorhandene DNA-Schädigung zur Aktivierung der beiden Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated kinase*) am Serinrest 1981 oder ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase*) am Serinrest 428 führt, die als Antwort auf DNA-Schädigung oder Replikationsblockade aktiviert werden [160,161]. Mit Hilfe des Immunoblots konnte die Phosphorylierung der ATM-Kinase nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen nahm die Aktivierung der ATR-Kinase während der Inkubation mit Cetuximab leicht ab (Abb. 24A). Zielproteine der ATM- und ATR-Kinasen sind unter anderem die Proteine Chk1 (*checkpoint kinase 1*) und Chk2 (*checkpoint kinase 2*). Die Phosphorylierung von Chk1 wird bei vorhandener Schädigung der DNA am Serinrest 280 und 296 initiiert. Die Aktivierung von Chk2 kann an sieben verschiedenen Serin- und Threoninresten, einschließlich des Threoninrestes 68 erfolgen, wenn DNA-Schädigung z.B. durch UVC-Strahlung ausgelöst wird [162,163,164]. Eine Inkubation der NR6W-Zellen mit Cetuximab resultierte in der Phosphorylierung von Chk1, jedoch nicht Chk2. Die Phosphorylierung der Chk2-Kinase konnte erst während einer einstündigen UVC-Strahlung detektiert werden (Abb. 24A). Das Protein p53 kann sowohl durch die Aktivierung der ATM- als auch der ATR-Kinase am Serinrest 15 phosphoryliert werden [165,166]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der NR6W-Zellen mit Cetuximab die Phosphorylierung von p53 zur Folge hatte (Abb. 24A). In der Literatur wurde beschrieben, dass das Protein Chk2 zur Phosphorylierung des Proteins BRCA1 (*breast cancer susceptibility protein*) am Serinrest 1524 führen kann. Die Inkubation der NR6W-Zellen mit Cetuximab zeigte keine Aktivierung von BRCA1. Im Gegensatz dazu initiierte die UVC-Strahlung eine Phosphorylierung von BRCA1 in NR6W-Zellen (Abb. 24A). Weiterhin kann eine Aktivierung der ATM-Kinase zur Phosphorylierung des Histons H2A.X am Serinrest 139 führen [167,168]. Eine Inkubation der NR6W-Zellen mit Cetuximab zeigte keine stärkere Phosphorylierung des Histons H2A.X, allerdings resultierte das ultraviolette Licht in einer stärkeren Phosphorylierung dieses Proteins (Abb. 24A). Es wurde ebenfalls in der Gegenwart von Cetuximab die stärkere Phosphorylierung von Chk1 und p53 in der humanen A431-Zelllinie nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung von Chk1 und p53 Cetuximab-spezifisch auftritt, wurden NR6W-Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib für 1 h und 48 h inkubiert (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte gezeigt werden, dass Erlotinib

nicht zur Phosphorylierung dieser beiden Proteine geführt hat und somit die Aktivierung von Chk1 und p53 Cetuximab-spezifisch ist.

Als nächstes wurde mit Hilfe des Comet-Assays die DNA-Schädigung Cetuximab-behandelter Zellen sichtbar gemacht. UVC-Strahlung verursacht UV-spezifische Basenschädigung, wie beispielsweise Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) oder die sogenannten (6-4) Fotoprodukte (6-4PPs), die in Doppelstrangbrüchen resultieren [169,170]. Je mehr DNA-Schädigung in einer Zelle ausgelöst wird, umso mehr DNA-Strangbrüche treten auf. Diese daraus resultierenden kurzen DNA-Fragmente können dann in einem Agarosegel aufgetrennt und detektiert werden. Dazu wurden NR6W-Zellen in Abwesenheit von Cetuximab inkubiert oder für 1 h und 48 h mit Cetuximab behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit UVC-Licht für 1 h bestrahlt (Abb. 24B). Eine Bestrahlung der Zellen mit UVC-Licht resultierte in einer signifikant höheren Anzahl an kurzen DNA-Fragmenten, das heißt einer starken DNA-Schädigung (Abb. 24B/C). Die alleinige Inkubation der Zellen mit Cetuximab führte jedoch nicht zur Entstehung von DNA-Fragmenten. Es konnte sogar gezeigt werden, dass Cetuximab-unbehandelte Zellen eine signifikant höhere DNA-Schädigung aufwiesen als Cetuximab-behandelte Zellen. Sichtbar wurde dies in der höheren Fluoreszenzintensität des Comet-Schwanzes im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 24B/C).

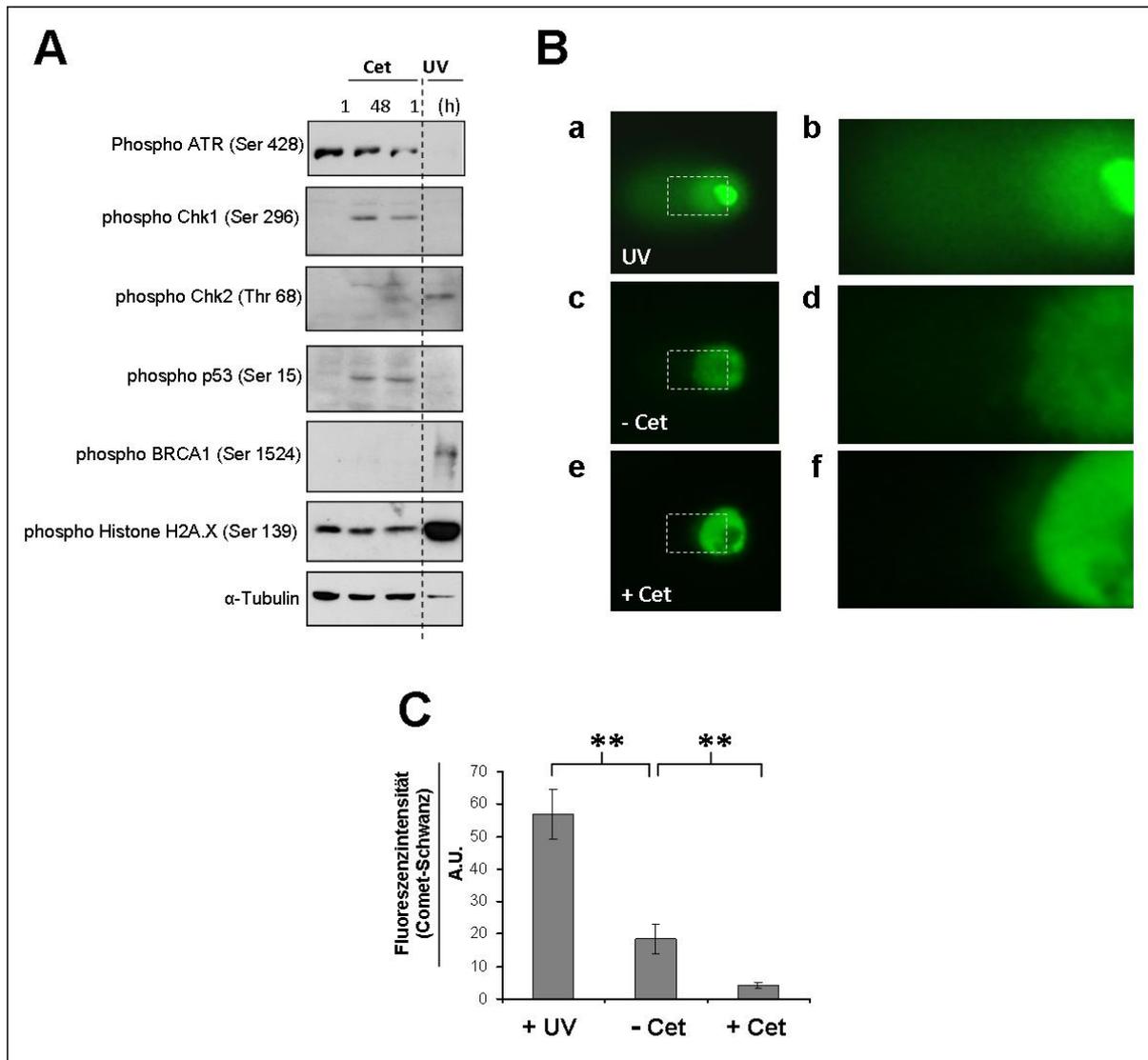


Abb. 24: Darstellung der Cetuximab-spezifischen Aktivierung der DNA-Schädigung

In Serum-haltigem Medium kultivierte Zellen wurden unbehandelt gelassen oder für 1 h, 24 h, 48 h oder 72 h mit Cetuximab (100 μ g/ml) inkubiert. Als positive Kontrolle für DNA-Schädigung wurden die Zellen für 1 h UV-Licht ausgesetzt. Darauf folgte die Zellyse und mit Hilfe von Western Blot wurden mit spezifischen Antikörpern die oben gezeigten Proteine detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten (A). NR6W-Zellen wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 μ g/ml Cetuximab (48 h) oder UV (1 h) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Agarose eingebettet, die Zellen wurden lysiert und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde markiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops fotografiert (B). Für die Quantifizierung des Comet-Schwefes wurden pro Ansatz 20 Zellen ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test von insgesamt drei Experimenten; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (**) = $p < 0,01$ (C).

Somit konnten zwar Proteine wie Chk1 und p53 als Folge von DNA-Schädigung aktiviert werden, eine DNA-Schädigung war jedoch nicht nachweisbar. Es wurde bereits gezeigt, dass die Proteine Chk1 und p53 ebenfalls eine wichtige Rolle bei der

DNA-Reparatur spielen [171,172]. Zudem wurde kürzlich ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von STAT3 und der Eme1-vermittelten DNA-Reparatur hergestellt. Dabei interagiert Eme1 (*essential meiotic endonuclease 1*) mit Mus81 (*methyl methanesulfonate-sensitive UV-sensitive 81*) zur heterodimeren Endonuklease. Diese repariert während der Replikation entstandene Schäden in der DNA [173,174]. Daraufhin wurde untersucht, ob die Behandlung der NR6W-Zellen mit Cetuximab in einer Änderung der Eme1-Expressionslevel resultiert (Abb. 25A). Auch hierbei wurden die Zellen in Abwesenheit von Cetuximab oder für 1 h, 24 h und 72 h mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert. Im Immunoblot wurde sichtbar, dass Cetuximab bereits innerhalb einer Stunde zu einer stark erhöhten Expression von Eme1 geführt hat, die auch über den Zeitraum von 72 h bestehen blieb (Abb. 25A und Quantifizierung C).

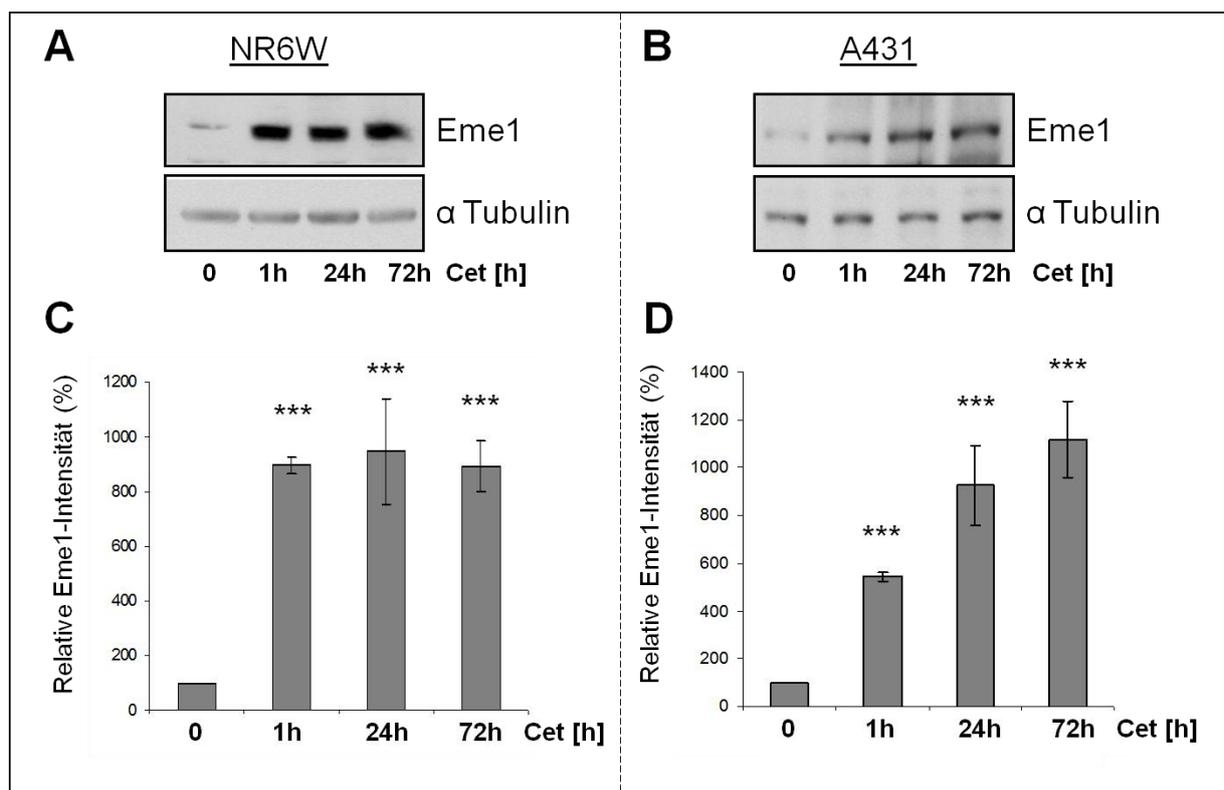


Abb. 25: Einfluss von Cetuximab auf das DNA-Reparatur-Protein Eme1

In Serum-haltigem Medium kultivierte Zellen wurden für 1 h, 24 h oder 72 h mit Cetuximab (100 µg/ml) oder ohne Cetuximab für 72 h inkubiert. Darauf folgte die Zellyse. Mit Hilfe spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion der oben gezeigten Proteine. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (A/B). Für die Quantifizierung wurden drei Western Blots verwendet. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test verwendet; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (***) = $p < 0,001$ (C/D). In Relation gesetzt wurden jeweils unbehandelte (0 h) mit Cetuximab-behandelten Zellen (1 h, 24 h, 72 h).

Die Inkubation mit Cetuximab resultierte ebenfalls in einer starken Zunahme an Eme1 in A431 Zellen (Abb. 25B und Quantifizierung in D). Damit wurde gezeigt, dass die Behandlung EGFR-exprimierender Zellen mit Cetuximab die Aktivierung eines für die DNA-Reparatur verantwortlichen Proteins zur Folge hatte. Um zu zeigen, dass Eme1 auch tatsächlich zur DNA-Reparatur führen kann, wurde zunächst untersucht, ob sich dieses Protein tatsächlich im Zellkern vorfinden lässt. Dazu wurden NR6W-Zellen 48 h lang in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab inkubiert und mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz wurde Eme1 sichtbar gemacht (Abb. 26A). Eine 48-stündige Cetuximab-Behandlung der NR6W-Zellen hatte zur Folge, dass eine signifikant höhere Menge an Eme1 im Zellkern vorhanden war (Abb. 26A). Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität des Zellkern-ständigen Eme1 zeigte ebenfalls, dass Cetuximab zu einer Anhäufung von Eme1 im Zellkern führte (Abb. 26B).

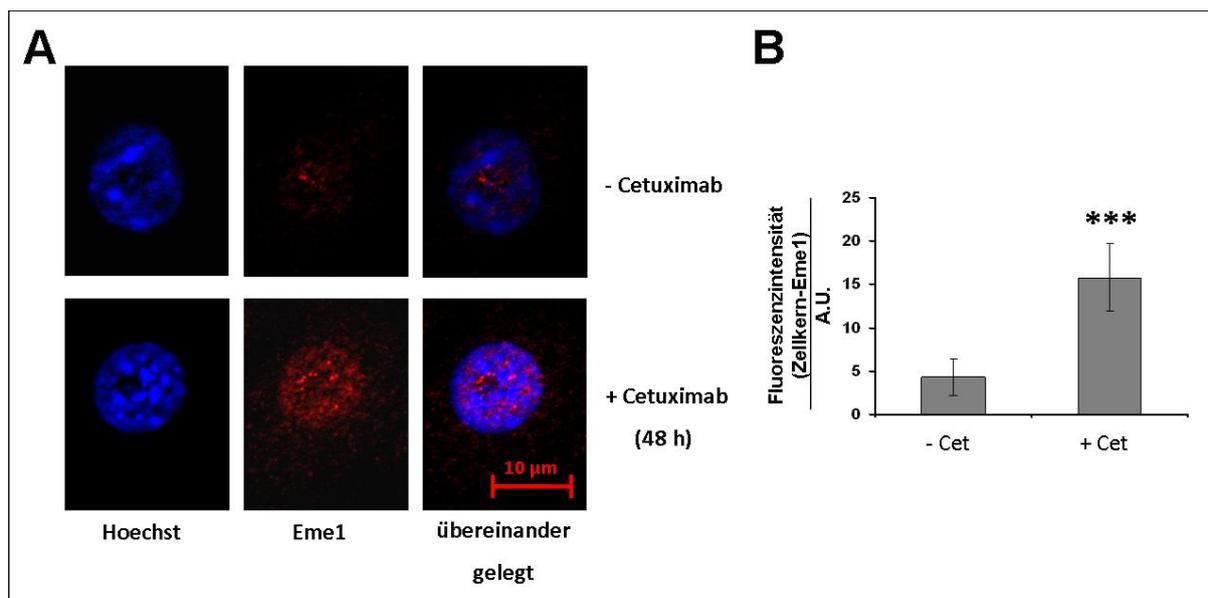


Abb. 26: Auswirkungen von Cetuximab auf die Lokalisierung von Eme1

NR6W-Zellen wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 µg/ml Cetuximab für 48 h inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz Eme1 im Zellkern, der mit Hoechst 33342 eingefärbt wurde, nachgewiesen (A). Für die Quantifizierung wurde in jeweils 50 Zellen pro Ansatz die Fluoreszenzintensität von Eme1 mittels Photoshop im Zellkern bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test aus insgesamt drei Experimenten; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (***) = $p < 0,001$ (B).

