

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

**EGFR-Inhibition bei simultaner Strahlentherapie in Abhängigkeit der
EGFR VIII-Variante bei HNSCC**

Lena Kerstin Ingeborg Gebel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv. – Doz. Dr. Anja C. Pickhard
2. Prof. Dr. Stephanie E. Combs

Die Dissertation wurde am 31.08.2016 an der Technischen Universität eingereicht
und durch die Fakultät der Medizin am 14.06.2017 angenommen

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Einleitung	15
2.1	Problemstellung	15
2.2	Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches	17
2.2.1	Epidemiologie	17
2.2.2	Klassifikation	18
2.2.3	Ätiologie und Risikofaktoren	27
2.2.4	Pathologie	28
2.2.5	Molekularpathologie	29
2.2.6	Prognosefaktoren	30
2.2.7	Therapiestandards	32
2.3	Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	34
2.3.1	EGF-Rezeptor und seine Rezeptorfamilie	34
2.3.2	Mechanismus der EGFR-Aktivierung	36
2.3.3	Liganden-vermittelte EGFR-Signaltransduktion	37
2.3.4	Veränderte Rezeptoraktivität	39
2.4	EGFR Variante III (EGFR vIII)	39
2.4.1	Grundlagen der EGFR vIII-Genvariante	39
2.4.2	Liganden-unabhängige Dimerisierung und Rezeptoraktivität des EGFR vIII	41
2.4.3	EGFR vIII-vermittelte Signaltransduktion	42
2.5	EGFR und EGFR vIII in Tumoren	42
2.6	EGFR- und EGFR vIII-basierte Therapieansätze	43
2.6.1	Monoklonaler Antikörper Cetuximab (Erbix [®])	44
2.6.2	Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)	44
2.7	Zielsetzung	45
3	Material	46
3.1	Biologische Materialien	46
3.1.1	HNSCC Zelllinien	46
3.1.2	EGFR vIII-transgene Zelllinien	46
3.1.3	EGFR vIII-Plasmid Vektor	47
3.2	Kulturmedien und Zusätze	47
3.3	Antikörper	47

3.4 Inhibitoren	48
3.5 Plasmid	49
3.6 Primer	49
3.7 Transfektion	50
3.8 Kits	51
3.9 Reagenzien	51
3.10 Verbrauchsmaterialien	56
3.11 Geräte.....	57
3.12 Computerprogramme	58
4 Methoden	60
4.1 Zellbiologische Methoden	60
4.1.1 Kultivierung einer Zelllinie	60
4.1.2 Auftauen einer Zelllinie	60
4.1.3 Einfrieren einer Zelllinie	60
4.1.4 Mediumwechsel	61
4.1.5 Splitten einer Zelllinie.....	61
4.1.6 Bestimmung der Zellzahl	62
4.2 Molekularbiologische Methoden	62
4.2.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels qRT-PCR	62
4.2.2 RNA-Isolierung aus humanen Zelllinien.....	63
4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	63
4.2.4 cDNA-Synthese	64
4.2.5 Quantitative Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	65
4.2.6 Expressionsanalysen auf Proteinebene.....	66
4.2.6.1 Proteinisolierung	66
4.2.6.2 Bradford-Assay	67
4.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	68
4.2.6.4 Westernblot: Semidry-Blot System	70
4.2.6.5 Immundetektion	71
4.2.7 Bestrahlung.....	72
4.2.8 Proliferations- und Überlebensanalysen	73
4.2.8.1 Crystal-Violett ELISA Proliferations-Assay	73
4.2.8.2 Colony-Formation-Assay	73
4.2.8.3 Scratch-Migrations-Assay.....	74
4.2.9 Statistik	76

5 Ergebnisse	77
5.1 Nachweis der Transfektionseffizienz mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion	77
5.2 Crystal-Violett ELISA Proliferations-Assay	79
5.2.1 Proliferationsverhalten der Zelllinien: Vergleich wt versus vIII	79
5.2.2 Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation und das klonogene Überleben der EGFR wt-Zelllinien	81
5.2.3 Einfluss der Blockade des EGFR wt auf die Proliferation der Zelllinien.....	83
5.2.3.1 Einfluss von AG1478 auf die Proliferation der Zelllinien.....	84
5.2.3.2 Einfluss von Gefitinib auf die Proliferation der Zelllinien.....	85
5.2.3.3 Einfluss von Cetuximab auf die Proliferation der Zelllinien.....	86
5.2.3.4 Einfluss der Kombinationsbehandlungen auf die Proliferation der Zelllinien.....	87
5.3 Colony-Formation-Assay	94
5.4 Scratch-Migrations-Assay	100
5.5 Biochemische Effekte: Western Blot Analysen	102
6 Diskussion	107
6.1 Einfluss des EGF-Rezeptors und der vIII-Variante auf die Tumorbiologie bei HNSCC und deren aktuellen Therapiestandards	107
6.2 Material- und Methodendiskussion	108
6.3 Kritische Stimmen zur Existenz des EGFR vIII in verschiedenen Tumorgeweben und HNSCC	112
6.4 <i>In vitro</i> Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der EGFR wt und EGFR vIII Zelllinien	114
6.5 <i>In vitro</i> Charakterisierung der Wirkungseffizienz der Inhibition auf das Überleben von EGFR und EGFR vIII exprimierenden Zellen	115
6.6 <i>In vitro</i> Charakterisierung der Wirkungseffizienz der Bestrahlung auf das Überleben von EGFR und EGFR vIII exprimierenden Zelllinien	119
6.7 <i>In vitro</i> Charakterisierung der Wirkungseffizienz der Kombinationsbehandlungen auf das Migrationsverhalten von EGFR und EGFR vIII	121

6.8 Kritische Beurteilung der EGFR-Inhibition in Abhängigkeit des EGFR vIII und simultaner Strahlentherapie.....	126
7 Ausblick	128
8 Zusammenfassung	129
9 Anhang	130
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	130
9.2 Tabellenverzeichnis	132
9.3 Literaturverzeichnis	135
10 Danksagung.....	143

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
3q, 7p, 7q, 8p, 9p, 10q, 11q 14p, 18q	kurzer (p)/ langer (q) Chromosomenarm mit Chromosomennummer
5-FU	5-Fluoruracil (Chemotherapeutikum)
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AKT	Kinase (Proteinkinase B)
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C-Lobe	Carboxyl-Ende des Proteins
c-myc	Transskriptionsfaktor
C(t)	cycle threshold
C1, C2	Cysteinreiche Domänen (Proteinsubdomänen des EGFR)
CA	Kalifornien
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation (Oberflächenproteine)
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
Chr.	Chromosom

cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ctrl	Kontrolle
CTx	Chemotherapie
DAG	Diacylglycerine
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphat-buffered Saline
DPEC	Diethylpyrocarbonat
Dr.	Doktor
DSMO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ErbB	Familie von Rezeptor Tyrosin Kinasen (z. B. HER2-Neu (ErbB2), HER4 (ErbB4))
ERK	Extracellular signal regulated kinases (MAPK)

et al.	et alii
EZD	Extrazellulärdomäne
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FHIT	histidine triad protein
G418	Geneticin
GBM	Glioblastom
GDP	Guanosindiphosphat-Glucose
ggf.	Gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat-Glucose
Gy	Gray
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches)
HPV	humanes Papillomavirus
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration

inf.	inferior
int.	interior
IZD	Intrazellulärdomäne
JAK	Janus-Kinase
kDA	Kilo-Dalton
L1, L2	Ligandenbindedomänen 1 und 2 (Proteinsubdomänen des EGFR)
M	Molar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
M.	Musculus
MA	Massachusetts
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase (ERK)
MAP2K	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase (MEK)
MAP3K	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase (Raf)
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MO	Missouri
mtor	mammilian target of rapamycin

N-Lobe	Amino-Terminus des Proteins
N.	Nervus
NC	North Carolina
ND	Neck dissection
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer- of actived B-cells (Transskriptionsfaktor)
NJ	New Jersey
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
p	phosphoryliert
p.a.	pro analysi
p14 ^{ARF}	alternate reading frame protein
p16 ^{ink4}	Protein 16 (Tumorsuppressorgen)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3, PI3K	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphat

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Proc.	Processus
Prof.	Professor
PTB	phosphotyrosine binding
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Residualzustand des Tumors nach Therapie
Raf	rat fibrosarcoma Protein
Ras	rat sarcoma Protein
RASSF1a	Ras association domain family 1 isoform A
Rb	Retinoblastom
RCTx	Radiochemotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RTx	Bestrahlungstherapie
s	Sekunde
s.	Siehe

s.o.	siehe oben
Ser	Serin (Aminosäure)
SH2-Domäne	Src-homolog 2 Domäne
Sos	Son of Sevenless
STATs	Transducers and Activators of Transcription
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TGF	transforming growth factor
Thr	Threonin (Aminosäure)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNM	Tumor-Klassifikation nach Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (L) und Metastasen (M)
TP53	Tumor-Protein 53, Tumorsuppressorgen
TTBS	Tris-Tween Buffered Saline
TX	Texas
Tyr	Tyrosin, Aminosäure
U	Units
UICC	Union internationale contre le cancer
vgl.	vergleiche
vs.	versus

WA	Washington
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar

2 Einleitung

2.1 Problemstellung

Jedes Jahr werden in Deutschland 500.000 neue Karzinome der Kopf-Hals-Region diagnostiziert. Das Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes stellt hierbei die häufigste Entität dar (Pickhard, Piontek et al., 2014; Bose, Brockton et al., 2013). Die meisten dieser neu diagnostizierten Kopf-Hals-Malignome sind bereits lokal fortgeschritten und zeigen in der Regel eine ungünstige Prognose (Schuler, Winter et al., 2009). Bei mehr als 50% der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren kann keine vollständige Heilung erreicht werden. In weltweiten Statistiken der Häufigkeitsverteilung von Krebsarten rückte das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches von Platz acht 2010 auf Platz sechs im Jahr 2013 vor (Bose, Brockton et al., 2013; Goerner, Seiwert et al., 2010).

Sowohl die aufgeführten klinischen Ergebnisse als auch die toxischen Nebenwirkungsprofile der systemischen Chemotherapie verdeutlichen die Dringlichkeit der Identifikation neuer Biomarker für eine effektivere Behandlung. Dabei zeichnet sich die Blockade der auf dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) basierenden Signalwege und seiner Variante III als vielversprechende Behandlungsstrategie in der molekularen Tumorthherapie ab (Goerner, Seiwert et al., 2010).

Der EGFR zeigt sich als epidermaler Wachstumsrezeptor in Zellen verantwortlich für die Aufrechterhaltung normaler, zellulärer Funktionen und für das Zellüberleben. In vielen humanen Tumorentitäten findet sich eine funktionelle Dysregulation des EGF-Rezeptors, die auf einer Überexpression dieses Wachstumsrezeptors basiert. Zusätzlich findet man in Tumoren Isoformen des EGFR, so zum Beispiel die häufigste Extrazellulärmutation EGFR vIII. Diese tumorspezifische Variante ist bisher ausschließlich in Tumorgewebe nachgewiesen worden (Pedersen, Meltorn et al., 2001). Hohe Expressionsraten des EGF-Rezeptors oder das Vorkommen des konstitutiv-aktivierten EGFR vIII korrelieren eindeutig mit einer schlechten Prognose, die sich in reduzierter Überlebenszeit, erhöhtem Metastasierungs- und Rezidivrisiko

und schlechtem Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie manifestiert (Chung, Zhang et al., 2011; Tang, Gong et al., 2000).