Erstaunlich war, dass bereits eine einstündige Inkubation der Zellen mit Cetuximab zu einem so starken Anstieg der Eme1-Proteinmenge führte. Daher war es wichtig zu zeigen, wie es zu dem Anstieg an Eme1 gekommen ist. Zunächst wurde untersucht,

ob Cetuximab Änderungen von Eme1 auf der mRNA-Ebene induziert (Abb. 27A). Daher wurden A431-Zellen für 24 h mit 100 µg/ml Cetuximab inkubiert oder unbehandelt gelassen. Nach der Inkubation wurde aus diesen Zellen die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Ergebnisse, die mit Hilfe des Rotor-Gene 6000 generiert wurden, zeigten, dass Cetuximab keinen Einfluss auf die mRNA-Level von Eme1 hatte (Abb. 27A). Als nächstes wurde untersucht, ob Cetuximab die Stabilität von Eme1 auf Proteinebene beeinflusst. Dazu wurden die A431-Zellen für 4 h mit 3 µM MG132 (Merck) inkubiert. MG132 ist ein potenter reversibler Inhibitor des Proteasoms und hemmt somit den Proteinabbau der Zelle [175]. Zudem wurde zu den in Gegenwart von MG132 inkubierten Zellen für die letzten 2 h Cetuximab dazu gegeben. Es wurden ebenfalls Zellen nur mit Cetuximab inkubiert oder unbehandelt belassen (Abb. 27B). Eine Hemmung des Proteinabbaus wurde mit Hilfe von Ubiquitin kontrolliert. Die Untersuchung zeigte, dass die Hemmung des Proteinabbaus in einer Aufkonzentrierung der Eme1-Menge resultierte. Eine Inkubation der A431-Zellen mit Cetuximab in Abwesenheit oder Gegenwart von MG132 führte ebenfalls zu einer Zunahme an Eme1 (Abb. 27B). Zusätzlich wurde eine Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Es zeigte sich, dass während der Inkubation ausschließlich mit Cetuximab oder mit MG132 oder mit beiden Substanzen zusammen die Anzahl der Eme1-Proteine ungefähr um die gleiche Menge zugenommen haben (Abb. 27C).

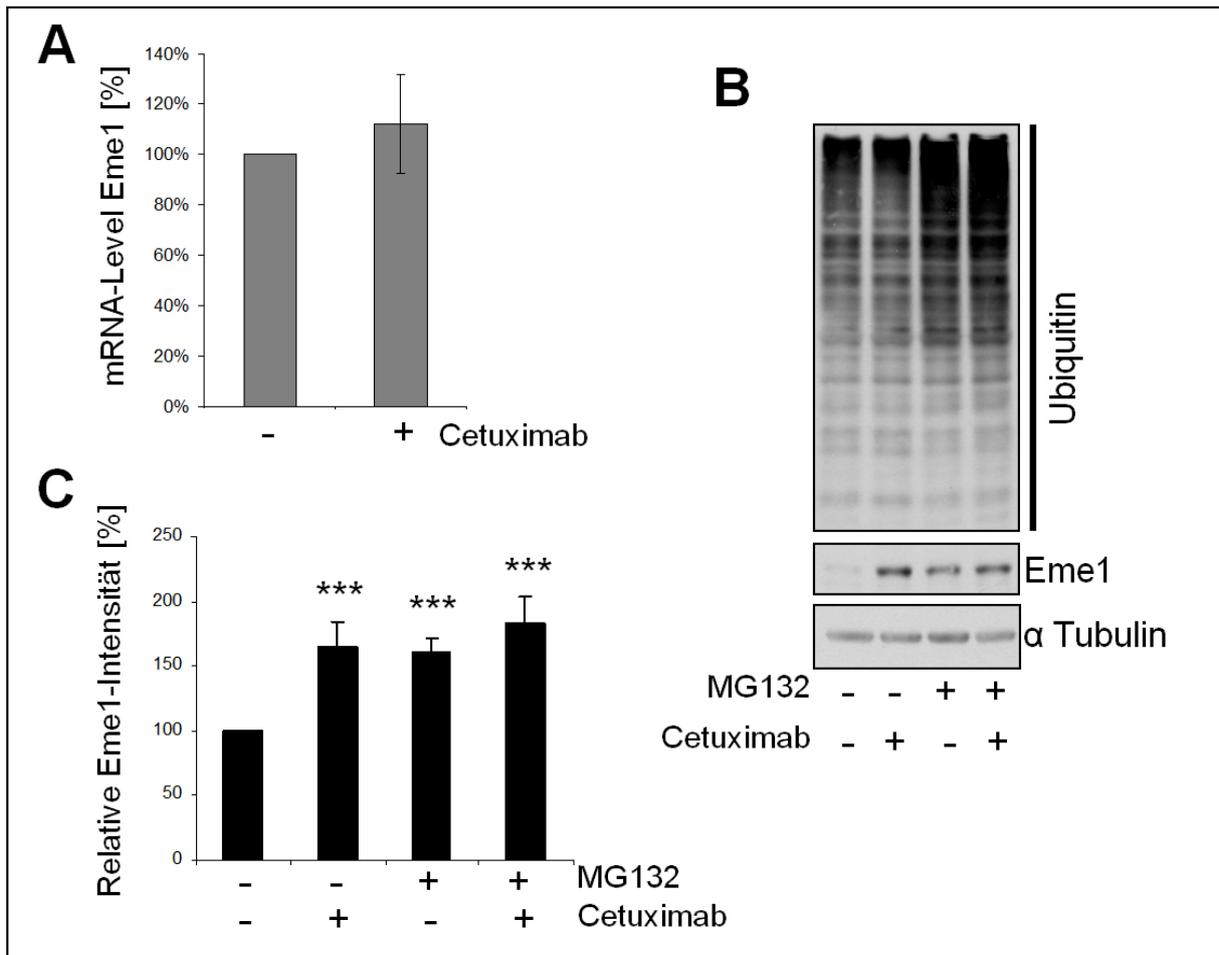


Abb. 27: Cetuximab beeinflusst nicht die Expression von Eme1 sondern stabilisiert es auf Proteinebene

A431-Zellen wurden in serum-haltigem Medium mit 100 μ g/ml Cetuximab für 48 h inkubiert. Anschließend wurde aus diesen Zellen die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Level an Eme1 wurden bestimmt. (A). Zellen wurden in serum-haltigem Medium, mit 3 μ M MG132 für 4 h, 100 μ g/ml Cetuximab für 2 h, der Kombination beider Substanzen oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Proteine lysiert und diese wurden mittels der SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Western Blot-Verfahren diente mit Hilfe spezifischer Antikörper der Detektion von Ubiquitin, Eme1 und α -Tubulin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten (B). Für die Quantifizierung wurde die Relative Eme1-Intensität dreier unabhängiger Experimente bestimmt (C). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (***) = $p < 0,001$ (A/C). Verglichen wurden jeweils unbehandelte mit behandelten Zellen (Cetuximab oder MG132).

Als nächstes wurde überprüft, ob Cetuximab das Zellüberleben von Zellen beeinflusst, die mit DNA-schädigenden Substanzen inkubiert werden (Abb. 28). Hierbei wurde ebenfalls das UVC-Licht verwendet. Zunächst wurden die NR6W-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab für 24 h vorinkubiert und anschließend dem UVC-Licht für 10 min ausgesetzt (Abb. 28A). Dann folgte eine

weitere Inkubation der Zellen in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab für 24 h. Als Kontrolle wurden die Zellen über den gesamten Zeitraum ausschließlich mit Cetuximab behandelt oder unbehandelt belassen. Am Ende der Behandlung wurde die metabolische Aktivität der Zellen mit Hilfe des AlamarBlue-Assays ermittelt. Dabei wiesen UVC-bestrahlte Zellen, die mit Cetuximab behandelt wurden, einen signifikant höheren Zellmetabolismus und somit Zellüberleben auf als Zellen, die nur mit UVC-Licht bestrahlt wurden. Das weist darauf hin, dass mehr Zellen die UVC-Bestrahlung überlebt haben. Die metabolische Aktivität UVC-behandelter Zellen nahm sogar mit steigender Cetuximab-Konzentration zu (Abb. 28A). Ebenfalls in UVC-behandelten A431-Zellen wurde gezeigt, dass die zusätzliche Inkubation dieser Zellen mit steigenden Konzentrationen and Cetuximab zu einer steigenden metabolischen Zellaktivität und somit besserem Zellüberleben geführt hat (Abb. 28B).

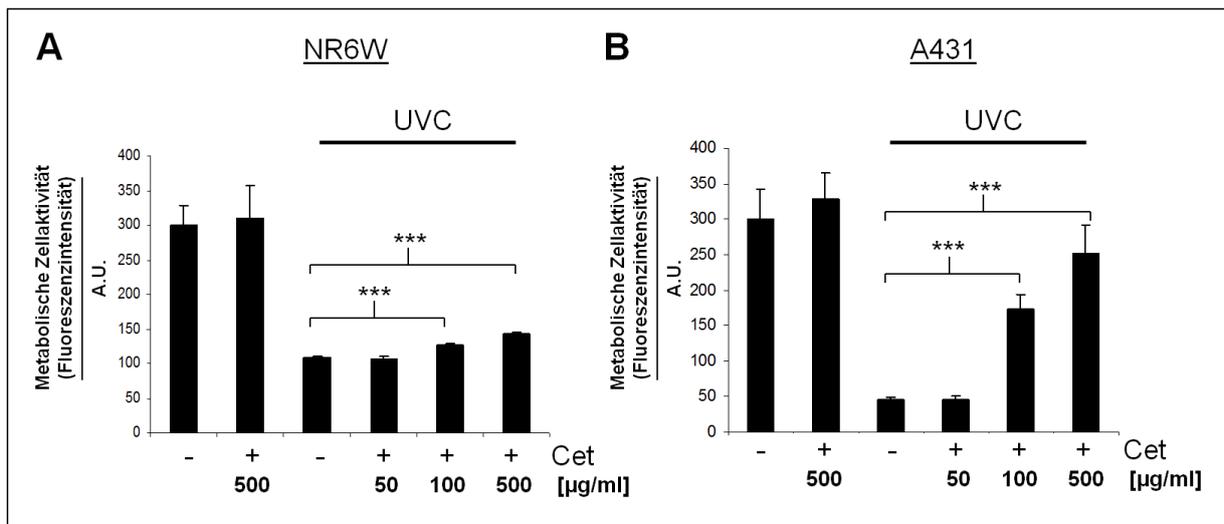


Abb. 28: Darstellung des Cetuximab-spezifischen Zellüberlebens nach DNA-Schädigung

Die Zellen wurden in Serum-haltigem Medium für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab (50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml) vorbehandelt oder unbehandelt gelassen. Als nächstes wurden sie 10 min UVC-Licht ausgesetzt und anschließend weitere 24 h in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab inkubiert. Nach den ersten 24 h und dann nach weiteren 24 h nach der UVC-Bestrahlung wurde die metabolische Zellaktivität mit Hilfe des AlamarBlue-Assays bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test von insgesamt drei Experimenten; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (***) = $p < 0,001$.

3.3.5.4 Eme1 ist für die Cetuximab-induzierte DNA-Reparatur verantwortlich

Im Folgenden wurde untersucht, ob die heterodimere Endonuklease Mus81-Eme1 für die Cetuximab-induzierte DNA-Reparatur verantwortlich ist. Dabei sollte der Einfluss von Cetuximab sowohl auf Zellen untersucht werden in denen Eme1 überexprimiert wird, als auch in Zellen, in denen durch siRNA die Suppression von Eme1 bewirkt wurde.

Die Überexpression des humanen Eme1 wurde mit einem käuflich erworbenen Plasmid durchgeführt. Dazu wurde die Eme1-DNA mit Hilfe von Lipofektamine 2000 in die A431-Zellen transient eingebracht. Leider konnten im Immunoblot höhere Level an Eme1 in den transfizierten Zellen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise führte die Überexpression von Eme1 zum Zelltod. Am Tag nach der Transfektion wurde beobachtet, dass ein hoher Anteil an Zellen vom Boden der Zellkulturschale abgelöst war (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurde mit Hilfe der Eme1-siRNA das posttranskriptionelle Gensilencing durchgeführt. Dazu wurde ein gegen Eme1 gerichteter Pool an siRNAs verwendet. Als Kontrolle wurden die Zellen mit nicht spezifischer siRNA (siC) transfiziert. Da siRNA gegen humane mRNA verwendet wurde, konnten die nachfolgenden Experimente nur mit den A431-Zellen durchgeführt werden. Die Untersuchung der mRNA-Level 48 h nach der Transfektion mit den spezifischen Eme1-siRNAs ergab, dass noch etwa 25 % Eme1-mRNA detektiert werden konnte (Abb. 29A). Auch auf Proteinebene sollte gezeigt werden, dass eine Transfektion mit den verwendeten siRNAs zu einer deutlich geringere Menge an Eme1-Protein führt. Da das Eme1-Protein eine sehr kurze Halbwertszeit hat, konnte kein Unterschied zwischen den mit der Kontroll- und Eme1-siRNA transfizierten A431-Zellen festgestellt werden (Abb. 29B). Somit wurde zusätzlich nach der Transfektion die Stabilität von Eme1 erhöht, indem der Proteinabbau mit MG132 oder Cetuximab gehemmt wurde. Folglich konnte dargestellt werden, dass das posttranskriptionelle Gensilencing in einem Rückgang der Proteinmenge von Eme1 resultiert (Abb. 29B). Die Quantifizierung der Banden ergab, dass eine Reduzierung von Eme1 um ca. 70 % erreicht wurde.

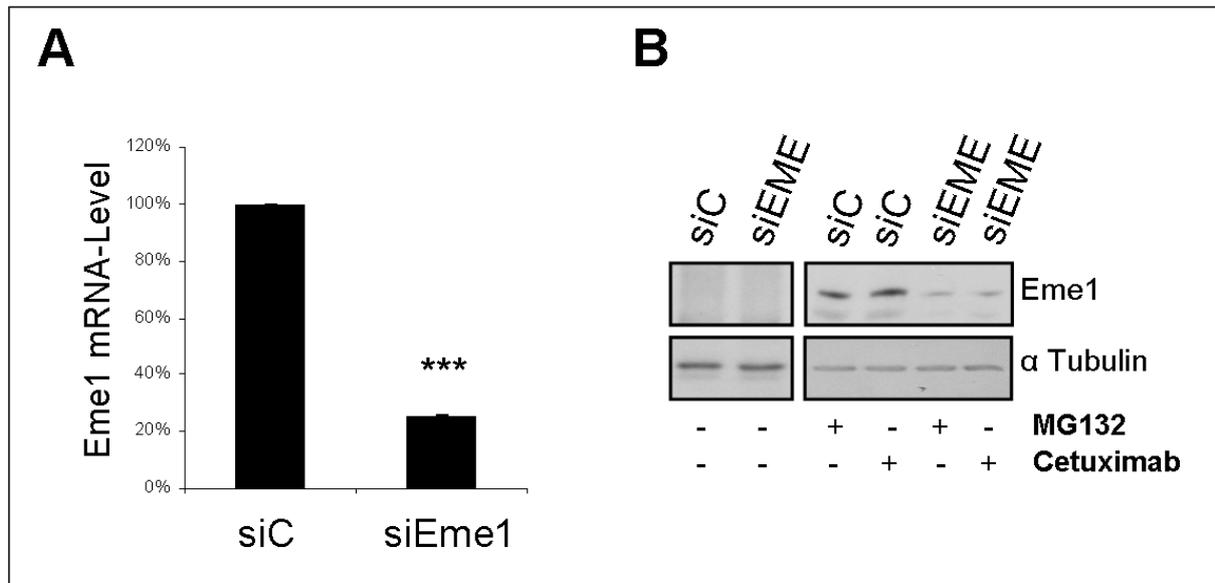


Abb. 29: Darstellung der Eme1 mRNA- und Proteinmenge nach Eme1-Suppression

A431-Zellen wurden in serum-haltigem Medium ausgesät und am nächsten Tag mit Kontroll-siRNA (siC) und gegen Eme1-gerichteter siRNA (siEme1) transfiziert. Nach weiteren 48 h wurde aus diesen Zellen entweder die RNA (A) oder Proteine (B) isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Level an Eme1 wurden bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test von insgesamt drei Experimenten; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (***) = $p < 0,001$ (A). Nach der Proteinlyse, wurden die Proteine mittels der SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Western Blot-Verfahren diente mit Hilfe spezifischer Antikörper der Detektion von Eme1 und Tubulin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Experimenten (B).

Im Folgenden wurde in Gegenwart von Cetuximab der Einbau des Basenanalogs BrdU in Eme1-supprimierten Zellen untersucht (Abb. 30). Damit sollte der Einfluss von Eme1 auf die DNA-Neusynthese charakterisiert werden. Eine Transfektion der A431-Zellen mit Kontroll-siRNAs und die nachfolgende Inkubation mit Cetuximab resultierten in einer Zunahme der DNA-Neusynthese. Dabei stieg die Rate der DNA-Neusynthese von durchschnittlich 35 % in unbehandelten Zellen auf durchschnittlich 52 % in Zellen, die mit 500 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab inkubiert wurden (Abb. 30). Die Transfektion der Zellen mit siRNAs, die gegen Eme1 gerichtet waren, hatte sogar eine Abnahme der DNA-Neusyntheserate auf ca. 30 % zur Folge. Zudem veränderte eine Behandlung der Zellen mit Cetuximab die Rate der DNA-Neusynthese nicht. Somit konnte gezeigt werden, dass Eme1 die DNA-Neusynthese in Cetuximab-behandelten Zellen induziert.