Die hohe Relevanz des EGFR in HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) spiegelt sich vor allem in den folgenden klinischen Zahlen wider: Der EGFR ist in über 90% aller HNSCC-Fälle überexprimiert und die konstitutiv aktivierte Deletionsmutante EGFR vIII zeigt sich bereits in 42% aller HNSCC Fälle (Sok, Coppelli et al., 2006).

Mehrere Studien deuten darüber hinaus auf diverse Resistenzmechanismen des EGFR gegen Targets der aktuellen Standardtherapie hin, wie zum Beispiel gegen den monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbix[®]). Diese Resistenzmechanismen stehen vor allem in Zusammenhang mit dem Auftreten seiner Deletionsmutation EGFR vIII (Markovic and Chung, 2012). Cetuximab ist einer der ersten und einzigen Anti-EGFR-Therapeutika mit nachgewiesenen Überlebensvorteilen für Patienten im rezidivierenden oder metastasierten Stadium. Bei Auftreten von Resistenzmechanismen ist dessen Wirksamkeit gegenüber dem EGFR stark beeinträchtigt und gegenüber dem EGFR vIII fast ausgeschlossen.

Eine mögliche Alternative gegen den EGFR und EGFR vIII stellen Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) dar, welche die intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität des EGFR hemmen. In der vorliegenden Arbeit verwendeten Tyrosinkinaseinhibitoren sind zum einen AG1478 und zum anderen Gefitinib (Iressa[®]). Die TKI bieten damit die Möglichkeit sowohl den Wildtyp-EGFR als auch EGFR vIII zu inhibieren. Außerdem haben diese molekularen Targets den großen Vorteil der oralen Verfügbarkeit, im Gegensatz zu Cetuximab und seinen Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der intravenösen Verabreichung.

In dieser Arbeit wurden aufgrund genannter Problemstellung alternative Therapiemöglichkeiten im Vergleich zur aktuellen Standardtherapie des EGFR und EGFR vIII *in vitro* näher untersucht.

2.2 Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches

Die Malignome des Kopf-Hals-Bereiches umfassen die Geschwülste des Gesichtsschädels zusammen mit den oberen Speise- und Atemwegen, den Speicheldrüsen, der Rhino- und Otobasis sowie der Haut im Kopf-Hals-Bereich. Im alltäglichen Sprachgebrauch sind mit Kopf-Hals-Tumoren („head and neck cancer“) meist die Plattenepithelzellen des oberen Aerodigestivtrakts, also des Mund- und Rachenraums, der Nase und der Nasennebenhöhlen sowie des Kehlkopfes gemeint. Maligne Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes stellen überwiegend Plattenepithelkarzinome dar und machen rund 90% in diesem Bereich aus. Dem Plattenepithelkarzinom als häufigste Malignomform wird in der vorliegenden Arbeit die größte Aufmerksamkeit gewidmet (Beck-Mannagetta, Burian et al., 2011).

2.2.1 Epidemiologie

Im Jahr 2002 lag die Zahl der bösartigen Neuerkrankungen in Deutschland bei ca. 407.900. Dabei stellen Malignome des Kopf-Hals-Bereiches mit einem relativen Anteil von 4,8% aller Krebsleiden die vierthäufigste Tumorerkrankung hinter dem Prostata-, dem Lungen- und dem kolorektalen Karzinom, gemeinsam mit dem Blasenkarzinom, dar (Reiter, Harréus et al., 2009). Weltweit werden die Kopf-Hals-Malignome im Jahr 2013 an sechster Stelle aller Tumorerkrankungen eingeordnet (Bose, Brockton et al., 2013).

Die Malignome des Kopf-Hals-Bereiches verteilen sich in der Bevölkerung folgendermaßen: Die altersstandardisierte Inzidenz bei der männlichen Bevölkerung liegt bei 25,1/100.000. Damit liegt die absolute Zahl an Neuerkrankungen bei Männern bei 7,3%, im Gegensatz zu 2,1% bei der weiblichen Bevölkerungsgruppe. Diese Zahl entspricht damit einer altersstandardisierten Inzidenz der Frauen von 5,2/100.000. Männer sind also weitaus häufiger betroffen als Frauen. Diese Geschlechterverteilung spiegelt sich auch bei dem Vergleich der Mortalitätsraten wider. Bei einer männlichen Bevölkerungszahl von 15.651 lag die Krebsmortalität der Kopf-Hals-Tumoren bei 5.250 Fällen. Bei den weiblichen Patienten wurde eine

Mortalität von 1.421 Fällen nachgewiesen, bei einer absoluten Fallzahl von 4.058. Vergleichbar bei beiden Geschlechtern jedoch ist das mittlere Erkrankungsalter, das bei ca. 60 Jahren liegt.

Betrachtet man die Verteilung der einzelnen Tumorentitäten im Kopf-Hals-Bereich für die Bundesrepublik Deutschland, fällt auf, dass bei Männern mit einem prozentualen Anteil von 26,2% der Larynx die höchste Inzidenzrate darstellt, gefolgt von Hypopharynx mit einem Anteil von 17,7%. Bei den Frauen übernimmt die Führung das Zungenkarzinom mit 19,3% und 19,2% betreffen den Oropharynx.

Der Anteil der Patienten mit primärer Fernmetastasierung ist im Vergleich zu anderen soliden Tumoren relativ niedrig und liegt bei durchschnittlich 2,2% (Reiter, Harréus et al., 2009).

2.2.2 Klassifikation

Alle Tumorentitäten werden von der International Unit Against Cancer (UICC) nach der aktuellen TNM-Klassifikation in Stadien eingeteilt. Zunächst sollen für das Verständnis organübergreifende Prinzipien genauer erläutert werden. Im Anschluss werden die unterschiedlichen TNM-Klassifikationen für die einzelnen Organe des oberen Aerodigestivtraktes tabellarisch angegeben.

Das TNM-System dient zur Beschreibung der anatomischen Ausbreitung der Erkrankung und beruht auf den folgenden drei Komponenten: Die sogenannte T-Kategorie beschreibt die Ausdehnung und das Verhalten des Primärtumors. Die N-Klassifikation meint das Fehlen oder Vorhandensein sowie die Ausbreitung von regionären Lymphknotenmetastasen, das heißt die direkte Ausbreitung des Primärtumors in Lymphknoten. Die dritte Komponente, die M-Kategorie, gibt an, ob Fernmetastasen fehlen oder vorhanden sind, also ob Metastasen in anderen Lymphknoten als den regionären Lymphknoten vorliegen oder ob andere Organe mitbetroffen sind. Fügt man zu den einzelnen Komponenten Ziffern hinzu (T0-T4, N0-N3, M0-M1), wird die Ausbreitung der malignen Erkrankung genauer angezeigt.

Das Präfix „p“ bedeutet, dass die Klassifikation durch eine histopathologische Untersuchung des entsprechenden Gewebes gesichert ist. Der Zusatz „c“ steht für eine Klassifikation nach klinischer Beurteilung.

Weitere Kennzeichnungen erfolgen durch die vorangestellten Buchstaben m, y, r und a. Das Suffix „m“ findet Anwendung, um multiple Primärtumoren in einem anatomischen Bezirk anzuzeigen und wird in Klammern gesetzt. Das „y“-Symbol kennzeichnet die Kategorien, die während oder nach initialer multimodaler Therapie erfolgen. Das Präfix „r“ beschreibt Rezidivtumore, die nach krankheitsfreiem Intervall auftreten. Wenn ein Tumor bei einer Autopsie klassifiziert wird, wird der TNM-Formel das Präfix „a“ vorangestellt. Die folgenden Tabellen zeigen die klinische TNM-Klassifikation (Wittekind and Meyer, 2010).

pT-Primärtumor	
pTX	Primärtumor kann histologisch nicht beurteilt werden
pT0	Kein histologischer Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1-4	Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors bei histologischer Untersuchung

Tabelle 1: pT-Klassifikation der UICC (Wittekind und Meyer, 2010)

pN-Regionäre Lymphknoten

pNX	Regionäre Lymphknoten können histologisch nicht beurteilt werden
pN0	Histologisch keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3cm oder weniger in größter Ausdehnung
pN2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
pN2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
pN3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

Tabelle 2: pN-Klassifikation der UICC (Wittekind und Meyer, 2010)

pM-Fernmetastasen

pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen mikroskopisch bestätigt

Tabelle 3: pM-Klassifikation der UICC (Wittekind und Meyer, 2010)

Wird eine größere Spezifität mancher Hauptkategorien benötigt, muss weiter unterteilt werden (z. B. pT1a, pT1b oder pT2a, pT2b) (Wittekind and Meyer, 2010).

Eine weitere Information über den Primärtumor kann bei fast allen anatomischen Lokalisationen unter der Rubrik histopathologisches Grading festgehalten werden.

G-Histopathologisches Grading

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tabelle 4: Histopathologisches Grading der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)

Die bisher aufgeführten Klassifikationen berücksichtigen die anatomische Ausbreitung des Tumors. Die R-Klassifikation ergänzt diese Kategorien durch Erfassen des Tumorstatus nach stattgefundener Behandlung, also das Fehlen oder Vorhandensein des Residualtumors (Resttumor).

R-Residualtumor

RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Tabelle 5: R-Klassifikation der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)

Die T-Klassifikation für einzelne Tumore ist unterschiedlich. Die der Kopf-Hals-Tumore gelten ausschließlich für Karzinome des Lippenrots und für Karzinome der Mundhöhle, einschließlich jener der kleinen Speicheldrüsen. Stets ist eine histologische Diagnosesicherung unabdingbar (Wittekind and Meyer, 2010). Die Einteilungen für TX, T0 und Tis sind bereits bekannt (s. Tabelle 1). Die T-

Klassifikation ausgewählter Tumore aus dem Kopf-Hals-Bereich zeigen die folgenden Tabellen.

Lippe und Mundhöhle	
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	<p><i>Lippe:</i> Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, den N. alveolaris inferior in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase)</p> <p><i>Mundhöhle:</i> Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut</p>
T4b	<i>Lippe und Mundhöhle:</i> Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 6: T-Klassifikation der Lippe und Mundhöhle der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)

Oropharynx	
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausbreitung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer*
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 7: T-Klassifikation Oropharynx der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)

**Anmerkung: Schleimhautausbreitung zur laryngealen Oberfläche der Epiglottis von Primärtumoren der Zungenbasis und Vallecula gilt nicht als Invasion des Larynx*

Kopf-Hals-Tumore im Bereich des Larynx können in Bezirke unterteilt werden. Die anatomischen Bezirke des Larynx sind Supraglottis, Glottis und Subglottis. In dieser Reihenfolge werden die T-Klassifikationen der Bezirke des Larynx in der Tabelle 8 gezeigt. Die jeweiligen Bezirke können wiederum in Unterbezirke gegliedert werden.

Supraglottis

T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Unterbezirk der Supraglottis (z. B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis), ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

Glottis

T1	<p>Tumor auf Stimmlippe(n) begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit</p> <p>T1a Tumor auf eine Stimmlippe begrenzt</p> <p>T1b Tumorbefall beider Stimmlippen</p>
T2	<p>Tumor breitet sich auf Supraglottis und/der Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit</p>
T3	<p>Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)</p>
T4a	<p>Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), tiefe Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus</p>
T4b	<p>Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna</p>

Subglottis	
T1	Tumor auf die Subglottis begrenzt
T2	Tumor breitet sich auf eine oder beide Stimmlippen aus, diese mit normale oder eingeschränkter Beweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 8: T-Klassifikation des Larynx (Supraglottis, Glottis, Subglottis) der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)

Tabelle 9 listet die Stadiengruppierung aller Kopf-Hals-Tumore auf, ausgenommen die der Speicheldrüsen und der Schilddrüse.