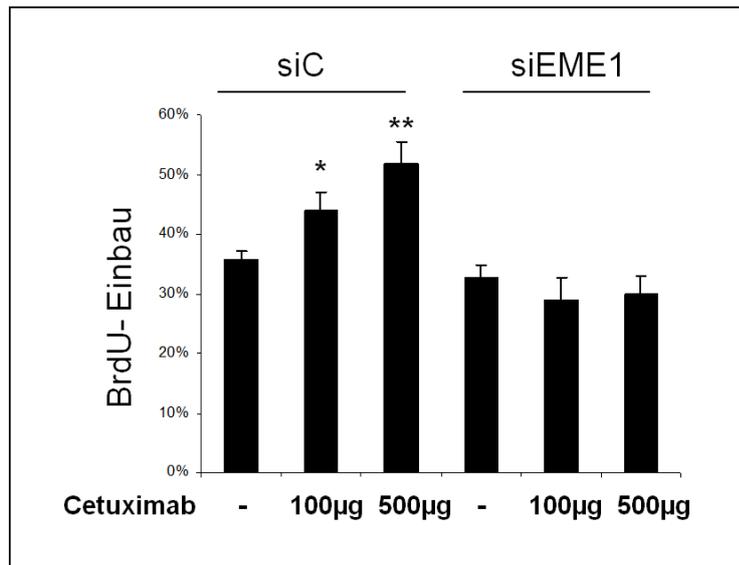


Abb. 30: Einfluss von Cetuximab auf die DNA-Syntheserate in Eme1-supprimierten A431-Zellen

Zunächst wurden die Zellen ein Tag nachdem sie ausgesät wurden mit Kontroll-siRNA und mit gegen Eme1-gerichteten siRNA transfiziert. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen 24 h ohne oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab (100 µg/ml und 500 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie für 5 min mit UVC-Licht

behandelt und daraufhin weitere 24 h in Abwesenheit oder Gegenwart von Cetuximab inkubiert. Für die letzten 20 min der Inkubation wurde BrdU ins Medium dazugegeben. Anschließend wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz die Zellkerne mit Hoechst 33342 blau und das eingebaute BrdU rot gefärbt. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil an BrdU-positiven Zellkernen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test von insgesamt drei Experimenten; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (*) = $p < 0,05$ und (**) = $p < 0,01$. In Relation gesetzt wurden jeweils unbehandelte Zellen mit Cetuximab-behandelten Zellen.

Um nachzuweisen, dass die DNA-Reparatur tatsächlich in diesen Zellen induziert wird, wurden in A431-Zellen mittels UVC-Licht DNA-Schädigungen induziert. Dazu wurden die Zellen mit Cetuximab für 24 h vorinkubiert, 5 min UVC-Licht ausgesetzt und weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit hatten die Zellen Zeit die UVC-induzierten DNA-Schäden zu reparieren. Mittels des Comet Assays wurden die DNA-Schäden sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen oder ausschließlich mit Cetuximab inkubiert. Zusätzlich wurde in A431-Zellen direkt nach UVC-Bestrahlung der Comet Assay durchgeführt (Abb. 31). Falls Cetuximab in diesen Zellen die DNA-Reparatur induziert, sollten die Cetuximab-behandelten Zellen, die mit UVC-Licht bestrahlt wurden, eine geringere Anzahl kurzer DNA-Fragmente aufweisen. Die alleinige UVC-Bestrahlung resultierte in der Entstehung vieler kurzer DNA-Fragmente, die sich in einem langen Cometschweif manifestierten (Abb. 31A). Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit Cetuximab führte ebenfalls zur Bildung vieler kurzer DNA-Fragmente. Die Elektrophorese offenbarte jedoch einen signifikant kürzeren Cometschweif in diesen Zellen. Die Quantifizierung der Länge des Cometschweifes bestätigte dies (Abb. 31B). Es wurde zudem sichtbar, dass in UVC-bestrahlten Zellen der Comet-Schweif etwa die gleiche Länge in Cetuximab-

behandelten und –unbehandelten Zellen aufwies, wenn der Comet-Assay direkt nach der Bestrahlung durchgeführt wurde (Abb. 31B). Dies weist darauf hin, dass wahrscheinlich eine Cetuximab-vermittelte DNA-Reparatur die UV-induzierten DNA-Schäden teilweise behoben hat.

Wie bereits in Abb. 24 gezeigt, fiel auch hier auf, dass bereits Cetuximab-behandelte Zellen einen signifikant kürzeren Cometschweif und somit eine geringere DNA-Schädigung aufwiesen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 31B). Dies ist möglicherweise auf eine „genomische Instabilität“ der Tumorzelllinie zurückzuführen. Tumorzellen teilen sich sehr schnell und dies resultiert in DNA-Schäden. Die genomische Instabilität stellt eine Anhäufung von Schädigungen in der DNA dar. Diese treten aufgrund von Tumor-spezifischen Defekten in der DNA-Reparatur und einem Ausfall der DNA-Kontrolle vor ihrer Verteilung an die Tochterzellen auf [176]. Möglicherweise führt Cetuximab zur Behebung der DNA-Schäden, die in der A431-Zelllinie vorhanden sind.

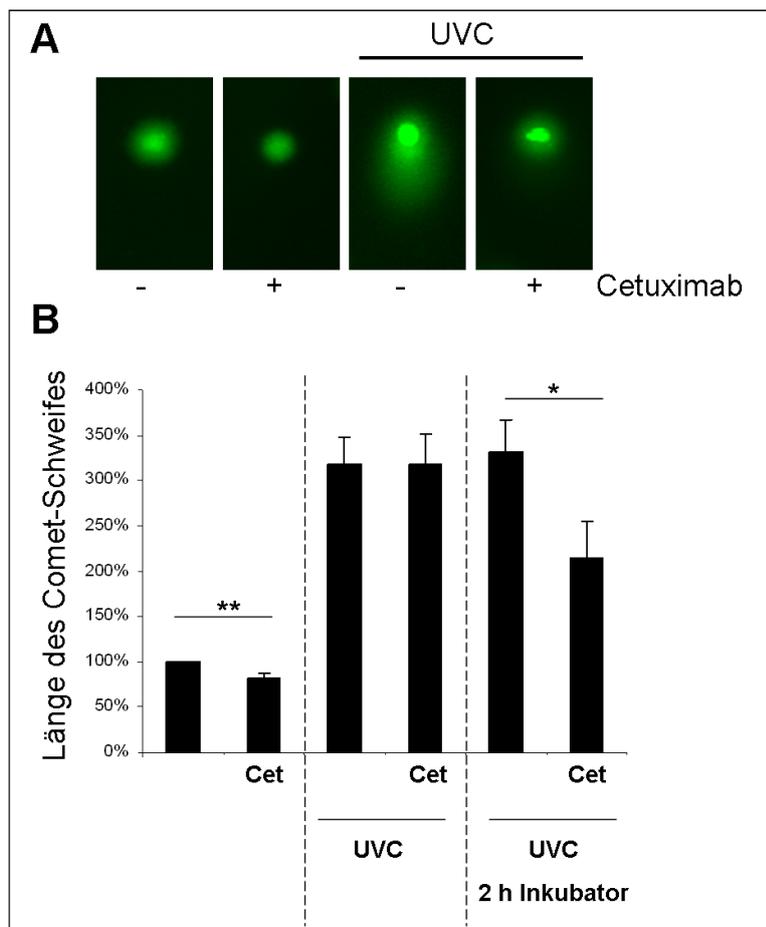


Abb. 31: Darstellung der Cetuximab-spezifischen DNA-Reparatur

Die A431-Zellen wurden für 24 h in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 µg/ml Cetuximab inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde einer 5-minütigen Bestrahlung mit UVC-Licht ausgesetzt. Daraufhin folgte eine weitere 2-stündige Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurde der Comet-Assay durchgeführt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops wurde die markierte DNA fotografiert (A). Für die Quantifizierung wurde die Länge des Comet-Schweifes bestimmt. Die Messung erfolgte von der Mitte des fluoreszenzstärksten Bereiches bis zum Ende des Cometschweifes.

Pro Ansatz wurden 20 Zellen ausgemessen. Zusätzlich wurde die Comet-Schweif-Länge direkt nach der UVC-Bestrahlung bestimmt. Die statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten

erfolgte mit einem ungepaarten t-Test; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (*) = $p < 0,05$ und (**) = $p < 0,01$ (B).

Die Abbildung 28 zeigte, dass nach Induktion von DNA-Schäden signifikant mehr Cetuximab-behandelte Zellen überleben. Die Abbildung 31 veranschaulichte, dass die DNA-Reparatur der Grund für das bessere Zellüberleben ist. Um nachzuweisen, ob die Endonuklease Eme1/Mus 81 tatsächlich für die DNA-Reparatur in Cetuximab-behandelten Zellen verantwortlich ist, folgte in Eme1-supprimierten A431-Zellen die Induktion von DNA-Schäden mittels UVC-Licht. Der AlamarBlue-Assay diente der Bestimmung des Zellüberlebens über die Messung der mitochondrialen Zellaktivität (Abb. 32). Dazu wurden die mit Kontroll-siRNA oder Eme1-siRNA transfizierten Zellen nach einer 24-stündigen Vorbehandlung in Gegenwart oder Abwesenheit von Cetuximab für 5 min mit UVC-Licht behandelt und für die nachfolgenden 24 h mit oder ohne Cetuximab inkubiert (Abb. 32). Die am Versuchsende gemessene AlamarBlue-Umsatzrate un behandelter Zellen wurde dabei als 100 % bestimmt. Die Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA und die darauf folgende UVC-Behandlung führten zu einer Abnahme der metabolischen Zellaktivität um ca. 40 %. Die in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an Cetuximab durchgeführte UVC-Behandlung resultierte jedoch in einer Verbesserung des Zellüberlebens, was in Abb. 30 gezeigt werden konnte. Zudem fiel auf, dass die Cetuximab-behandelten A431-Zellen, in denen die posttranskriptionelle Suppression von Eme1 durchgeführt wurde, bereits einen geringeren Zellmetabolismus aufwiesen. Die zusätzliche Bestrahlung dieser Zellen mit UVC-Licht hatte eine weitere Abnahme des Zellüberlebens auf durchschnittlich 22 % zur Folge. Die Inkubation dieser Zellen mit Cetuximab führte jedoch auch bei den Eme1-supprimierten Zellen zur Verbesserung der metabolischen Zellaktivität. Dies lag möglicherweise daran, dass wie in Abb. 29B bereits gezeigt, circa 30 % der Eme1-Gesamtmenge in den Zellen noch vorhanden war. Das in diesen Zellen vorhandene Eme1-Protein konnte weiterhin zur DNA-Reparatur führen und die Zellen somit vor dem Zelltod retten. Somit wurde ebenfalls beobachtet, dass mit steigender Cetuximab-Konzentration auch die AlamarBlue-Umsatzrate zunahm. Die metabolische Zellaktivität der mit Eme1-siRNAs transfizierter Zellen war jedoch bei jedem Ansatz signifikant niedriger als bei den mit Kontroll-siRNAs transfizierten Zellen (Abb. 32).

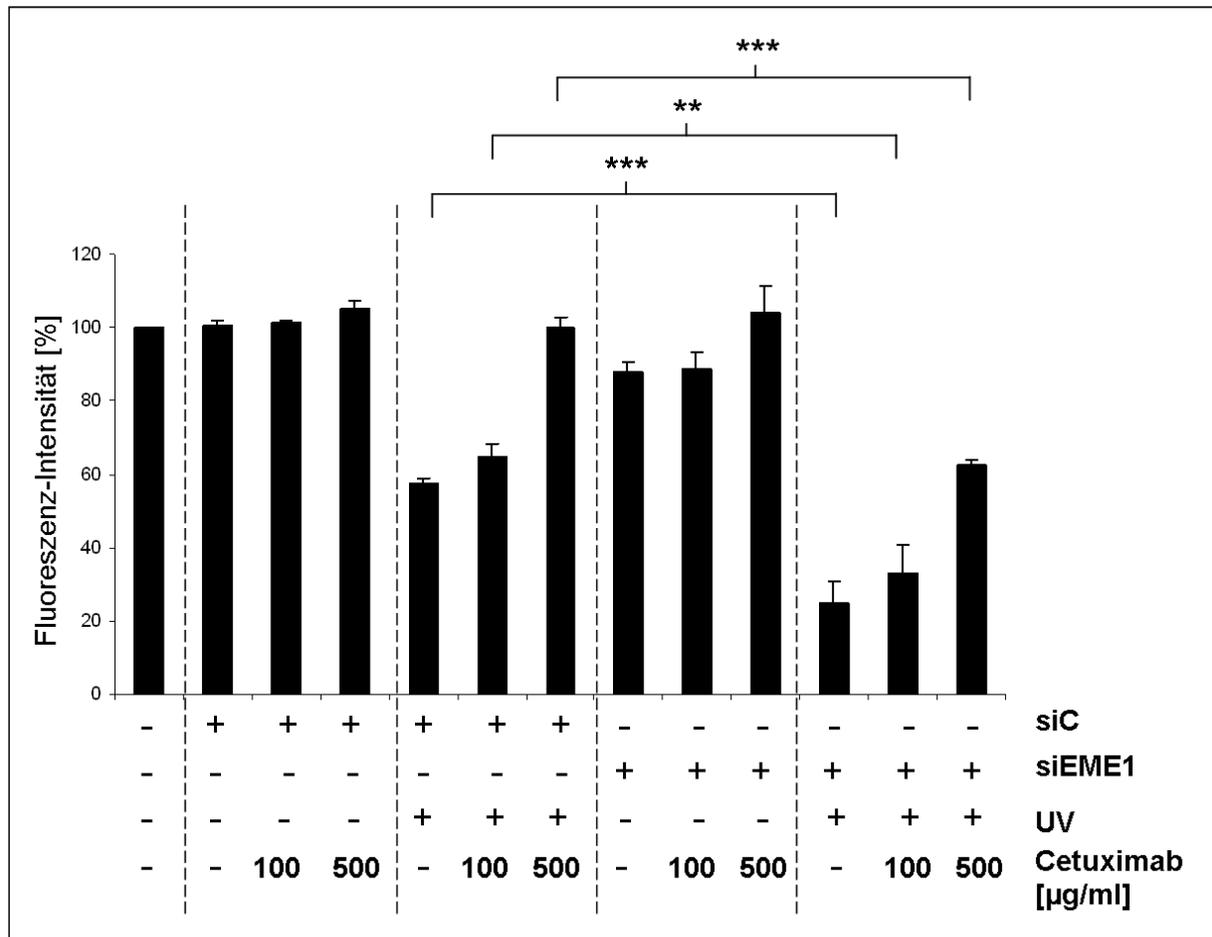


Abb. 32: Darstellung des Cetuximab-induzierten Zellüberlebens nach Behandlung mit DNA-schädigendem UVC-Licht in Eme1-exprimierenden und Eme1-supprimierten A431-Zellen

Die A431-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit Kontroll-siRNA und gegen Eme1-gerichteter siRNA transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cetuximab vorinkubiert oder unbehandelt gelassen. Dann wurden sie teilweise 5 min mit UVC-Licht behandelt und anschließend weitere 24 h mit oder ohne Cetuximab behandelt. Zuletzt wurde die metabolische Aktivität mit Hilfe des AlamarBlue-Assays bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test aus drei unabhängigen Messungen verwendet; Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede mit (**) = $p < 0,01$ und (***) = $p < 0,001$.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob Cetuximab auch in primären Tumorzellen zur Anreicherung von Eme1 führt (Abb. 33). In der Literatur wird darüber berichtet, dass Cetuximab auch als Therapie für höhergradige Gliome ausgetestet wird [122]. Somit wurde aus dem Glioblastoma multiforme, einem Grad IV Gliom, eine zweidimensionale Zellkultur angelegt. Tumorzellen aus vier unterschiedlichen Tumoren wurden mit jeweils 100 µg/ml Cetuximab für 24 h inkubiert oder unbehandelt gelassen (Abb. 33A).

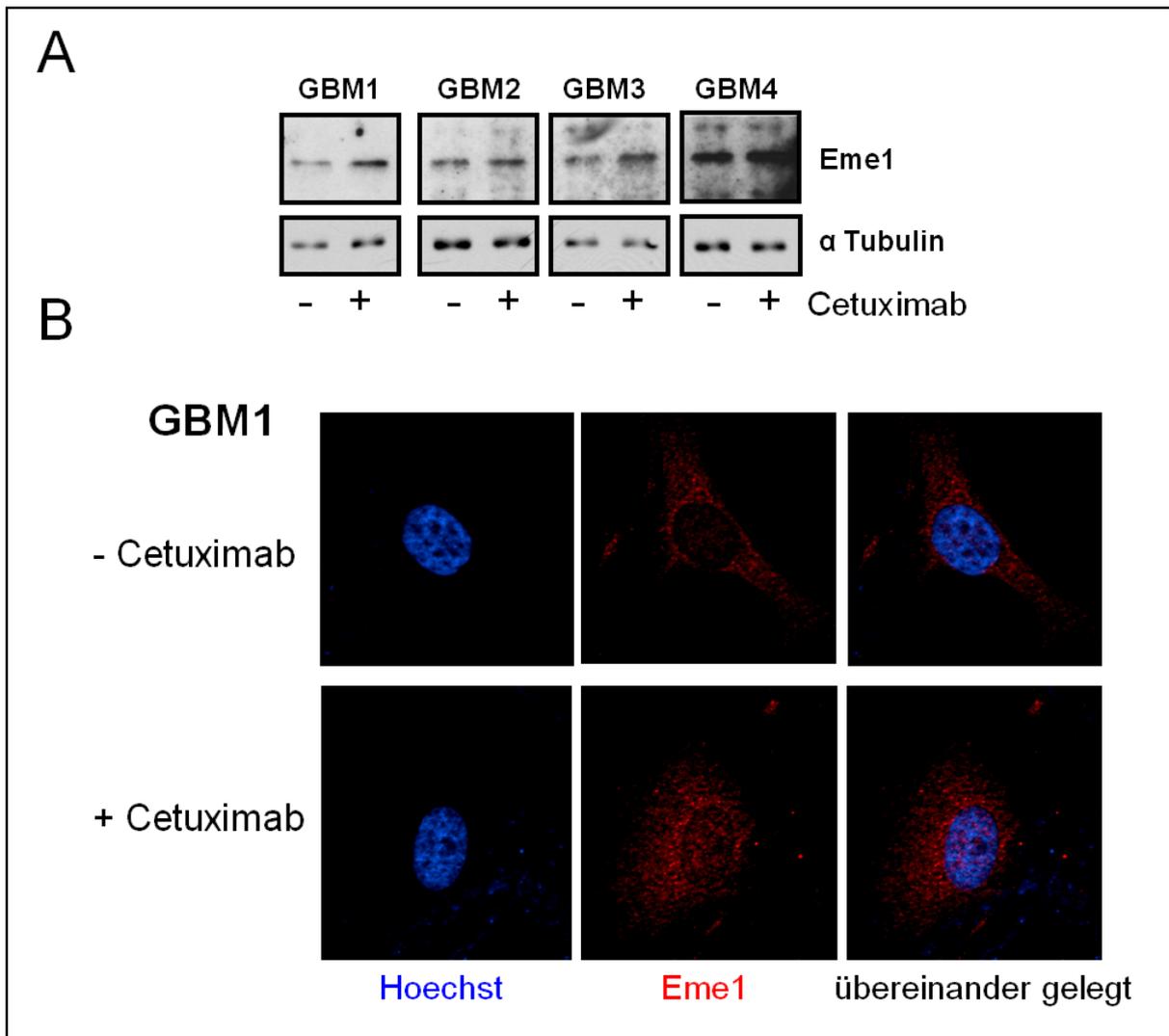


Abb. 33: Einfluss von Cetuximab auf Eme1 in Glioblastom-Primärkulturen

Tumormaterial aus vier unterschiedlichen Glioblastoma multiforme (GBM) wurden kultiviert und für 24 h in Gegenwart oder Abwesenheit von Cetuximab (100 µg/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine wurden mittels der SDS-PAGE voneinander getrennt und im Western Blot wurde mit spezifischen Antikörpern Eme1 und α Tubulin detektiert (A). Zellen des Glioblastoms wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 µg/ml Cetuximab für 24 h inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz Eme1 (rot) und Hoechst 33342 (blau) gefärbt (B).