Stadien	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVB	Jedes T	N3	M0
	T4b	Jedes N	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 9: Stadieneinteilung/TNM-Klassifikation der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)

2.2.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Genese der Malignome des Kopf-Hals-Bereiches und im Speziellen des oberen Aerodigestivtraktes ist multifaktoriell. Auslösende Faktoren sind insbesondere Nikotin und Alkohol, außerdem virale Infektionen, kanzerogene Chemikalien, UV- und radioaktive Strahlung, ein geschwächtes Immunsystem (z. B. HIV-Infektion), schlechte Mundhygiene und chronische Traumen (Gellrich, Gutwald et al., 2004). 80% aller HNSCC-Fälle können dabei einer erhöhten Exposition von Tabak zugeschrieben werden (Bose, Brockton et al., 2013). Vermutlich wird durch Alkoholkonsum die toxische Wirkung des Rauchens potenziert, in dem die plattenepithelialen Barrieren der Schleimhaut geschwächt werden. Durch das Rauchen werden vor allem orale und pharyngeale Karzinome verursacht. Somit sind die Tumoren der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx überwiegend exogen-toxisch bedingt. Das Risiko von Rauchern gegenüber Nicht-Rauchern ist um den Faktor 3-6, je nach Tabakkonsum, erhöht. Das Risiko von Rauchern mit einem Mundhöhlenkarzinom bei gleichzeitigem Alkoholkonsum ist gegenüber alleinigem Tabakkonsum nochmals um den Faktor 2,5 erhöht (Gellrich, Gutwald et al., 2004).

Hier sei angemerkt, dass moderater Alkoholkonsum (10-19 g) wenig bis gar keinen Effekt zeigte (Lewin, Norell et al., 1998). Für bestimmte Tumorlokalisationen, wie zum Beispiel innere Nase und Kehlkopf, sind auch berufliche inhalative Noxen als Induktoren denkbar (z. B. Metall- und Holzstäube, chrom- und nickelhaltige Lacke und Farben). Die Entstehung bestimmter Karzinome, wie das der Mundhöhle oder des Larynx, können auch viral bedingt sein. Humane Papillom Viren (HPV), besonders HPV-16, spielen hier wohl eine maßgebliche Rolle. Der Subtyp HPV-16 soll für mehr als 90% aller HPV-assoziierten HNSCC-Fälle verantwortlich sein. Im Allgemeinen ist das vermehrte Auftreten von HPV-induzierten oralen Plattenepithelkarzinomen bei Erwachsenen zwischen 40 und 55 Jahren zu bemerken. Tatsächlich ist dabei das männliche Geschlecht von HPV-assoziierten Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches häufiger betroffen als das weibliche. Diese Tatsache wird mit dem Sexualverhalten in Zusammenhang gebracht (Bose, Brockton et al., 2013). Darüber hinaus wird im Rahmen der viralen Genese das Epstein-Barr-Virus als Risikofaktor für Nasen-Rachen-Karzinome genannt (Gellrich, Gutwald et al., 2004).

2.2.4 Pathologie

Über 90% der Malignome im Kopf-Hals-Bereich sind Plattenepithelkarzinome (Beck-Mannagetta, Burian et al., 2011). Das Plattenepithelkarzinom per se ist ein maligner Tumor von plattenepitheliale Phänotyp und zählt damit zu den invasiv wachsenden Karzinomen. Es entsteht vornehmlich im Plattenepithel (Haut, Mund-, Ösophagusschleimhaut, Vagina) oder in Schleimhautepithelien mit der Potenz zu Plattenepithelmetaplasien (Uterus-, Zervix-, Bronchial-, Urothel- und Gallenblasenschleimhaut) (Böcker, Denk et al., 2008). Das plattenepithelial differenzierte Karzinom kommt zu 90% mit oder ohne Verhornung vor. Der verhornende Typ zeigt die Verhornung in Form von Einzelzellverhornungen und als konzentrische Hornperlen.

Das Ausmaß an Hornbildung sowie das Vorhandensein von Interzellularbrücken lassen auf den histologischen Malignitätsgrad schließen (Ihrler and Weiler, 2009).

Histopathologisch, prognostisch und damit auch therapeutisch sind von dem histologisch typischen Plattenepithel folgende Varianten zu unterscheiden: Eine prognostisch sehr günstige Variante des Plattenepithelkarzinoms ist das sehr seltene, hoch differenzierte verruköse Karzinom (Ackerman-Tumor). Es wächst langsam und metastasiert nicht. Mit einer weitaus schlechteren Prognose stellt sich das basaloide Plattenepithelkarzinom als eine weitere Variante dar. Es wächst rasch und aggressiv. Zu den weiteren seltenen Varianten zählen das spindelzellige und das adenosquamöse Karzinom. Das spindelzellige Karzinom zeigt eine ähnliche Prognose wie das histologisch typische Plattenepithelkarzinom. Das adenosquamöse Karzinom, eine aggressive, aber ebenfalls seltene Sonderform, stellt eine Mischung aus Plattenepithelkarzinom- und Adenokarzinomanteilen dar (Ihrler and Weiler, 2009).

Aus histologischer Sicht sind die Tumorzellen groß, polygonal oder spindelzellig mit Kernatypien und atypischen Mitosefiguren. Makroskopisch ist meist ein endophytisch wachsender, knotiger, oberflächlich ulzerierter Tumor festzustellen.

2.2.5 Molekularpathologie

In den letzten Jahren konnte sich ein Modell für die Initiation und Progression von Kolonkarzinomen etablieren, welches sich nun zu einem Paradigma für andere humane Tumoren entwickelt hat. Ähnlich wie das Kolonkarzinom geht das HNSCC aus prämaligen Vorläuferzellen hervor, wie einer Leukoplakie, Erythroplakie oder einer Dysplasie. Daraus entsteht durch überschießendes Wachstum von klonogenen Populationen, die mit kumulativen Genalterationen und phänotypischen Veränderungen assoziiert sind, eine maligne, invasive Tumorzelle. Diese Genalterationen resultieren in einer Inaktivierung von multiplen Tumorsuppressorgenen und der Aktivierung von Protoonkogenen, basierend auf der Veränderung der DNA durch Deletionen, Punktmutationen, Promotormethylierung

und Genamplifikation (wie zum Beispiel p16^{ink4A}, TP53 (Tumor-Protein 53), Cyclin D1, p14^{ARF}, fragile histidine triad protein (FHIT), Ras association domain family 1 isoform A (RASSF1a), dem epidermal growth factor receptor (EGFR) und Retinoblastom (Rb)). Anhand dieser Fakten wurde folgendes hypothetisches Modell für die Entstehung für HNSCC von Califano et al. entworfen und von Perez-Ordoñez modifiziert (Perez-Ordoñez, Beauchemin et al., 2006):

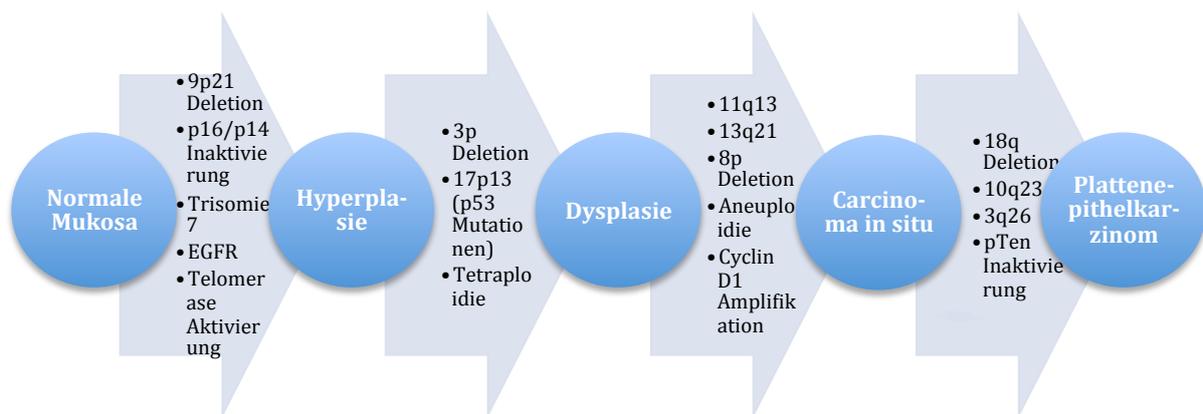


Abbildung 1: Hypothetisches Modell der Tumorentstehung von Kopf-Hals-Tumoren; modifiziert nach Perez-Ordoñez et al., 2006

2.2.6 Prognosefaktoren

Die Prognose der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Es spielen für die prognostische Einschätzung einer Tumorerkrankung sowohl klinische als auch patientenbezogene, histopathologische und inzwischen auch neuartige Faktoren eine entscheidende Rolle, wie beispielsweise der HPV-Status (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010).

In der Klinik sind seit den 1970er Jahren Tumorlokalisation, -größe, -volumen und -kategorie/-stadium entsprechend der TNM-Klassifikation und deren Zusammenfassung zum UICC-Stadium wesentliche etablierte Tumormarker, anhand derer auch die Therapiemodalitäten abgewogen werden. Beispielsweise beträgt die

mediane Überlebenszeit bei primärer Metastasierung deutlich weniger als ein Jahr (Röper and Hölzel, 2009).

Prognosefaktoren, die in Bezug auf den Patienten selbst entscheidend sind, sind zum einen das Alter und zum anderen das Geschlecht. So stellen ein hohes Alter und das männliche Geschlecht etablierte negative Prognosemarker dar. Wie bereits bei den Risikofaktoren erwähnt, muss der Tabakrauch als Risikoparameter schlechthin genannt werden und beeinflusst unter Strahlentherapie den Therapieerfolg nachteilig und damit das Überleben insgesamt. Außerdem wird das Risiko für das Auftreten von HNSCC unbestritten durch simultanen Tabak- und Alkoholkonsum potenziert. Zu den patientenbezogenen Faktoren zählt außerdem der Hämoglobinwert. Vor allem im Hinblick auf den Therapieerfolg der Strahlentherapie korreliert ein niedriger Hb-Wert mit einer verminderten lokalen Kontrolle und einem reduzierten Gesamtüberleben bei Patienten mit HNSCC nach Strahlentherapie (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010). Weiter konnte auch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Tumorhypoxie und signifikant ungünstigen Überlebensdaten gezeigt werden (Röper and Hölzel, 2009).

Die folgenden Parameter sind histopathologisch zu erheben: Aus einer Tumorbiopsie lässt sich das Grading abschätzen. Das Rezensionsmaterial kann demnach nach dessen Differenzierungsgrad (plattenepitheliale Differenzierung, Grad der zellulären Pleomorphie und Mitoseindex) und nach dessen Tumorinvasionsfront beurteilt werden. Weitere negative pathologische Prognosefaktoren sind der Nachweis eines Kapseldurchbruchs der Tumorzellen in der Lymphknotenmetastase und die maximale Tumordicke. So steigt das Risiko für eine Lymphknotenmetastasierung mit steigender Tiefenausdehnung. Eine prognostische Relevanz konnte ebenfalls bei Lymphangiosis carcinomatosa und Nerveninfiltration nachgewiesen werden. Ebenfalls negativer histopathologischer Prognosefaktor sind Resektionsgrenzen unter 5 mm („close margins“) oder eine R1-Resektion (Röper and Hölzel, 2009).