Im GBM1 resultierte die Behandlung mit Cetuximab in einer signifikanten Zunahme des Eme1-Proteins. In zwei weiteren Tumoren (GBM2 und GBM3) wurde gezeigt, dass Cetuximab nur in geringem Maße zur Zunahme des Eme1-Proteins führt. Nur im GBM4 hatte Cetuximab keinen Einfluss auf Eme1 (Abb. 33A). Als nächstes wurde untersucht, ob die Inkubation mit Cetuximab in einer Anhäufung von Eme1 im Zellkern resultierte (Abb. 33B). Dazu wurden Zellen aus dem ersten Tumor verwendet, da dort eine Zunahme von Eme1 während der Cetuximab-Behandlung

entdeckt wurde. Eine Inkubation der Zellen in Abwesenheit von Cetuximab zeigte, dass Eme1 nicht im Zellkern vorhanden ist. Erst eine 24-stündige Behandlung mit 100 µg/ml Cetuximab hatte die Anhäufung von Eme1 im Zellkern zur Folge (Abb. 33B). Eine Behandlung des GBM4 mit Cetuximab führte nicht zur Anhäufung von Eme1 im Zellkern (Daten nicht gezeigt). Somit konnte gezeigt werden, dass Cetuximab möglicherweise auch im Tumorgewebe zur Stabilisierung von Eme1 führt.

4 Diskussion

4.1 Die *in vitro* Charakterisierung der Wirkungseffizienz von Cetuximab auf EGFRvIII

Um bessere Behandlungserfolge in der Onkologie zu erzielen, spielen zielgerichtete Therapien eine immer größer werdende Rolle. Die EGFRvIII-Isoform ist ein wichtiger Marker für gezielte Tumorthherapie, da sie ausschließlich in Tumorzellen exprimiert wird. Die Expression von EGFRvIII wurde bereits in vielen Tumoren beschrieben, namentlich in Tumoren des Kopfes, des Halses, der Lunge, der Brust und der Prostata [96].

Der monoklonale Antikörper Cetuximab ist bereits seit 2004 zur Behandlung von metastasiertem Kolonkarzinom (mCRC) und Kopf- und Halstumoren (HNSCC) zugelassen. Neben dem wildtypischen EGF-Rezeptor erkennt Cetuximab auch EGFRvIII. Die therapeutische Wirksamkeit der Cetuximab-Therapie in EGFRvIII-exprimierenden Zellen ist jedoch umstritten [136,177,178].

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit den Einfluss des monoklonalen Antikörpers Cetuximab auf die EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen näher zu charakterisieren.

4.1.1 Cetuximab verhindert nicht die Aktivierung der tumorspezifischen Isoform EGFRvIII

Die *in vitro* Effekte des monoklonalen Antikörpers Cetuximab auf die tumorspezifische Isoform EGFRvIII wurden in den letzten Jahren in der Fachliteratur sehr kontrovers diskutiert. *Patel et al.* haben gezeigt, dass der monoklonale Antikörper die Phosphorylierung von EGFRvIII hemmt, was wiederum zu einer geringeren Proliferation der verwendeten EGFRvIII-exprimierenden 32D- und CHO-Zellen führt [178]. *Jutten et al.* haben hingegen gezeigt, dass Cetuximab keine inhibierende Wirkung auf die Phosphorylierung von EGFRvIII in den U373-vIII(+)-Glioblastomzellen hat. Sie fanden, dass Cetuximab das Wachstum und das Überleben EGFRvIII-exprimierender U373-Zellen nicht beeinträchtigt [136]. Auch *Fukai et al.* haben bei Cetuximab-behandelten EGFRvIII-exprimierenden U-251 MG- und LN-229- Zellen keine Hemmung des Zellwachstums beobachtet [177].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Cetuximab an EGFR in den verwendeten NR6W-Zellen zur Hemmung der Phosphorylierung

aller untersuchten Tyrosinreste führt. Zudem resultiert die Inkubation mit Cetuximab in einer Abnahme der EGF-Rezeptor-Anzahl. Dessen ungeachtet führt die Inkubation der EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen mit Cetuximab nicht zur Hemmung der Aktivität der untersuchten Tyrosin- und Serinreste von EGFRvIII. Die Cetuximab-Behandlung resultierte sogar zunächst in einer erhöhten Phosphorylierung von EGFRvIII, die während einer längeren Behandlung mit Cetuximab wieder sank. Eine Untersuchung der nachgeschalteten Faktoren wie Akt, Erk1/2 und STAT3 zeigte, dass die Inkubation der NR6M-Zellen mit Cetuximab nicht signifikant in einer Hemmung dieser Proteine oder deren Aktivierung resultierte. Die DNA-Neusynthese (BrdU-Assay) und die Proliferation (Bestimmung der Zellzahl) der NR6M-Zellen waren ebenfalls nicht verändert.

Im Vergleich zum wildtypischen EGF-Rezeptor fehlt der tumorspezifischen Isoform EGFRvIII beinahe die gesamte L1-Subdomäne und Zweidrittel der CR1-Subdomäne der extrazellulären Domäne. Diese beiden Subdomänen spielen eine wichtige Rolle bei der Liganden-Bindung und der Rezeptordimerisierung [7]. Das Fehlen dieser Bereiche verhindert das Anlagern der EGFR-spezifischen Liganden an EGFRvIII. Zudem verursacht die Deletion eine Konformationsänderung im EGFRvIII-Protein. Diese Änderung in der Proteinstruktur führt dazu, dass EGFRvIII ohne Bindung eines Liganden konstitutiv aktiv ist [66]. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Cetuximab-induzierten Hemmung der EGFRvIII-Phosphorylierung könnte darin liegen, dass EGFRvIII im konstitutiv aktiven Zustand vorliegt. Bindung des monoklonalen Antikörpers an den wildtypischen EGF-Rezeptor verhindert die Anlagerung der Rezeptor-spezifischen Liganden. Wenn die Bindung des Liganden verhindert wird, kann die Aktivierung des Rezeptors nicht mehr erfolgen. Die tumorspezifische Isoform EGFRvIII liegt jedoch bereits im aktivierten Zustand vor. Die Bindung von Cetuximab an EGFRvIII findet zwar statt, jedoch kann der gebundene Antikörper die bereits existierende Aktivierung der Isoform nicht mehr verhindern. Möglicherweise fungiert das an die Isoform gebundene Cetuximab als eine Art „blinder Passagier“. Das gebundene Cetuximab kann in Vesikeln im Zytoplasma transportiert werden, ohne dabei die Funktionsfähigkeit von EGFRvIII zu beeinträchtigen.

4.1.2 Verstärkte Aktivierung der tumorspezifischen Isoform EGFRvIII während kurzzeitiger Cetuximab-Behandlung

Jutten et al. haben gezeigt, dass die Inkubation der U373-vIII(+)-Zellen mit Cetuximab innerhalb der ersten Stunden in einer stärkeren Phosphorylierung von EGFRvIII resultiert. Eine längere Inkubation dieser Zellen mit dem monoklonalen Antikörper hatte zur Folge, dass die Aktivierung von EGFRvIII wieder abnahm, jedoch sank sie auch während einer 72-stündigen Inkubation nicht unter den Wert der unbehandelten Zellen [136].

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cetuximab-Behandlung der EGFRvIII-exprimierenden NR6M-Zellen zunächst sogar zu einer erhöhten Phosphorylierung von EGFRvIII führt. Zudem war innerhalb der ersten Stunden nach Cetuximab-Gabe auch eine erhöhte Aktivierung von Akt und Ek1/2 zu beobachten. Eine länger dauernde Inkubation der NR6M-Zellen mit Cetuximab über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h, resultierte wiederum ebenfalls in einer Abnahme der EGFRvIII-Phosphorylierung. Die Rate der Phosphorylierung von EGFRvIII sank aber auch nach einer 72-stündigen Behandlung mit Cetuximab nicht unter den Wert der unbehandelten Zellen. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Bindung von Cetuximab an EGFRvIII die Internalisierungsrate von EGFRvIII erhöht und zwar um ca. 25 % innerhalb der ersten Stunde.

Im Jahre 2001 wurde von Sorkin beschrieben, dass die in den Endosomen vorhandenen Adaptorproteine Grb2 und Shc an den wildtypischen EGF-Rezeptor binden und so die Signaltransduktionskaskaden initiieren [179]. Zuvor konnten auch andere zeigen, dass die Endozytose der Rezeptoren entscheidend für die Aktivierung der MAP-Kinasen ist [180]. Grandal *et al.* wiesen nach, dass - im Vergleich zum wildtypischen EGFR - EGFRvIII in einem geringeren Umfang von der Zelloberfläche entfernt wird. Internalisierung des konstitutiv aktiven EGFRvIII-Rezeptors in die sogenannten frühen Endosomen („early endosomes“) führt zum raschen Rücktransport dieser Isoform in sogenannten „recycling endosomes“ zur Zelloberfläche zurück [80].

Somit könnte die von uns beobachtete Zunahme der Cetuximab-induzierten Internalisierung von EGFRvIII in zytoplasmatische Vesikel zu einer erhöhten Bindung an die im Vesikel vorhandenen Adaptorproteinen führen und somit möglicherweise die Stabilität der Isoform erhöhen. Das könnte unter Umständen dazu führen, dass

die Aktivierung von EGFRvIII und der Signaltransduktionsfaktoren Akt und Erk1/2 innerhalb der ersten Stunden zugenommen hat.

4.1.3 Zusätzliche Faktoren, die die Wirkung von Cetuximab reduzieren

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung EGFRvIII-exprimierender Zellen mit Cetuximab *in vitro* keinen inhibierenden Einfluss auf die Signalisierung der EGFRvIII-Isoform oder auf das Zellüberleben und die Zellproliferation hat. Darüber hinaus wurde diskutiert, ob die Bindung von Cetuximab die Antikörper-assoziierte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) auslösen kann [181,182]. ADCC führt zur Aktivierung von Immuneffektorzellen über die Erkennung der Fc-Domäne des Antikörpers, der an den in der Zelle verankerten Rezeptor gebunden hat [113]. Dies leitet die Zellauflösung durch natürliche Killerzellen oder Phagozytose durch Makrophagen ein [114]. Fukai *et al.* konnten zeigen, dass Cetuximab *in vitro* ADCC bei den Gliom-Zelllinien U251MG-EGFRvIII und LN-229-EGFRvIII auslösen kann [177]. Die klinische Relevanz der Antikörper-assoziierten zellulären Zytotoxizität unter Berücksichtigung der Wirksamkeit der Antitumor-Therapie von Cetuximab ist jedoch sehr gering [183]. Zudem konnte dieser Mechanismus *in vivo* noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, obwohl gefunden wurde, dass viele monoklonale Antikörper ADCC *in vitro* vermitteln können [113,115]. Somit ist es wenig wahrscheinlich, dass Cetuximab Tumoren über diesen Mechanismus inhibiert und dabei über EGFRvIII wirkt. Leider konnte im Rahmen der Arbeit diese Annahme experimentell nicht bewiesen werden.

4.1.4 Cetuximab erhöht die mitochondriale Aktivität der EGFRvIII-exprimierenden Zellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Inkubation der EGFRvIII-exprimierenden Zellen mit Cetuximab weder einen Einfluss auf die Zellproliferation (BrdU-Assay) noch auf das Zellwachstum (Zellzahl-Bestimmung) hat. Die Cetuximab-Behandlung der NR6M-Zellen resultiert jedoch in einer Zunahme der metabolischen Zellaktivität (AlamarBlue-Assay). Dabei wurde festgestellt, dass mit zunehmender Cetuximab-Konzentration die Menge des umgesetzten fluoreszierenden Farbstoffs Resorufin, der als Indikator für die metabolische Zellaktivität fungiert, kontinuierlich anstieg. Mit der höchsten Konzentration an Cetuximab wurde ein signifikanter Unterschied sichtbar. Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass mit Hilfe des

AlamarBlue-Assays speziell die mitochondriale Aktivität gemessen wird [151,184,185].

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Cetuximab die metabolische Aktivität der Zellen beeinflusst. Andere Arbeitsgruppen haben bereits darauf hingewiesen, dass der wildtypische Rezeptor, EGFR, nach Internalisierung in Mitochondrien lokalisiert ist [186,187,188]. Kürzlich wurde von Zhu *et al.* dargestellt, dass EGFRvIII nach dessen Translokation von der Zelloberfläche mit Mitochondrien interagiert [112,188]. Auch hier resultierte die Bindung von Cetuximab in einer erhöhten Internalisierung der EGFRvIII-Cetuximab-Komplexe und führte zu einer erhöhten Kolo-kalisierung dieser Komplexe mit dem mitochondrialen Marker Tim 23. Dennoch konnte bis heute noch nicht geklärt werden, welche Wirkung der in Mitochondrien lokalisierte EGFR hat. Yao *et al.* haben gezeigt, dass die Menge an EGF-Rezeptoren, die innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist, mit der Zellviabilität korreliert. Sie haben festgestellt, dass eine Hemmung der EGFR-Endozytose zur Abnahme der Menge an EGFR in Mitochondrien und somit auch zu einer geringeren Zellviabilität führt [187]. Diese Ergebnisse bieten somit im Zuge dieser Arbeit einen indirekten Nachweis dafür, dass in EGFRvIII-exprimierenden Zellen Cetuximab über die Regulation der mitochondrialen Aktivität die Zellviabilität positiv beeinflussen könnte.

4.1.5 Zusammenfassung

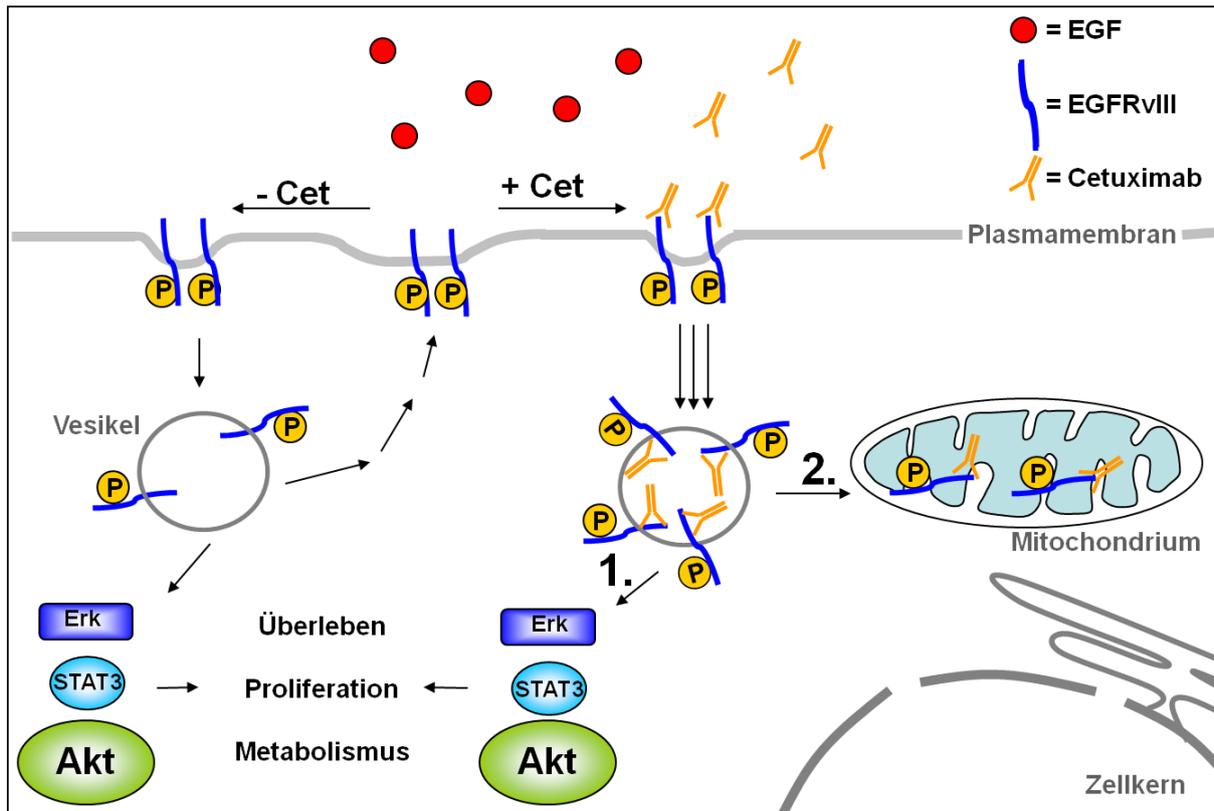


Abb.34: Modell der Wirkung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab auf die tumorspezifische Isoform EGFRvIII

Die tumorspezifische Isoform, die in der Plasmamembran verankert ist, weist einen konstitutiv-aktiven Zustand auf. Das bedeutet, dass die Aktivierung von EGFRvIII ohne Mitwirkung des EGFR-spezifischen Liganden verläuft. EGFRvIII wird internalisiert und gleichzeitig resultiert die Phosphorylierung von EGFRvIII in der Aktivierung der Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3. Diese Faktoren regulieren unter anderem das Zellüberleben, die Proliferation und den Zellmetabolismus. EGFRvIII wird nach dessen Internalisierung in Vesikeln wieder zurück zur Zelloberfläche transportiert. In Anwesenheit des monoklonalen Antikörpers, bindet dieser an das membranständige EGFRvIII und dies resultiert in der Internalisierung der Cetuximab-gebundenen Rezeptoren. Obwohl Cetuximab EGFRvIII bindet, hemmt es die Aktivierung der tumorspezifischen Isoform nicht (1.). Zudem kann das an Cetuximab-gebundene EGFRvIII innerhalb der Mitochondrien nachgewiesen werden (2.) und resultiert in der Zunahme der mitochondrialen Aktivität.

Zusammengenommen führen diese Erkenntnisse zu einem Modell, in dem Cetuximab an EGFRvIII bindet und zu dessen Internalisierung führt (Abb. 34). Dabei hat Cetuximab jedoch einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität der Isoform noch seiner Signaltransduktionskaskaden. Folglich verhindert Cetuximab auch nicht die Proliferation der EGFRvIII-exprimierenden Zellen. Im Gegenteil, Cetuximab führt

sogar zunächst zu einer stärkeren Aktivierung der tumorspezifischen Isoform. Dieser Effekt könnte möglicherweise durch die erhöhte Internalisierungsrate von EGFRvIII bedingt sein. Die Cetuximab-induzierte Internalisierung von EGFRvIII in zytoplasmatische Vesikel führt zu einer Zunahme der Bindung der im Vesikel vorhandenen Adaptorproteine an EGFRvIII und somit zu einer stärkeren Phosphorylierung von EGFRvIII und folglich auch seiner Signaltransduktionskaskaden. Cetuximab verändert allerdings insofern den intrazellulären Transport von EGFRvIII, als es seine Verlagerung zu Mitochondrien hin bewirkt (Abb. 34). Zudem nimmt in Cetuximab-behandelten Zellen die mitochondriale Aktivität zu, die möglicherweise sogar einen positiven Effekt auf das Zellüberleben hat.

Die gezielte Behandlung EGFR-exprimierender Tumoren resultiert häufig in der Entwicklung von erworbenen Resistenzen. Diese können beispielsweise aufgrund einer Mutation des Zielproteins auftreten [138]. In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation des EGF-Rezeptors - zur EGFRvIII-Isoform - möglicherweise zu einer Cetuximab-Resistenz führt. Falls Cetuximab im Tumorgewebe zur Hemmung EGFR-exprimierender Tumorzellen führen würde, könnte möglicherweise sogar eine gerichtete Selektion in Richtung EGFRvIII-exprimierender Zellen stattfinden. Dies könnte sogar in einer höheren Aggressivität des Tumors resultieren.

4.2 Die *in vitro* Charakterisierung der Wirkung von Cetuximab auf EGFR

In zahlreichen Krebsarten spielt der EGF-Rezeptor eine bedeutende Rolle für die Tumorgenese, da es die Zunahme des Zellwachstums, der Proliferation und zudem die Metastasierung bedingt [64,87,88,89,90,91,92]. Dabei kann die Expression des EGFR von durchschnittlich 70.000 Rezeptoren auf bis zu zwei Millionen Rezeptoren in den Krebszellen ansteigen [86]. Der monoklonale Antikörper Cetuximab wurde entwickelt um zielgerichtet eine bessere Therapierbarkeit von EGFR-exprimierenden Tumoren zu gewährleisten [103,104]. Jedoch wurde schnell sichtbar, dass die Behandlung dieser Tumore mit Cetuximab in der Entwicklung von Resistenzen resultiert [133,138]. Eine solche Therapie ist dann für den Patienten nutzlos. Ungeachtet dessen ist sie mit zahlreichen Nebenwirkungen und zusätzlich mit hohen Kosten verbunden. Somit ist es wichtig nach prädiktiven Biomarkern zu suchen, die

Informationen zum untersuchten Tumor liefern, um eine besser angepasste Therapierbarkeit zu erreichen. Für die Cetuximab-Therapie wurden bereits mehrere negative prognostische Biomarker beschrieben, wie z.B. die Kras-Mutation [130,189,190]. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit die Cetuximab-induzierte Therapieresistenz in EGFR-exprimierenden NR6W- und A431-Zellen näher zu charakterisieren.

4.2.1 Cetuximab hemmt die Aktivierung der Serin- Phosphorylierung des EGFR

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung von Cetuximab an den wildtypischen EGF-Rezeptor zur dessen Internalisierung und Degradation führt [191,192]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Bindung von Cetuximab an EGFR zur Internalisierung der dabei entstandenen Cetuximab-EGFR-Komplexe führt. Die Inkubation von EGFR-exprimierenden Zellen über einen Zeitraum von 72 h mit Cetuximab resultiert zudem auch in einer Abnahme der Phosphorylierung des EGFR an allen untersuchten Tyrosinresten (Y992, Y1045, Y1068 und Y1173) und einer Reduktion der EGF-Rezeptor-Anzahl. Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an den Serinresten 1046/1047 nimmt jedoch im Laufe der 72-stündigen Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper stetig zu. Dieses Ergebnis konnte in Cetuximab- und in Erlotinib-behandelten Zellen sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Serum erzielt werden. Diese Daten weisen somit darauf hin, dass die stärkere Aktivierung der Serinreste am EGFR in Verbindung stehen mit der Hemmung der EGFR-Phosphorylierung an den Tyrosinresten. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die *in vitro* Phosphorylierung der Serinreste 1046/1047 eine Hemmung der Phosphorylierung des EGFR an den Tyrosinresten zur Folge hat. Dies resultiert zusätzlich in einer Reduktion der EGFR-Expression [52,193].

Zusammengefasst führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass durch die Bindung von Cetuximab an EGFR die Liganden-abhängige Aktivierung des EGFR gehemmt wird. Dies resultiert in einer reduzierten Phosphorylierung der Tyrosinreste. Gleichzeitig wird die EGFR-Expression durch die Aktivierung der Serinreste 1046/1047 gehemmt und somit nimmt die Phosphorylierung der Tyrosinreste noch weiter ab.

4.2.2 Cetuximab-Inkubation hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der NR6W- und A431-Zellen mit Cetuximab zwar die Aktivierung von Erk1/2 und Akt hemmt, jedoch nicht die von STAT3. Im Folgenden werden einzeln die Effekte von Cetuximab auf Erk1/2, Akt und STAT3 beschrieben.

Bereits eine einstündige Inkubation der EGFR-exprimierenden Zellen mit Cetuximab resultierte in einer Hemmung der Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2. Die Erk1/2-Phosphorylierung blieb auch während einer längeren Inkubation mit Cetuximab, und zwar über einen Zeitraum von 72 h, gehemmt. Die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 kann durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste 992, 1068, 1086, 1148 und 1173 am EGFR initiiert werden [24,28,29]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Cetuximab-Behandlung eine besonders starke Hemmung der Aktivierung von Y992 und Y1173 des EGFR zur Folge hatte. Dies führt möglicherweise zu der starken Abnahme der Aktivierung von Erk1/2.

In der Arbeit konnte dargestellt werden, dass die hemmende Wirkung von Cetuximab auf Akt nicht so gravierend ausfällt. Eine einstündige Inkubation mit Cetuximab veränderte die Aktivierung von Akt nicht. Erst einer längeren Inkubationszeit der Zellen mit Cetuximab folgte eine Abnahme der Akt-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von Akt verläuft in den meisten Fällen über die Aktivierung der PI3-Kinase. Dabei kommt es zu einer Heterodimerisierung des EGFR mit ErbB3, da der EGF-Rezeptor im Gegensatz zu ErbB3 keine Bindungsstellen für die PI3-Kinase besitzt [35]. Die NR6-Zellen exprimieren neben dem EGF-Rezeptor auch anderen Mitglieder der ErbB-Familie [149]. Eine Hemmung des EGF-Rezeptors führte jedoch nicht zur Hemmung der anderen Mitglieder seiner Familie. Somit kann wahrscheinlich innerhalb der ersten Stunden Akt weiterhin über den ErbB3-Rezeptor aktiviert werden. Einer längeren Inkubationszeit mit Cetuximab folgte eine stärkere Hemmung der EGFR-Phosphorylierung an den untersuchten Tyrosinresten. Folglich wird die Heterodimerisierung von EGFR mit ErbB3 reduziert. Dies könnte in der geringeren Aktivierung von Akt resultieren.

Die Inkubation der NR6W- oder A431-Zellen mit Cetuximab für 1 h inhibierte vollständig die EGF-induzierte Aktivierung von STAT3. STAT3 bindet direkt an den aktivierten EGFR. Somit kann die Gabe von Cetuximab, die zur Hemmung der Phosphorylierung der Tyrosinreste des EGFR führt, auch die Anlagerung von STAT3

hemmen. Interessanterweise resultiert eine längere Behandlung der NR6W- und A431-Zellen mit Cetuximab, und zwar über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h, in einer erhöhten Expression von STAT3 und der damit verbundenen Aktivierung dieses Proteins. Die verstärkte Expression und Phosphorylierung von STAT3 blieb auch über 6 Tage bestehen. Bereits Lu *et al.* konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Cetuximab eine stärkere Aktivierung von STAT3 (Y705) in A431- und H3255-Zellen zur Folge hat [194]. Im Gegensatz dazu führte in dieser Arbeit die Inkubation der NR6W-Zellen mit Cetuximab in Serum-freiem Medium nicht zur erhöhten Aktivierung oder Expression von STAT3. Somit wird die durch Cetuximab induzierte, erhöhte Expression und Aktivierung von STAT3, nicht alleine durch die Hemmung von EGFR bewirkt, sondern zusätzlich durch die im Serum vorhandene Faktoren. Wir konnten zudem zeigen, dass während einer Inkubation der Zellen mit Erlotinib, einem EGFR-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor, die Menge an STAT3 nicht zunimmt. Ebenfalls verändert sich die Anzahl und Aktivierung der STAT3-Proteine in Cetuximab-behandelten NR6-Zellen nicht.

Zusammengenommen führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass die erhöhte Expression und Aktivierung von STAT3 Faktoren bedarf, die im Serum vorhanden sind. Zudem resultiert die erhöhte Aktivierung von STAT3 nur durch die Gabe von Cetuximab.

4.2.3 Das Überleben der EGFR-exprimierenden Zellen ist STAT3-vermittelt

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Inkubation EGFR-exprimierender Zellen mit Cetuximab zur Hemmung des EGF-Rezeptors und der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Erk1/2 und Akt führt. Gleichzeitig resultiert die Cetuximab-Behandlung in einer erhöhten Zahl der STAT3-Proteine und einer stärkeren Aktivierung von STAT3. Daraus ergibt sich eine ungleiche Verteilung der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3, die allerdings wesentlich für das Zellüberleben, die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung sind [44,50]. Somit wurde in dieser Arbeit geschaut, ob die Zellproliferation oder das Zellüberleben durch die Cetuximab-vermittelte Änderung der Aktivierung der nachgeschalteten Signalproteine verändert wird. Die Untersuchung des Zellüberlebens offenbart, dass die Inkubation mit Cetuximab das Zellwachstum und die metabolische Zellaktivität nicht beeinflusst. Zellüberleben, das mit Hilfe der Bcl-2-

und Bcl-xL-Proteine analysiert wurde, ist ebenfalls nicht verändert. Zudem wurde mit Hilfe des Immunoblots gezeigt, dass die Expression des während der Proliferation aktivem Cyclin D1 unter Cetuximab-Einfluss gleich bleibt. Jedoch führt alleine die Hemmung der STAT3-Aktivität durch Stattic zum Zelltod. Daraus folgt, dass die aktivierte Form des STAT3-Proteins in den NR6W- und A431-Zellen überlebenswichtig ist. Im Gegensatz zu normalen Zellen, in denen STAT3 nur transient phosphoryliert wird, ist STAT3 in verschiedenen Tumoren konstitutiv aktiv [157]. Auch hier wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von STAT3 signifikant stärker in den A431- und NR6W-Zellen ausfällt als in den wtU87MG-Zellen. Es ist bereits bekannt, dass die Anwesenheit des konstitutiv aktivem STAT3 mit einer erhöhten Zellproliferation und einem verbesserten Zellüberleben korreliert [195,196]. Zusammengefasst führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass möglicherweise die gestiegene Anzahl und die damit verbundene stärkere Aktivierung von STAT3 in Cetuximab-behandelten Zellen zum Zellüberleben führen.

4.2.4 Cetuximab induziert DNA-Reparatur mittels der Eme1-Endonuklease

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe des BrdU-Assays sichtbar gemacht werden, dass Cetuximab zu einer erhöhten Rate an DNA-Neusynthese führt. Die DNA-Neusynthese nimmt während der Zellproliferation zu und sie steigt ebenfalls bei DNA-Reparaturvorgängen an [44,173,174]. Die Cetuximab-induzierte Zellproliferation konnte bereits ausgeschlossen werden und somit wurde nach möglichen DNA-Reparaturvorgängen geschaut.

Zunächst wurde untersucht, ob Signalproteine, die als Antwort auf DNA-Schäden phosphoryliert werden, Cetuximab-abhängig aktiviert werden. Die im Abschnitt 3.3.5.3 vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Cetuximab zur Phosphorylierung der Proteine p53 am Serinrest 15 und Chk1 am Serinrest 296 führt. Die Chk1-Kinase wird hauptsächlich durch die ATR-Kinase aktiviert. Diese Kinase fungiert als eine Art „Sensor-Protein“, die an die Stelle der DNA-Schädigung bindet [197]. Die rekrutierte Chk1-Kinase phosphoryliert daraufhin p53 am Serinrest 15. Die Kinase Chk1 ist in die DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) eingebunden, da sie bestimmte Reparaturenzyme wie z.B. die DNA-abhängigen Proteinkinase aktiviert [171]. Das Protein p53 ist in die Regulation zweier DNA-Reparatur-Signalwege involviert, namentlich das NER (nucleotide excision repair) und das BER (base excision repair)

[172]. Die Phosphorylierung von Chk1 und p53 weisen darauf hin, dass bestimmte Signalwege aktiviert werden, die als Antwort auf DNA-Schädigungen dienen. Cetuximab ist jedoch keine Substanz, die zu Schäden im Genom führt. Aber möglicherweise induziert Cetuximab die Reparatur bereits vorhandener DNA-Schäden. In dieser Arbeit konnte dies experimentell mit Hilfe der Ultraviolett-Strahlung veranschaulicht werden. UVC-Strahlung verursacht UV-spezifische Basenschädigungen, die zu Doppelstrangbrüchen führen [169,170]. Eine große Anzahl dieser Veränderungen hat zudem eine apoptoseauslösende Wirkung [198]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die meisten Zellen die Bestrahlung mit UVC-Licht nicht überlebten. Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit Cetuximab führte allerdings dazu, dass signifikant mehr Zellen die Behandlung mit DNA-schädigender Strahlung überlebten. Dies lässt darauf schließen, dass die Zellen in Gegenwart von Cetuximab einen Teil der DNA-Schäden reparieren konnten und somit dem Zelltod entgingen. Darüber hinaus ist es wichtig zu erwähnen, dass die meisten humanen Tumore genomisch instabil sind. Es gibt unterschiedliche Ausprägungen der genomischen Instabilität, wie beispielsweise die chromosomale Instabilität (CIN) oder die Mikrosatelliten-Instabilität (MSI). Die zugrunde liegenden Mechanismen der Entstehung der genomischen Instabilität sind weitgehend ungeklärt [199]. Für hereditäre Tumore wurde beispielsweise gezeigt, dass genomische Instabilität durch Mutationen der DNA-Reparatur-Gene verursacht werden kann, die dann die Tumorentstehung antreiben [200,201,202]. Darüber hinaus induziert z.B. die Aktivierung verschiedener Onkogene, die für die Zellproliferation verantwortlich sind, genomische Instabilität in kultivierten Säugetierzellen und humanen Xenotransplantaten [203,204,205]. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des BrdU-Assays gezeigt werden, dass die EGFR-exprimierenden Zellen eine hohe Proliferationsrate, sichtbar als DNA-Neusynthese, aufweisen. NR6W-Zellen zeigen eine signifikant höhere Anzahl an BrdU-positiven Zellen als NR6-Zellen. Die A431-Zellen weisen ebenfalls eine hohe DNA-Neusyntheserate auf. Der Comet-Assay veranschaulicht, dass sowohl NR6W-Zellen als auch A431-Zellen eine höhere Anzahl an kurzen DNA-Fragmenten aufweisen, als die Cetuximab-behandelten Zellen. Dies weist darauf hin, dass diese Zellen möglicherweise eine genomische Instabilität aufweisen, die dann mit Hilfe von Cetuximab teilweise behoben wird.

Es war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit den Mechanismus, der zur DNA-Reparatur in Cetuximab-behandelten Zellen führt, näher zu charakterisieren. Vigneron *et al.* beschrieben 2008 ein Modell, in dem die EGFR-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 zur Aktivierung der Endonuklease Eme1 führt [51]. Sowohl in den NR6W- als auch in den A431-Zellen resultiert Cetuximab in einer vermehrten Bildung und Aktivierung von STAT3. Eine Untersuchung von Eme1 im Immunoblot hat gezeigt, dass die Inkubation der NR6W- und A431-Zellen mit Cetuximab die Stabilität des Eme1-Proteins erhöht und dies somit zu dem erhöhten Eme1-Proteinlevel führt. Zudem konnte mittels des posttranskriptionellen Gensilencing bestätigt werden, dass Eme1 in Cetuximab-behandelten Zellen die DNA-Neusynthese induziert und das Zellüberleben UVC-bestrahlter Zellen signifikant verbessert. Eme1 wurde als Mitglied der XPF-Endonuklease-Familie identifiziert und spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur [174,206]. Das Protein Eme1 interagiert mit Mus81 in einem Komplex als eine heterodimere Endonuklease und repariert während der Replikation entstandene Schäden. Dabei beseitigt dieser Komplex kollabierte Replikationsgabeln und aktiviert den homologen Replikationsprozess [173,174]. Als heterodimere Endonuklease schneidet sie vorwiegend offenkettige Holliday-Verbindungen, abweichende Replikationsgabel-Strukturen, D-Schleifen und 3'-Seitenketten [174].