Zu den neueren Prognosefaktoren, deren Bedeutung noch unklar ist, zählt der EGFR. Dieser besitzt derzeit jedoch noch keine Relevanz in der klinischen Praxis. In

Phase-III-Studien konnte aber bereits unter Einsatz von EGFR-Inhibitoren zusätzlich zur Strahlentherapie eine Verbesserung des Überlebens gegenüber einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Außerdem ist bekannt, dass seine Überexpression in HNSCC unter anderem prometastatischen Charakter besitzt (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010).

2.2.7 Therapiestandards

Die Therapie von Kopf-Hals-Tumoren basiert im Wesentlichen auf drei Säulen, nämlich der chirurgischen Intervention, der Bestrahlung und der zytostatischen Chemotherapie. Die chirurgische Therapie von malignen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches hat dabei zwei Schwerpunkte: Zum einen das Ziel einer vollständigen Tumorsektion einschließlich vorhandener Lymphknotenmetastasen (R0-Resektion), zum anderen den rekonstruktiven Anspruch (Pouget-Schors, Zimmermann et al., 2009). Die Lymphknotenmetastasen werden in der Regel durch eine Neck dissection (ND) entfernt. Art und Umfang der ND sind hierbei abhängig von Stadium und Lage des Tumors sowie von dem Lymphknotenstatus. Ob die ND einseitig oder beidseitig durchgeführt wird, wird von der Lokalisation des Tumors (z. B. Überschreiten der Mittellinie) oder dem Risiko für eine kontralaterale Metastasierung (z. B. Zungengrundtumoren) abhängig gemacht.

Die Strahlenbehandlung erfolgt in erster Linie als perkutane Therapie mit Linearbeschleuniger. Im Bezug auf die Chemotherapie sind für die Monotherapie Cisplatin/Carboplatin, Methotrexat, Bleomycin, Ifosphamid und 5-Fluoruracil (5-FU) am besten untersucht. In der Kombinationstherapie sind Platinderivate, Taxane, Methotrexat, Mitomycin und 5-FU als wichtigste Kombinationspartner etabliert. Bei Plattenepithelkarzinomen gelten jedoch die Platinderivate als die wirksamsten Zytostatika (Gellrich, Gutwald et al., 2004). Zu den neueren Substanzen gehört unter anderem der monoklonale Antikörper Cetuximab, der ein spezifisches Target gegen den EGF-Rezeptor darstellt.

Vor Therapiebeginn sollten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches mit Hilfe der TNM-Klassifikation eingeteilt und schließlich nach Stadien gruppiert werden (s. Tabelle 9). An dieser Stadieneinteilung orientiert sich die Entscheidung, welche Therapie vorzunehmen ist. Demnach ist die Therapie abhängig von Tumorlokalisation und Tumorausbreitung.

Tumore mit seltenem Vorkommen, wie Plattenepithelkarzinome der Nasennebenhöhlen und des Nasopharynx, sind von den folgenden klinischen Empfehlungen ausgeschlossen: In frühen Stadien (I, II) bietet eine chirurgische Intervention oder eine Radiotherapie (externe Radiotherapie oder Brachytherapie) gleichermaßen lokoregionäre Kontrolle. Die Tumorsektion erfolgt dabei immer mit einem auf die Tumorart abgestimmten Resektionsrand, der bei Plattenepithelkarzinomen mit einem Zentimeter empfohlen wird (Schuler, Winter et al., 2009). Standardisierte Vorgehensweisen für lokal fortgeschrittene Tumore, die den Stadien III-IV entsprechen, sind die chirurgische Tumorsektion einschließlich rekonstruktiver Verfahren mit postoperativer Bestrahlung. Bei Patienten mit Hochrisikofaktoren, wie extrakapsuläre Ausbreitung und/oder R1-Resektion, stellt die postoperative Radiochemoradiotherapie mit einem Platinderivat die Therapie der Wahl dar. Ist eine operative Sanierung nicht möglich, so wird eine primäre kombinierte Radiochemotherapie präferiert. In diesem Zusammenhang gibt es bisher keinen Vergleich zwischen der Kombination Strahlentherapie und Cetuximab oder Cisplatin, weshalb hier die therapeutische Entscheidung schwer zu fällen ist. Bei nicht kurativer Zielsetzung für das Stadium IV C gelten palliative Therapiekonzepte. In ausgewählten Fällen mit Lokalrezidiv kann entweder eine Operation (wenn operabel) oder eine erneute Bestrahlung in Erwägung gezogen werden. In den meisten Fällen jedoch stellt sich die palliative Chemotherapie als Standardoption heraus. Für die betroffenen Patienten, die sich in gutem Allgemeinzustand befinden, gilt als Erstlinientherapie die Kombination aus Cetuximab und Cisplatin oder 5-FU und Carboplatin. Für Patienten, deren Toleranz für eine Polychemotherapie als

niedrig eingestuft wird, empfiehlt sich eine Monochemotherapie mit Methotrexat (Grégoire, Lefebvre et al., 2010).

Die Therapiekonzepte beruhen demzufolge auf einem interdisziplinären Zusammenspiel. Dessen Ziel sollte es sein, ein für jeden Patienten passendes, individuelles Therapieprotokoll zu entwickeln, das unter Ausnutzung aller diagnostischer, therapeutischer und supportiver Möglichkeiten und bei möglichst geringer Nebenwirkungsrate den Wunsch des Patienten und den bestmöglichen Erhalt der Lebensqualität berücksichtigt.