Zusammengenommen führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass die gestiegene DNA-Neusyntheserate der Cetuximab-behandelten Zellen durch eine Aktivierung der DNA-Reparatur verursacht wird. Die DNA-Schädigung wird über die Proteine Chk1 und p53 angezeigt und die DNA-Reparatur wird wahrscheinlich unter anderem über die Endonuklease Eme1 vermittelt.

4.2.5 Zusammenhänge zwischen STAT3, Chk1, p53 und Eme1 bezüglich der DNA-Reparatur

In der Literatur werden mögliche Zusammenhänge zwischen der STAT3-Aktivierung und der DNA-Reparatur diskutiert. Kürzlich haben Barry *et al.* gezeigt, dass das STAT3-Protein eine entscheidende Rolle in der Beantwortung vorhandener DNA-Schäden spielt. Sie konnten zeigen, dass in STAT3-defizienten Zellen die DNA-Reparatur nach DNA-Schädigung weniger Effizient ausfällt. In diesen Zellen wiesen auch die ATM-Chk2- und ATR-Chk1-Signalwege eine reduzierte Aktivität auf [207]. Darüber hinaus gibt es mehrere Hinweise darauf, dass möglicherweise Chk1 und

p53 die Aktivität von Eme1 beeinflussen. Zum Beispiel konnte Dendouga *et al.* zeigen, dass die Mus81^{-/-}-Zellen der Maus eine erhöhte Phosphorylierung von Chk1 aufweisen, was darauf hinweist, dass der Chk1-vermittelte Kontrollpunkt als Antwort auf spontane DNA-Schädigung aktiviert ist [208]. Auch Hiyama *et al.* haben gezeigt, dass Chk1 und Chk2 während der S-Phase in den Zellen stärker phosphoryliert werden, in denen Eme1 oder Mus81 nicht mehr funktionsfähig ist [209]. Eine stärkere Phosphorylierung von p53 wurde in Mus81^{-/-}-Zellen beobachtet und zwar während der Inkubation mit Mitomycin C. Dieses Zytostatikum hemmt die DNA-Synthese, da es mit der DNA interkaliert und die DNA-Stränge kovalent aneinander bindet [210]. Somit kann die Transkription beziehungsweise DNA-Replikation nicht mehr stattfinden. Dies weist darauf hin, dass in Abwesenheit von Mus81 der p53-abhängige Kontrollpunkt als Antwort auf quervernetzte DNA-Schädigungen induziert wird, die innerhalb eines DNA-Stranges auftreten [211]. Kobayashi *et al.* konnten zeigen, dass möglicherweise der Mus81-Eme1-Komplex eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Unversehrtheit des Genoms spielt und zwar in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kontrollpunkten wie z.B. Chk1 und p53 [212].

4.2.6 Aktivierung der Eme1-vermittelten DNA-Reparatur resultiert in einer Therapieresistenz

In der Klinik wird Cetuximab bei Lymphadenomen, Brustkrebs, kolorektalem Karzinom (CRC) und Kopf- und Halstumoren (HNC) angewendet [213,214,215]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ungeachtet der ganz unterschiedlichen Ätiologie des Tumors, eine Cetuximab-Monotherapie nur in ca. 8 % bis 10 % der Erkrankungen therapeutisch wirksam ist. Somit wird Cetuximab mit der Radio- oder Chemotherapie kombiniert, da die therapeutische Effizienz dann auf bis zu 30 % steigt [113,216,217]. Beispielsweise führt eine Behandlung mit ionisierender Strahlung zu DNA-Läsionen, die in Einzel- oder Doppelstrangbrüchen resultieren. Wenn die Läsionen jedoch nicht schnell und effizient genug repariert werden, führt dies zur Beendigung der Zellteilung und anschließendem Tod der Tumorzelle [218]. Tomoda *et al.* beschrieben in ihrer 2009 erschienenen Publikation, dass eine erhöhte Expression des Eme1-Proteins mit einer Resistenz gegen zahlreiche DNA-schädigende Agentien korreliert. Beispielsweise wurde vor kurzem demonstriert, dass Eme1 als Marker für eine Cisplatin-Resistenz fungiert. Tomoda und seine Mitarbeiter fanden heraus, dass hohe Level an Eme1 zu einer geringeren Cisplatin-

Sensitivität führen [219]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cetuximab zur erhöhten Anzahl an Eme1 und somit wahrscheinlich einer Zunahme an DNA-Reparatur-Komplexen führt. Möglicherweise könnte eine Therapieresistenz, bei einer gleichzeitigen Tumorbehandlung mit Cetuximab und ionisierender Strahlung, dadurch bedingt sein, dass die erhöhte Eme1-Anzahl in einer erhöhten DNA-Reparatur resultieren würde. Einerseits würde die angewandte Strahlentherapie DNA-Läsionen induzieren, andererseits würde Cetuximab die Stabilität der DNA-Reparatur-Proteine erhöhen und somit zu einer effektiveren DNA-Reparatur führen.

4.2.7 Zusammenfassung

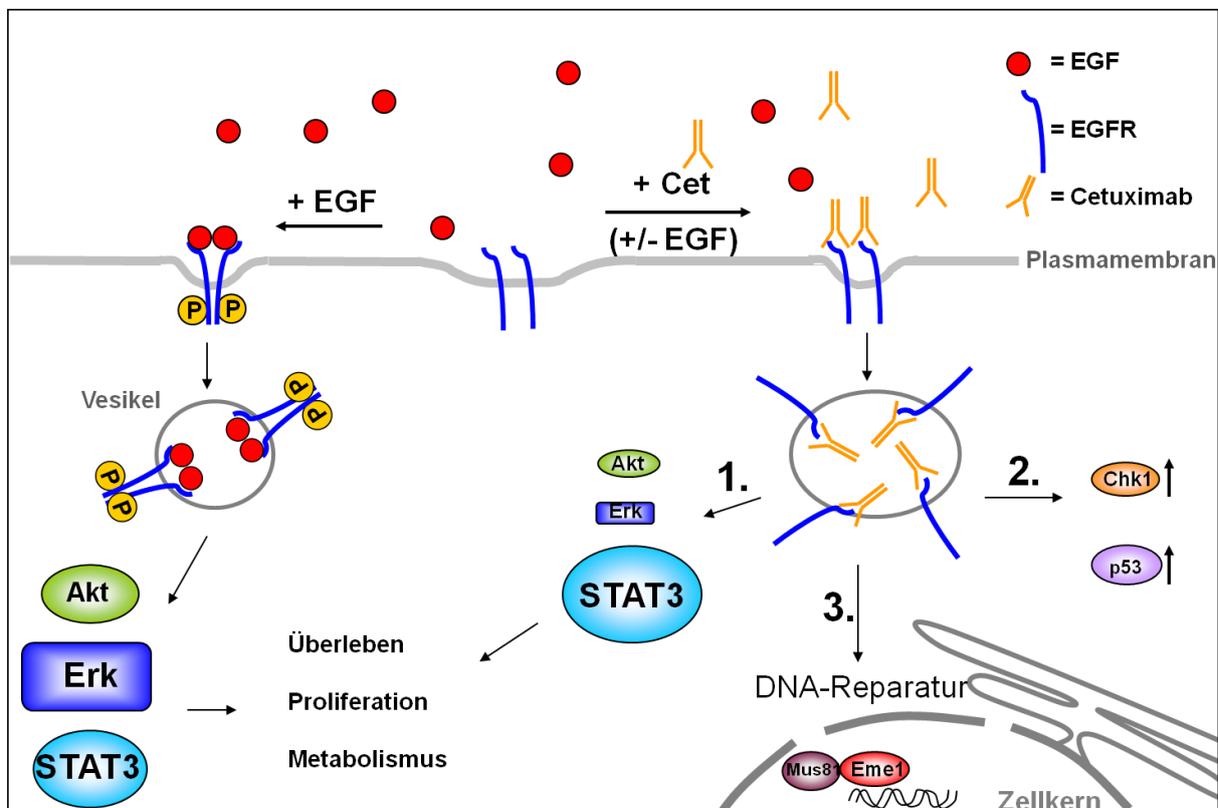


Abb. 35: Modell der Wirkung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab auf den EGF-Rezeptor im Zellkulturmodell

In Anwesenheit des epidermalen Wachstumsfaktors, bindet dieser an den EGF-Rezeptor. Dies führt zum EGFR-Dimerbildung und Rezeptoraktivierung. Daraufhin wird der Rezeptor internalisiert und es folgt die Aktivierung der Signaltransduktionsfaktoren Akt, Erk1/2 und STAT3, die unter anderem Zellüberleben und Zellproliferation vermitteln. Die Bindung von Cetuximab an EGFR hemmt die Liganden-vermittelte Aktivierung des EGF-Rezeptors. Somit wird die Phosphorylierung der Signaltransduktionsfaktoren Akt und Erk1/2 verhindert (1.). Eine Inkubation der Zellen in serumhaltigem Medium offenbarte, dass eine stärkere Aktivierung von STAT3 stattfindet (1.). Darüber hinaus resultiert die Inkubation mit Cetuximab in der Phosphorylierung von Proteinen, die als Antwort

auf DNA-Schädigung (Chk1 und p53) aktiviert werden (2.). Zudem aktiviert Cetuximab die Eme1-vermittelte DNA-Reparatur (3.).

Der monoklonale Antikörper Cetuximab wird in der Klinik zur Blockade des EGF-Rezeptors bei verschiedenen Tumorerkrankungen, wie beispielsweise dem kolorektalem Karzinom oder dem Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses eingesetzt [214,215,217]. In den letzten Jahren wurde demonstriert, dass die Therapie in vielen Fällen nicht wirksam ist, da es beispielsweise zu Entwicklungen von Resistenzen kommen kann [113]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass die NR6W- und A431-Zellen trotz Hemmung des EGF-Rezeptors und der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt und Erk1/2 überleben (Abb.35). Das Überleben dieser Zellen konnte wahrscheinlich durch die stärkere Aktivierung von STAT3 vermittelt werden. Es konnte jedoch nicht aufgeklärt werden, welche Proteine die erhöhte Expression und Aktivierung von STAT3 verursachen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cetuximab zu einer erhöhten DNA-Neusyntheserate führt, die durch eine gestiegene DNA-Reparatur bedingt ist. Cetuximab-vermittelte DNA-Reparatur wird möglicherweise über die Proteine Chk1, p53 und Eme1 erreicht (Abb. 35). Inwieweit die Aktivierung von Chk1 und p53 zur erhöhten Expression von Eme1 führt, konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass die Phosphorylierung von Chk1 und p53 einen Einfluss auf die Expression von Eme1 haben und umgekehrt. Die erhöhte Anzahl an Eme1 führt möglicherweise zu einer Zunahme der Eme1-Mus81-Komplexe, die als heterodimere Endonukleasen in einer gestiegenen Zahl an DNA-Reparatur-Ereignissen resultieren.

Die meisten Cetuximab-Therapien werden nicht als Monotherapie angeboten, sondern in Kombination mit einer Radio- oder Strahlentherapie. Beispielsweise resultiert eine Bestrahlung mit γ -Strahlen neben Einzel- und Doppelstrangbrüche auch in zahlreichen oxidativen DNA-Schäden [220]. Die Aktivierung der DNA-Reparatur durch Cetuximab bei einer gleichzeitig angewandten Strahlentherapie könnte die Tumorthherapie insgesamt ineffektiv machen. Die beispielsweise mittels der γ -Strahlung induzierten DNA-Läsionen könnten durch zusätzliche Gabe von Cetuximab und die damit aktivierte Eme1-vermittelte DNA-Reparatur zum Teil repariert werden. Damit könnte die erhöhte Anzahl an Eme1-Proteinen, die während einer Cetuximab-Behandlung gebildet werden, möglicherweise zu einer Therapieresistenz führen.

5 Ausblick

5.1 EGFRvIII

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cetuximab die mitochondriale Aktivität in EGFRvIII-exprimierenden Zellen erhöht. Zudem resultierte dies in einer stärkeren Kollokalisierung zwischen EGFRvIII und Mitochondrien, jedoch nicht zwischen EGFR und Mitochondrien. Es wäre interessant zu untersuchen, welche Auswirkungen andere EGFR-Mutanten auf die mitochondriale Aktivität und Lokalisierung bei einer Cetuximab-Therapie haben. Denkbar wäre, dass das Vorhandensein oder das Fehlen bestimmter EGFR-Domänen für die mitochondriale Lokalisierung eine Rolle spielen. Möglicherweise spielt auch der Phosphorylierungszustand der zytoplasmatischen Regulationsdomäne des EGF-Rezeptors eine Rolle bei der Mitochondrien-assoziierten Lokalisierung.

Die Auswirkungen einer Cetuximab-Therapie in EGFRvIII-exprimierenden Zellen werden in der Literatur sehr kontrovers diskutiert [136,177,178]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch andere Signale in der Zelle darüber entscheiden, ob eine Cetuximab-Therapie erfolgreich oder erfolglos sein wird. Möglicherweise spielen die Mitochondrien hierbei eine wichtige Rolle. Es wurde bereits gezeigt, dass Mitochondrien-lokalisierte EGF-Rezeptoren mit der Zellviabilität korrelieren [187]. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob eine Verhinderung der mitochondrialen Mitwirkung negative Auswirkungen auf das Zellüberleben Cetuximab-behandelter Zellen hätte.

Auch andere Proteine könnten bei der Mitochondrien-assoziierten Lokalisierung der tumorspezifischen Variante eine Rolle spielen. Kürzliche wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Src für die mitochondriale Lokalisierung von EGFRvIII verantwortlich sein könnte [221]. Es ist bereits bekannt, dass die Familien der Src-Kinasen eine Rolle bei der Cetuximab-assoziierten Resistenzentwicklung eine Rolle spielen [222]. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob Cetuximab in EGFRvIII-exprimierenden Zellen die Src-Aktivierung positiv beeinflusst und auf diese Weise zu der mitochondrialen Lokalisierung von EGFRvIII führt.

Es ist bekannt, dass sich Tumorzellen an unterschiedliche Sauerstoffbedingungen anpassen. Das tun sie, indem sie den Stoffwechsel auf aerobe Glykolyse umstellen,

ein Phänomen mit dem Namen „Warburg-Effekt“ [223]. Als nächster Schritt wäre es daher interessant zu untersuchen, welche Auswirkungen die Mitwirkung der Mitochondrien in Gegenwart von Cetuximab auf den Stoffwechsel der Tumorzelllinie haben.

5.2 EGFR

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des EGF-Rezeptors mittels Cetuximab den Zelltod nicht herbeiführt. Das bedeutet, dass die Zellen auf die Cetuximab-Therapie nicht ansprechen. Darüber hinaus resultiert die Cetuximab-Therapie sogar in einer Initiierung der Eme1-vermittelten DNA-Reparatur. Diese Ergebnisse wurden in dieser Arbeit mittels einer murinen Zelllinie (NR6W-Zelle) und einer humanen Zelllinie des epidermoiden Karzinoms (A431-Zellen) gezeigt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Cetuximab auch in anderen Zelllinien anderer Tumorentitäten zur Aktivierung der Eme1-vermittelten DNA-Reparatur führt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Eme1-vermittelte DNA-Reparatur mittels UVC-Licht veranschaulicht werden. Cetuximab wird in der Klinik in Kombination mit DNA-schädigenden Substanzen wie Zytostatika oder Bestrahlung an vielen unterschiedlichen Tumorerkrankungen durchgeführt [103,118,119,120,121]. Somit wäre es möglich, dass eine Aktivierung der DNA-Reparatur durch die Cetuximab-Gabe bei einer gleichzeitig angewandten Strahlentherapie beispielsweise mit γ -Strahlung die Tumorthherapie insgesamt ineffektiv machen könnte. Es wäre interessant dies zunächst im Zellkulturmodell und später im Tiermodell zu untersuchen. Eine immunohistochemische Untersuchung der Eme1-Level in Rezidiven bzw. Metastasen Cetuximab-behandelter Patienten könnte ebenfalls Informationen darüber liefern, ob Eme1 an der Cetuximab-Resistenz beteiligt ist. Erste Versuche mit primären Zellen, die aus höhergradigen Gliomen gewonnen wurden, weisen darauf hin, dass Cetuximab zur Anreicherung von Eme1 führen kann. Die Kultivierung von weiterem Tumorgewebe aus unterschiedlichen Tumorentitäten, könnte dazu verwendet werden, um eine mögliche Eme1-gerichtete DNA-Reparatur nachzuweisen.

Welche Rolle der EGF-Rezeptor, oder hierbei die Hemmung des EGF-Rezeptors bei der Aktivierung von Eme1 spielt, konnte in dieser Arbeit nur marginal bearbeitet werden. Es ist beispielsweise bekannt, dass das Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie nicht immer mit einem hohen EGFR-Status korreliert [224,225]. Zudem ist

bekannt, dass eine Behandlung mit Cetuximab wirkungslos ist, wenn Mutationen EGFR stromaufwärts-gelegener Proteine wie z.B. von Ras auftreten [189,190]. Somit ist es denkbar, dass auch andere Faktoren über den erfolgreichen oder erfolglosen Ausgang der Cetuximab-Therapie mitbestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cetuximab zu einer stärkeren Aktivierung von STAT3 führt. Jedoch konnte nicht geklärt werden, weshalb die Cetuximab-spezifische Hemmung des EGF-Rezeptors die Phosphorylierung von STAT3 induziert. Es ist ebenfalls unklar, ob aktiviertes STAT3 die Stabilität des Eme1-Proteins beeinflusst. Daher wäre es interessant diese Cetuximab-spezifische Aktivierung von STAT3 und deren Einfluss auf die Eme1-Endonuklease näher zu charakterisieren. Darüber hinaus wäre es wichtig zu untersuchen, inwieweit die Aktivierung von Chk1 und p53 die Stabilität von Eme1 beeinflussen.

Eine kürzlich erschienene Publikation konnte zeigen, dass Wee1 die Eme1/Mus81-Endonuklease-Aktivität beeinflusst [226]. Wee1 ist eine Serin-/Threonin- und Tyrosinkinase, die die Cyclin-abhängigen Kinasen reguliert. Die Wee1-Proteinlevel werden vorwiegend während des Zellzyklus reguliert [227,228]. Dabei postulierten Martin *et al.*, dass Wee1 möglicherweise sogar einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Endonuklease haben könnte. Somit würde die Anwesenheit von Wee1 dazu führen, dass Eme1/Mus81 inhibiert wird und DNA-Schäden nicht beseitigt werden können [229]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cetuximab die Stabilität des Eme1-Proteins stabilisiert. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Wee1 dabei eine Rolle spielt.

6 Abkürzungsverzeichnis

6-4PPs	(6-4) Fotoprodukte
ADCC	engl. <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AG490	2-Cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(benzyl)-2-propenamide
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Amphiregulin
ATM	engl. <i>ataxia telangiectasia mutated kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	engl. <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase</i>
BAD	engl. <i>Bcl-2/Bcl-XL-associated death promoter</i>
BCA	Bichinonsäure
Bcl	engl. <i>B-cell lymphoma</i>
BER	engl. <i>base excision repair</i>
BRCA	engl. <i>breast cancer susceptibility protein</i>
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calciumionen
Cbl	engl. <i>casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i>
CDC	engl. <i>complement dependent cytotoxicity</i>
CDK	engl. <i>cyclin dependent kinase</i>
CDKI	engl. <i>cyclin dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	komplementäre DNA
Cet	Cetuximab
Chk	engl. <i>checkpoint kinase</i>
CIN	chromosomale Instabilität
CPDs	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
CRC	Colorektales Karzinom
CR-Subdomäne	Cystein-reiche Subdomäne
Ct	threshold value
d	Tag
DAG	1,2-Diacylglycerin (DAG)
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	engl. <i>epidermal growth factor receptor variant III</i> (auch bekannt unter dem Namen $\Delta 801$ egfr oder de2-7egfr)
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
Eme1	engl. <i>essential meiotic endonuclease 1</i>
EMA	engl. <i>European Medicines Agency</i>
ErbB	engl. <i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
Erk	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> (Maskulinum), <i>et aliae</i> (Femininum), und andere
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fötale Kälberserum
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	engl. <i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	engl. <i>fibroblast growth factor receptor</i>
Fc	konstante Region des Antikörper-Fragments
FcR	Fc-Rezeptor
Fv	variable Region des Antikörper-Fragments
G418	Geneticin
GAP	engl. <i>GTPase activating protein</i>
Gab	engl. <i>Grb2-associated-binding protein</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
GDP	engl. <i>guanosine diphosphate</i>
GEF	engl. <i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GOI	engl. <i>gene of interest</i>
Grb	engl. <i>growth factor receptor-bound protein</i>
GTP	engl. <i>guanosine triphosphate</i>
h	Stunde
HB-EGF	Heparin-bindendes EGF
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HER1	engl. <i>human epidermal growth factor receptor</i>

HNC	Kopf- und Halstumor
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IFN α	engl. <i>interferone alpha</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP ₃	Inosit-(1,4,5)-trisphosphat
JAK	Janus-Kinase
Kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
Kras	engl. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L-Subdomäne	Leucin-reiche Subdomäne
LIF	engl. <i>leukemia inhibitory factor</i>
min	Minute
MAC	Membran-Angriffskomplex
MAPK	engl. <i>mitogen activated protein kinase</i>
Mek	MAPK/Erk kinase
MEM	engl. <i>Minimal Essential Medium</i>
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
MSK-1	engl. <i>mitogen and stress activated kinase 1</i>
mTORC2	engl. <i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
Mus81	engl. <i>methyl methanesulfonate-sensitive UV-sensitive 81</i>
NER	engl. <i>nucleotide excision repair</i>
NRG	Neuregulin/Heregulin
OSM	Oncostatin M
p90RS6K	engl. <i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	engl. <i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	engl. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDK1	engl. <i>phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PH	pleckstrin homology
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinosit-3,4,5-trisphosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PKB	Proteinkinase B /Akt
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipasen
PLCy	Phospholipase C gamma
PLL	Poly-L-Lysin Hydrobromid
PTB	engl. <i>phosphotyrosine binding</i>
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatasen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	engl. <i>rat sarcoma</i>
Raf	engl. <i>rat fibrosarcoma</i>
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay- buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Serinrest
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH	engl. <i>src homology</i>
Shc	engl. <i>Src homology domain-containing protein C</i>
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
Sos	engl. <i>son of sevenless</i>
Src	engl. <i>sarcoma kinase</i>
STAT	engl. <i>signal transducers and activators of transcription</i>
Stattic	6-nitro-benzo[b]thiophene-1,1-dioxide 1
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	engl. <i>Tris-buffered saline Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF α	engl. <i>transforming growth factor</i>
Tim23	engl. <i>translocase of the inner membrane 23</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp
Y	Tyrosinrest

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (internationales Einheitssystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt. Aminosäuren

wurden mit dem international gebräuchlichen Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

7 Literaturverzeichnis

1. Cohen S (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562.
2. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 361-370.
3. Overman MJ, Hoff PM (2007) EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 50: 1259-1270.
4. Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5: 341-354.
5. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, et al. (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12: 541-552.
6. Ward CW, Hoyne PA, Flegg RH (1995) Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. *Proteins* 22: 141-153.
7. Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, et al. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11: 507-517.
8. Summerfield AE, Hudnall AK, Lukas TJ, Guyer CA, Staros JV (1996) Identification of residues of the epidermal growth factor receptor proximal to residue 45 of bound epidermal growth factor. *J Biol Chem* 271: 19656-19659.
9. Schlessinger J (2003) Signal transduction. Autoinhibition control. *Science* 300: 750-752.
10. Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, et al. (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110: 763-773.
11. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, et al. (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110: 775-787.
12. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, et al. (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7: 301-311.
13. Yarden Y (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4: S3-8.
14. Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE (1995) Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 15: 1182-1191.
15. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16: 1647-1655.
16. Mitsudomi T, Yatabe Y (2010) Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 277: 301-308.
17. Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, et al. (1999) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274: 8335-8343.
18. Stover DR, Becker M, Liebetanz J, Lydon NB (1995) Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. *J Biol Chem* 270: 15591-15597.

19. Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG, Jr., Miralpeix M, White MF (1993) Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13: 7418-7428.
20. Schlessinger J (1994) SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* 4: 25-30.
21. Pawson T (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* 373: 573-580.
22. Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, et al. (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89: 693-702.
23. Lurje G, Lenz HJ (2009) EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 77: 400-410.
24. Batzer AG, Rotin D, Urena JM, Skolnik EY, Schlessinger J (1994) Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 14: 5192-5201.
25. Buday L, Downward J (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: 611-620.
26. Hallberg B, Rayter SI, Downward J (1994) Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem* 269: 3913-3916.
27. Liebmann C (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 13: 777-785.
28. Cockcroft S, Thomas GM (1992) Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem J* 288 (Pt 1): 1-14.
29. Fisher SK, Heacock AM, Agranoff BW (1992) Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update. *J Neurochem* 58: 18-38.
30. Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321.
31. Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
32. Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17: 4426-4441.
33. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8: 11-31.
34. Yu J, Wjasow C, Backer JM (1998) Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem* 273: 30199-30203.
35. Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, et al. (1993) Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem* 268: 9478-9483.
36. Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 489-501.
37. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
38. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, et al. (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 16: 3693-3704.
39. Franke TF, Cantley LC (1997) Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Nature* 390: 116-117.
40. Brivanlou AH, Darnell JE, Jr. (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295: 813-818.

41. Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 651-662.
42. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl: S121-131.
43. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, et al. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1-20.
44. Brantley EC, Benveniste EN (2008) Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol Cancer Res* 6: 675-684.
45. Xia L, Wang L, Chung AS, Ivanov SS, Ling MY, et al. (2002) Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation. *J Biol Chem* 277: 30716-30723.
46. Shao H, Cheng HY, Cook RG, Tweardy DJ (2003) Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 63: 3923-3930.
47. Quesnelle KM, Boehm AL, Grandis JR (2007) STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J Cell Biochem* 102: 311-319.
48. Song JI, Grandis JR (2000) STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 19: 2489-2495.
49. Silva CM (2004) Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23: 8017-8023.
50. Huang PH, Cavenee WK, Furnari FB, White FM (2007) Uncovering therapeutic targets for glioblastoma: a systems biology approach. *Cell Cycle* 6: 2750-2754.
51. Vigneron A, Gamelin E, Coqueret O (2008) The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Emel endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res* 68: 815-825.
52. Theroux SJ, Latour DA, Stanley K, Raden DL, Davis RJ (1992) Signal transduction by the epidermal growth factor receptor is attenuated by a COOH-terminal domain serine phosphorylation site. *J Biol Chem* 267: 16620-16626.
53. Brautigan DL, Bornstein P, Gallis B (1981) Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J Biol Chem* 256: 6519-6522.
54. Faure R, Baquiran G, Bergeron JJ, Posner BI (1992) The dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors. Role of endosome-associated phosphotyrosine phosphatase(s). *J Biol Chem* 267: 11215-11221.
55. Tenev T, Keilhack H, Tomic S, Stoyanov B, Stein-Gerlach M, et al. (1997) Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera. *J Biol Chem* 272: 5966-5973.
56. Keilhack H, Tenev T, Nyakatura E, Godovac-Zimmermann J, Nielsen L, et al. (1998) Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling. *J Biol Chem* 273: 24839-24846.
57. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, et al. (1998) Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17: 3385-3397.
58. Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y (1998) Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem* 273: 13819-13827.
59. Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, et al. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human

- glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 56: 5079-5086.
60. Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS (2001) The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* 12: 745-760.
 61. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990) Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8602-8606.
 62. Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, Zalutsky MR, Bigner DD (1998) The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol* 4: 148-158.
 63. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, et al. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2965-2969.
 64. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, et al. (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55: 5536-5539.
 65. Moscatello DK, Montgomery RB, Sundareshan P, McDanel H, Wong MY, et al. (1996) Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene* 13: 85-96.
 66. Huang PH, Xu AM, White FM (2009) Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal* 2: re6.
 67. Chu CT, Everiss KD, Wikstrand CJ, Batra SK, Kung HJ, et al. (1997) Receptor dimerization is not a factor in the signalling activity of a transforming variant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII). *Biochem J* 324 (Pt 3): 855-861.
 68. Tang CK, Gong XQ, Moscatello DK, Wong AJ, Lippman ME (2000) Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res* 60: 3081-3087.
 69. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, et al. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 272: 2927-2935.
 70. Prigent SA, Nagane M, Lin H, Huvar I, Boss GR, et al. (1996) Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem* 271: 25639-25645.
 71. Montgomery RB, Moscatello DK, Wong AJ, Cooper JA, Stahl WL (1995) Differential modulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase/extracellular signal-related kinase kinase and MAP kinase activities by a mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 270: 30562-30566.
 72. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, Wong AJ (1998) Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273: 200-206.
 73. Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, et al. (2002) Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res* 62: 6764-6769.
 74. Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, et al. (2007) Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12867-12872.

75. de la Iglesia N, Konopka G, Puram SV, Chan JA, Bachoo RM, et al. (2008) Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes Dev* 22: 449-462.
76. Longva KE, Blystad FD, Stang E, Larsen AM, Johannessen LE, et al. (2002) Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol* 156: 843-854.
77. Grovdal LM, Stang E, Sorkin A, Madshus IH (2004) Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation. *Exp Cell Res* 300: 388-395.
78. Davies GC, Ryan PE, Rahman L, Zajac-Kaye M, Lipkowitz S (2006) EGFRvIII undergoes activation-dependent downregulation mediated by the Cbl proteins. *Oncogene* 25: 6497-6509.
79. Han W, Zhang T, Yu H, Foulke JG, Tang CK (2006) Hypophosphorylation of residue Y1045 leads to defective downregulation of EGFRvIII. *Cancer Biol Ther* 5: 1361-1368.
80. Grandal MV, Zandi R, Pedersen MW, Willumsen BM, van Deurs B, et al. (2007) EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. *Carcinogenesis* 28: 1408-1417.
81. Cooper GM, Hausman RE (2009) *The cell: a molecular approach*: ASM Press.
82. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS (2006) Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 6: 876-885.
83. Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK (2002) Focus on colon cancer. *Cancer Cell* 1: 233-236.
84. Herbst RS, Shin DM (2002) Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 94: 1593-1611.
85. de Bono JS, Rowinsky EK (2002) The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med* 8: S19-26.
86. Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, et al. (1983) Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1337-1341.
87. Imai Y, Leung CK, Friesen HG, Shiu RP (1982) Epidermal growth factor receptors and effect of epidermal growth factor on growth of human breast cancer cells in long-term tissue culture. *Cancer Res* 42: 4394-4398.
88. Veale D, Kerr N, Gibson GJ, Kelly PJ, Harris AL (1993) The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival. *Br J Cancer* 68: 162-165.
89. Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, et al. (1984) Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res* 44: 753-760.
90. Hendler FJ, Ozanne BW (1984) Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest* 74: 647-651.
91. Neal DE, Marsh C, Bennett MK, Abel PD, Hall RR, et al. (1985) Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet* 1: 366-368.
92. Bast RC, Jr., Boyer CM, Jacobs I, Xu FJ, Wu S, et al. (1993) Cell growth regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer* 71: 1597-1601.
93. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232.
94. Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, Melhem MF, Tweardy DJ (1998) Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation

- of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem* 69: 55-62.
95. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD (2001) EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8: 83-96.
 96. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS (1997) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 8: 1197-1206.
 97. Modjtahedi H, Affleck K, Stubberfield C, Dean C (1998) EGFR blockade by tyrosine kinase inhibitor or monoclonal antibody inhibits growth, directs terminal differentiation and induces apoptosis in the human squamous cell carcinoma HN5. *Int J Oncol* 13: 335-342.
 98. Ciardiello F, Tortora G (2001) A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7: 2958-2970.
 99. Noonberg SB, Benz CC (2000) Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 59: 753-767.
 100. Denny WA (2002) Irreversible inhibitors of the erbB family of protein tyrosine kinases. *Pharmacol Ther* 93: 253-261.
 101. Arteaga CL (2003) ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 284: 122-130.
 102. Van Cutsem E, Verslype C, Beale P, Clarke S, Bugat R, et al. (2008) A phase Ib dose-escalation study of erlotinib, capecitabine and oxaliplatin in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 19: 332-339.
 103. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtness B, et al. (2000) Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 18: 904-914.
 104. Harding J, Burtness B (2005) Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)* 41: 107-127.
 105. Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato JD, et al. (1984) Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 259: 7755-7760.
 106. Sato JD, Kawamoto T, Le AD, Mendelsohn J, Polikoff J, et al. (1983) Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1: 511-529.
 107. Masui H, Kawamoto T, Sato JD, Wolf B, Sato G, et al. (1984) Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 44: 1002-1007.
 108. Divgi CR, Welt S, Kris M, Real FX, Yeh SD, et al. (1991) Phase I and imaging trial of indium 111-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 83: 97-104.
 109. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1: 1311-1318.
 110. Fan Z, Lu Y, Wu X, Mendelsohn J (1994) Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 269: 27595-27602.
 111. Waksal HW (1999) Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18: 427-436.

112. Zhu H, Cao X, Ali-Osman F, Keir S, Lo HW (2010) EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocation of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. *Cancer Lett* 294: 101-110.
113. Adams GP, Weiner LM (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23: 1147-1157.
114. Imai K, Takaoka A (2006) Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 714-727.
115. Levy EM, Sycz G, Arriaga JM, Barrio MM, von Euw EM, et al. (2009) Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. *Innate Immun* 15: 91-100.
116. Mendelsohn J (1997) Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 3: 2703-2707.
117. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, et al. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337-345.
118. Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, et al. (2004) Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial. *J Clin Oncol* 22: 2610-2616.
119. Raben D, Bianco C, Helfrich B, Weng E, Ciardiello F, et al. (2002) Interference with EGFR signaling: paradigm for improving radiation response in cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2: 461-471.
120. Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, Meredith RF, Bonner JA, et al. (2001) Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 19: 3234-3243.
121. Matar P, Rojo F, Cassia R, Moreno-Bueno G, Di Cosimo S, et al. (2004) Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res* 10: 6487-6501.
122. Hasselbalch B, Lassen U, Hansen S, Holmberg M, Sorensen M, et al. (2010) Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial. *Neuro Oncol* 12: 508-516.
123. Peeters M, Price T, Van Laethem JL (2009) Anti-epidermal growth factor receptor monotherapy in the treatment of metastatic colorectal cancer: where are we today? *Oncologist* 14: 29-39.
124. Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, et al. (2002) Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 8: 2286-2291.
125. Rosell R, Taron M, Barnadas A, Scagliotti G, Sarries C, et al. (2003) Nucleotide excision repair pathways involved in Cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Cancer Control* 10: 297-305.
126. Michor F, Nowak MA, Iwasa Y (2006) Evolution of resistance to cancer therapy. *Curr Pharm Des* 12: 261-271.
127. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, et al. (2006) DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 355: 983-991.
128. Barre B, Vigneron A, Perkins N, Roninson IB, Gamelin E, et al. (2007) The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. *Trends Mol Med* 13: 4-11.
129. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, et al. (2007) 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: 3230-3237.
130. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, et al. (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359: 1757-1765.
131. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, et al. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626-1634.
132. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A (2009) Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 35: 262-271.
133. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, et al. (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360: 1408-1417.
134. de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (1998) Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops. *J Pathol* 184: 44-52.
135. Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg D, et al. (1995) Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1: 19-31.
136. Jutten B, Dubois L, Li Y, Aerts H, Wouters BG, et al. (2009) Binding of cetuximab to the EGFRvIII deletion mutant and its biological consequences in malignant glioma cells. *Radiother Oncol* 92: 393-398.
137. Herbst RS, Arquette M, Shin DM, Dicke K, Vokes EE, et al. (2005) Phase II multicenter study of the epidermal growth factor receptor antibody cetuximab and cisplatin for recurrent and refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 23: 5578-5587.
138. Boerner JL (2009) Role of Src family kinases in acquired resistance to EGFR therapies in cancer. *Cancer Biol Ther* 8: 704-706.
139. Pruss RM, Herschman HR (1977) Variants of 3T3 cells lacking mitogenic response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3918-3921.
140. Batra SK, Castellino-Prabhu S, Wikstrand CJ, Zhu X, Humphrey PA, et al. (1995) Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 6: 1251-1259.
141. Haigler H, Ash JF, Singer SJ, Cohen S (1978) Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 3317-3321.
142. Han Y, Caday CG, Nanda A, Cavenee WK, Huang HJ (1996) Tyrphostin AG 1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res* 56: 3859-3861.
143. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
144. Kampmeier F, Ribbert M, Nachreiner T, Dembski S, Beaufils F, et al. (2009) Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-O-alkylguanine DNA alkyltransferase. *Bioconjug Chem* 20: 1010-1015.
145. Kampmeier F, Niesen J, Koers A, Ribbert M, Brecht A, et al. (2010) Rapid optical imaging of EGF receptor expression with a single-chain antibody SNAP-tag fusion protein. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37: 1926-1934.

146. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R (2007) The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 22: 1304-1309.
147. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
148. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
149. Pedersen MW, Pedersen N, Ottesen LH, Poulsen HS (2005) Differential response to gefitinib of cells expressing normal EGFR and the mutant EGFRvIII. *Br J Cancer* 93: 915-923.
150. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J (2004) Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305: 1163-1167.
151. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267: 5421-5426.
152. Witzel II, Koh LF, Perkins ND (2010) Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochem Soc Trans* 38: 217-222.
153. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, et al. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608.
154. Sevilla L, Zaldumbide A, Pognonec P, Boulukos KE (2001) Transcriptional regulation of the bcl-x gene encoding the anti-apoptotic Bcl-xL protein by Ets, Rel/NFkappaB, STAT and AP1 transcription factor families. *Histol Histopathol* 16: 595-601.
155. Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T (2006) Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol* 13: 1235-1242.
156. Yu Y, Zeng H, Vijay-Kumar M, Neish AS, Merlin D, et al. (2004) STAT signaling underlies difference between flagellin-induced and tumor necrosis factor-alpha-induced epithelial gene expression. *J Biol Chem* 279: 35210-35218.
157. Bromberg J (2002) Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109: 1139-1142.
158. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7727-7731.
159. Roos WP, Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12: 440-450.
160. Kastan MB, Lim DS (2000) The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 179-186.
161. Shechter D, Costanzo V, Gautier J (2004) Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 3: 901-908.
162. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, et al. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10389-10394.
163. Melchionna R, Chen XB, Blasina A, McGowan CH (2000) Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol* 2: 762-765.
164. Ahn JY, Schwarz JK, Piwnica-Worms H, Canman CE (2000) Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res* 60: 5934-5936.
165. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-334.
166. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, et al. (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13: 152-157.

167. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868.
168. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276: 42462-42467.
169. Katsumi S, Kobayashi N, Imoto K, Nakagawa A, Yamashina Y, et al. (2001) In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 117: 1156-1161.
170. Mone MJ, Volker M, Nikaido O, Mullenders LH, van Zeeland AA, et al. (2001) Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep* 2: 1013-1017.
171. Goudelock DM, Jiang K, Pereira E, Russell B, Sanchez Y (2003) Regulatory interactions between the checkpoint kinase Chk1 and the proteins of the DNA-dependent protein kinase complex. *J Biol Chem* 278: 29940-29947.
172. Seo YR, Fishel ML, Amundson S, Kelley MR, Smith ML (2002) Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene* 21: 731-737.
173. Whitby MC (2004) Junctions on the road to cancer. *Nat Struct Mol Biol* 11: 693-695.
174. Osman F, Whitby MC (2007) Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA Repair (Amst)* 6: 1004-1017.
175. Arora S, Yang JM, Hait WN (2005) Identification of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of the stability of eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Cancer Res* 65: 3806-3810.
176. Lord CJ, Ashworth A (2012) The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481: 287-294.
177. Fukai J, Nishio K, Itakura T, Koizumi F (2008) Antitumor activity of cetuximab against malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III. *Cancer Sci* 99: 2062-2069.
178. Patel D, Lahiji A, Patel S, Franklin M, Jimenez X, et al. (2007) Monoclonal antibody cetuximab binds to and down-regulates constitutively activated epidermal growth factor receptor vIII on the cell surface. *Anticancer Res* 27: 3355-3366.
179. Sorkin A (2001) Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling. *Biochem Soc Trans* 29: 480-484.
180. Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274: 2086-2089.
181. Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, et al. (2007) Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 120: 781-787.
182. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, et al. (2007) Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 13: 1552-1561.
183. Mendelsohn J, Baselga J (2003) Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 21: 2787-2799.
184. Abu-Amero KK, Bosley TM (2005) Detection of mitochondrial respiratory dysfunction in circulating lymphocytes using resazurin. *Arch Pathol Lab Med* 129: 1295-1298.
185. Zhang HX, Du GH, Zhang JT (2004) Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 25: 385-389.
186. Boerner JL, Demory ML, Silva C, Parsons SJ (2004) Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. *Mol Cell Biol* 24: 7059-7071.

187. Yao Y, Wang G, Li Z, Yan B, Guo Y, et al. (2010) Mitochondrially localized EGFR is independent of its endocytosis and associates with cell viability. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42: 763-770.
188. Yue X, Song W, Zhang W, Chen L, Xi Z, et al. (2008) Mitochondrially localized EGFR is subjected to autophagic regulation and implicated in cell survival. *Autophagy* 4: 641-649.
189. Wheeler DL, Iida M, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Dunn EF, et al. (2009) Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol Ther* 8: 696-703.
190. Wong R, Cunningham D (2008) Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies. *J Clin Oncol* 26: 5668-5670.
191. Jaramillo ML, Leon Z, Grothe S, Paul-Roc B, Abulrob A, et al. (2006) Effect of the anti-receptor ligand-blocking 225 monoclonal antibody on EGF receptor endocytosis and sorting. *Exp Cell Res* 312: 2778-2790.
192. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, et al. (1996) Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 74: 1253-1257.
193. Countaway JL, Nairn AC, Davis RJ (1992) Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 267: 1129-1140.
194. Lu Y, Liang K, Li X, Fan Z (2007) Responses of cancer cells with wild-type or tyrosine kinase domain-mutated epidermal growth factor receptor (EGFR) to EGFR-targeted therapy are linked to downregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Cancer* 6: 63.
195. Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, et al. (2003) Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res* 63: 2948-2956.
196. Colomiere M, Ward AC, Riley C, Trenerry MK, Cameron-Smith D, et al. (2009) Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 100: 134-144.
197. Dai Y, Grant S (2010) New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res* 16: 376-383.
198. Trimmer EE, Essigmann JM (1999) Cisplatin. *Essays Biochem* 34: 191-211.
199. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 220-228.
200. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, et al. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-1038.
201. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, et al. (1993) Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215-1225.
202. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, et al. (2002) Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30: 227-232.
203. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, et al. (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434: 907-913.
204. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444: 633-637.

205. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444: 638-642.
206. Abraham J, Lemmers B, Hande MP, Moynahan ME, Chahwan C, et al. (2003) Eme1 is involved in DNA damage processing and maintenance of genomic stability in mammalian cells. *EMBO J* 22: 6137-6147.
207. Barry SP, Townsend PA, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, et al. (2010) STAT3 modulates the DNA damage response pathway. *Int J Exp Pathol* 91: 506-514.
208. Dendouga N, Gao H, Moechars D, Janicot M, Vialard J, et al. (2005) Disruption of murine Mus81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 25: 7569-7579.
209. Hiyama T, Katsura M, Yoshihara T, Ishida M, Kinomura A, et al. (2006) Haploinsufficiency of the Mus81-Eme1 endonuclease activates the intra-S-phase and G2/M checkpoints and promotes rereplication in human cells. *Nucleic Acids Res* 34: 880-892.
210. Li VS, Choi D, Tang MS, Kohn H (1995) Structural requirements for mitomycin C DNA bonding. *Biochemistry* 34: 7120-7126.
211. Pamidi A, Cardoso R, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Poonepalli A, et al. (2007) Functional interplay of p53 and Mus81 in DNA damage responses and cancer. *Cancer Res* 67: 8527-8535.
212. Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, et al. (2008) Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res (Tokyo)* 49: 93-103.
213. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, et al. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354: 567-578.
214. Vermorken JB, Herbst RS, Leon X, Amellal N, Baselga J (2008) Overview of the efficacy of cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck in patients who previously failed platinum-based therapies. *Cancer* 112: 2710-2719.
215. Spiro H (2009) Cetuximab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 361: 95; author reply 96-97.
216. Kalyankrishna S, Grandis JR (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24: 2666-2672.
217. Bonner JA, Raisch KP, Trummell HQ, Robert F, Meredith RF, et al. (2000) Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 18: 47S-53S.
218. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6: 923-935.
219. Tomoda Y, Katsura M, Okajima M, Hosoya N, Kohno N, et al. (2009) Functional evidence for Eme1 as a marker of cisplatin resistance. *Int J Cancer* 124: 2997-3001.
220. Thacker J (1986) The nature of mutants induced by ionising radiation in cultured hamster cells. III. Molecular characterization of HPRT-deficient mutants induced by gamma-rays or alpha-particles showing that the majority have deletions of all or part of the hprt gene. *Mutat Res* 160: 267-275.
221. Cvrljevic AN, Akhavan D, Wu M, Martinello P, Furnari FB, et al. (2011) Activation of Src induces mitochondrial localisation of de2-7EGFR (EGFRvIII) in glioma cells: implications for glucose metabolism. *J Cell Sci* 124: 2938-2950.
222. Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL (2009) Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 28: 3801-3813.
223. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-1033.

224. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, et al. (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22: 1201-1208.
225. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, et al. (2005) Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 23: 1803-1810.
226. Dominguez-Kelly R, Martin Y, Koundrioukoff S, Tanenbaum ME, Smits VA, et al. (2011) Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol* 194: 567-579.
227. Heald R, McLoughlin M, McKeon F (1993) Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74: 463-474.
228. Parker LL, Piwnica-Worms H (1992) Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257: 1955-1957.
229. Martin Y, Dominguez-Kelly R, Freire R (2011) Novel insights into maintaining genomic integrity: Wee1 regulating Mus81/Eme1. *Cell Div* 6: 21.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Liganden-induzierte Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des EGFR
- Abb. 2: EGF-induzierte Signaltransduktionskaskaden des EGFR-Homodimers
- Abb. 3: Cetuximab hemmt liganden-induzierte Dimerisierung des EGFR
- Abb. 4: Signaltransduktionsfaktoren in NR6-, NR6M-, NR6W- und A431-Zellen nach EGF-Stimulation
- Abb. 5: Endozytose und Lokalisierung von EGFRvIII nach Inkubation mit Cetuximab in NR6M-Zellen
- Abb. 6: Darstellung des Phosphorylierungsstatus von EGFRvIII und seiner Effektoren während einer einstündigen Inkubation mit Cetuximab in An- und Abwesenheit von EGF
- Abb. 7: Darstellung des Phosphorylierungsgrades von EGFRvIII und seiner Effektoren während einer dreitägigen Inkubation mit Cetuximab in Serum-haltigem Medium
- Abb. 8: Subzelluläre Lokalisierung von EGFRvIII während einer zweitägigen Cetuximab-Inkubation
- Abb. 9: Cetuximab-vermitteltes Zellüberleben der NR6- und NR6M-Zellen
- Abb. 10: Cetuximab-vermittelte Kollokalisierung von Cetuximab-gebundenem EGFRvIII und Mitochondrien
- Abb. 11: Cetuximab-vermittelte Anreicherung des mitochondrialen Markers Tim23 und von EGFRvIII
- Abb. 12: Endozytose und Lokalisierung von EGFR nach Inkubation mit Cetuximab in NR6W-Zellen
- Abb. 13: Lokalisierung von EGFR in A431-Zellen nach Inkubation mit Cetuximab
- Abb. 14: Darstellung der Aktivität von EGFR und seiner Effektoren während einer einstündigen Inkubation mit Cetuximab in An- und Abwesenheit von EGF
- Abb. 15: Darstellung der Aktivität von EGFR und seiner Effektoren während einer dreitägigen Inkubation mit Cetuximab in Serum-haltigem Medium
- Abb. 16: Darstellung der Aktivität von EGFR und STAT3 während einer sechstägigen Inkubation mit Cetuximab in Serum-haltigem Medium

- Abb. 17: Darstellung der Aktivität von EGFR und seiner Effektoren während einer dreitägigen Inkubation mit Cetuximab in Serum-freiem Medium
- Abb. 18: Darstellung der Aktivität von EGFR und seiner Effektoren während einer dreitägigen Inkubation mit Erlotinib in Serum-haltigem Medium
- Abb. 19: Subzelluläre Lokalisierung von EGFR während einer zweitägigen Cetuximab-Inkubation
- Abb. 20: Cetuximab-vermitteltes Zellüberleben der NR6- und NR6W-Zellen
- Abb. 21: Metabolische Aktivität der A431-Zellen während einer Inkubation mit Cetuximab und Kontrollsubstanzen
- Abb. 22: Darstellung der Cetuximab-spezifischen Aktivierung von Proteinen, die Proliferation und Zellüberleben anzeigen
- Abb. 23: Einfluss von Cetuximab auf die Proteinexpression und DNA-Neusynthese
- Abb. 24: Darstellung der Cetuximab-spezifischen Aktivierung der DNA-Schädigung
- Abb. 25: Einfluss von Cetuximab auf das DNA-Reparatur-Protein Eme1
- Abb. 26: Auswirkungen von Cetuximab auf die Lokalisierung von Eme1
- Abb. 27: Cetuximab beeinflusst nicht die Expression von Eme1 sondern stabilisiert es auf Proteinebene
- Abb. 28: Darstellung des Cetuximab-spezifischen Zellüberlebens nach DNA-Schädigung
- Abb. 29: Darstellung der Eme1 mRNA- und Proteinmenge nach Eme1-Suppression
- Abb. 30: Einfluss von Cetuximab auf die DNA-Syntheserate in Eme1-supprimierten A431-Zellen
- Abb. 31: Darstellung der Cetuximab-spezifischen DNA-Reparatur
- Abb. 32: Darstellung des Cetuximab-induzierten Zellüberlebens nach Behandlung mit DNA-schädigendem UVC-Licht in Eme1-exprimierenden und Eme1-supprimierten A431-Zellen
- Abb. 33: Einfluss von Cetuximab auf Eme1 in Glioblastom-Primärkulturen
- Abb. 34: Modell der Wirkung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab auf die tumorspezifische Isoform EGFRvIII
- Abb. 35: Modell der Wirkung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab auf den EGF-Rezeptor im Zellkulturmodell

9 Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Joachim Weis danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Neuropathologie durchführen zu können. Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Weis dafür danken, dass ich die Freiheit bei der Ausgestaltung der Arbeit hatte und für die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft und Anregungen.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Frank Müller sehr dankbar.

Bei Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Bernhard Lüscher bedanke ich mich ganz herzlich für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge bezüglich biochemischer Fragestellungen.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Stefan Barth danke ich für die Bereitstellung des 425(scFv)SNAP-Alexa 647-Antikörpers.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Cornelissen danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung des posttranskriptionellen Gensilencing. Frau Barbara Lippok möchte ich ganz herzlich für die Anleitung am FACS-Gerät danken.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Kollegen, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Familie und meinem Freund Stefan möchte ich ganz besonders dafür danken, dass si immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich immer unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Name: Agnieszka Dreier
Geburtsdatum: 14.11.1978
Geburtsort: Bromberg (Polen)
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulausbildung

Bis 1999 Besuch des Gymnasiums St. Angela in Düren mit Abschluss
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium:

10/1999 – 09/2006 Studium der Biologie an der RWTH Aachen mit Abschluss
Diplom
Schwerpunkte: Genetik, Molekularbiologie, Humanbiologie
und Molekulare Pathologie
Diplomarbeit am Institut für Neuropathologie des
Universitätsklinikums der RWTH Aachen mit dem Thema
„Gestörte Signaltransduktion des NGF-Rezeptors TrkA bei
der Niemann-Pick Typ C-Erkrankung“ unter Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. J. Weis

Seit 10/2006 Promotion am Institut für Neuropathologie des
Universitätsklinikums der RWTH Aachen mit dem Thema
„Charakterisierung der Auswirkungen von Cetuximab auf
EGFR und EGFRvIII im Zellkulturmodell“ unter der Leitung
von Univ.-Prof. Dr. med. J. Weis
Voraussichtlicher Abschluss: Dr. rer.nat.

11 Veröffentlichungen

T. Moises, **A. Dreier**, S. Flohr, M. Esser, E. Brauers, K. Resiss, D. Merken, J. Weis, A. Krüttgen. (2007). "Tracking TrkA's trafficking: NGF receptor trafficking controls NGF receptor signaling." *Mol. Neurobiol.* 35(2): 151-159

T. Führmann, K. Montzka, L. Hillen, D. Hodde, **A. Dreier**, A. Bozkurt, M. Wöltje, G. Brook. (2010). "Axon growth-promotin properties of human bone marrow mesenchymal stromal cells." *Neurosci. Lett.* 474(1):37-41.

E. Brauers, **A. Dreier**, A. Roos, B. Wormland, J. Weis, A. Krüttgen. (2010). "Differential effects of myopathy-associated caveolin-3 mutants on growth factor signaling." *Am. J. Pathol.* 177(1):261-270.

A. Dreier, S. Barth, A. Goswami, J. Weis. (2012). "Cetuximab induces mitochondrial translocation of EGFRvIII, but not EGFR: involvement of mitochondria in tumor drug resistance?" *Tumor Biol.* 33(1):85-94.

Manuskripte in Vorbereitung

A. Dreier, B. Lüscher, A. Goswami, C. Cornelissen, S. Weinandy, J. Weis. „Novel mechanism for Cetuximab resistance: Survival of Cetuximab treated cells through Eme-1 mediated DNA-repair.“