2.3 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

2.3.1 EGF-Rezeptor und seine Rezeptorfamilie

Der EGFR ist ein epithelialer Wachstumsrezeptor und ein typischer Vertreter der Rezeptortyrosinkinase. Auf dem Weg seiner Entdeckung wurde 1962 von Cohen und seinen Kollegen zunächst der Ligand des EGFR entdeckt, der epithel growth factor (EGF) (Gan, Kaye et al., 2009; Cohen, 1962). Nach der Identifizierung der Aminosäuresequenz des EGF und seiner spezifischen Bindungsstelle konnte 1978 der dazugehörige Rezeptor als 170 kDa Membran-Komponente nachgewiesen werden. Das EGFR-Gen besteht aus insgesamt 26 Exons und ist am kurzen Arm des Chromosoms 7 (p11-p13) lokalisiert (Gschwind, Fischer et al., 2004; Batra, Castellino-Prabhu et al., 1995).

Der EGFR ist ein Mitglied der ErbB (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog) -Familie, die wiederum als Mitglied der Transmembranrezeptortyrosin-Superfamilie der Subklasse I zugehört. Die ErbB-Familie setzt sich aus insgesamt vier Mitgliedern zusammen: ErbB1, auch genannt HER1 oder EGFR, ErbB2 (Neu, HER-2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) (Zhang, Stiegler et al., 2010). Der ErbB1-/EGF-Rezeptor zeigt sich als Einzelketten-Transmembran-Glykoprotein, das den charakteristischen Aufbau der humanen ErbB-Familie aufweist, bestehend aus drei funktionellen Teilen: Die Extrazellulärdomäne, die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische

Region.

Die Extrazellulärdomäne (EZD) besteht aus insgesamt vier Proteinsubdomänen: Zwei homologe Ligandenbindedomänen (L1 und L2) und zwei ebenfalls homologe cysteinreiche Domänen (C1 und C2) (Batra, Castelino-Prabhu et al., 1995; Pedersen, Meltorn et al., 2001). Diese sogenannten Subdomänen I, II, III und IV zeigen in ihrem Aufbau die folgende Reihenfolge: L1-C1-L2-C2 (s. Abb. 2). Die Ligandenbindung wird über die L1 und die L2 Domäne vermittelt, während die C-Domänen die Rezeptordimerisierung regulieren (Ferguson, Berger et al., 2003). Die Transmembrandomäne zeigt einen alpha-helikalen Aufbau. Sie verankert den Rezeptor in der Zellmembran und ist unter anderem an der Rezeptordimerisierung beteiligt.

Der Intrazellulärteil (IZD) besteht zu 50% aus der Tyrosinkinase, die wiederum Threonin-, Serin- und Tyrosinreste aufweist. Diese Aminosäurereste können im Laufe der Rezeptoraktivierung phosphoryliert werden und die Interaktion mit Effektormolekülen ermöglichen (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Die andere Hälfte der Intrazellulärdomäne setzt sich aus der Juxtamembrandomäne und der carboxyterminalen Region zusammen. Die Juxtamembrandomäne liegt zwischen der Zellmembran und der Tyrosinkinase und hat regulatorische Funktion hinsichtlich Rezeptor-Downregulierung und -sensibilisierung (Zhang, Stiegler et al., 2010; Pedersen, Meltorn et al., 2001)

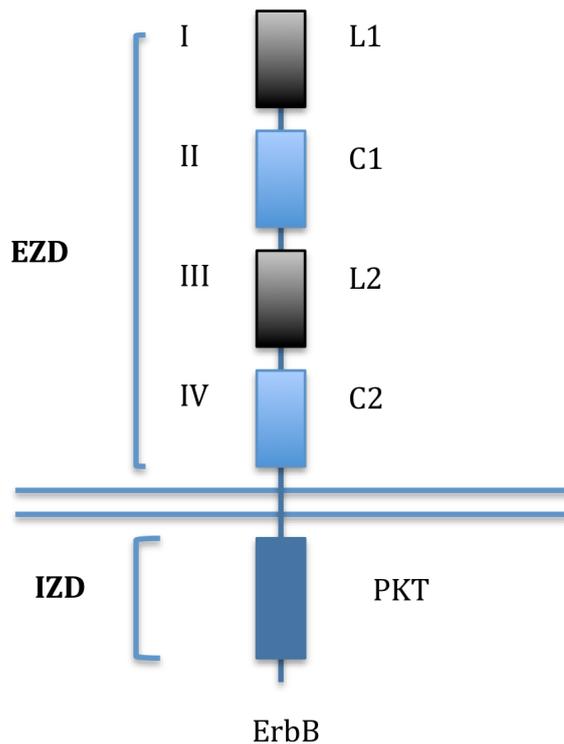


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des ErbB-Rezeptors; modifiziert nach Warren und Landgraf, 2006

2.3.2 Mechanismus der EGFR-Aktivierung

Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst passiert die Ligandenbindung überwiegend durch die L2-Domäne und unter geringer Beteiligung der L1-Domäne. Die Bindung eines passenden Liganden (epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor α , Amphiregulin, Epigen, Betacellulin, Heparin-binding EGF-like growth factor) führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors, an der die C1-Domäne maßgeblich beteiligt ist (Ogiso, Ishitani et al., 2002; Pedersen, Meltorn et al., 2001). Die Dimerisierung kann erfolgen, indem ein Ligand zwei Rezeptorbindungsstellen besitzt und gleichzeitig an zwei Rezeptormoleküle bindet, oder indem der Ligand als Dimer zwei Rezeptoren miteinander verbindet (Rassow, Hauer et al., 2008).

Bei der Dimerisierung zweier Tyrosinkinase-Rezeptoren können sich sowohl Hetero- als auch Homodimere innerhalb der ErbB-Familie ausbilden (Zhang, Stiegler et al., 2010). Infolge der Rezeptordimerisierung und der damit verbundenen

Konformationsänderung kommt es zur Ausbildung eines asymmetrischen Tyrosinkinasedimers. Hier interagiert der C-Lobe der einen Tyrosinkinase als Donor mit dem N-Lobe der anderen Tyrosindomäne (Akzeptor) (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Mit Hilfe dieser Interaktion zweier Tyrosinkinasen wird die Tyrosinkinase des Akzeptors durch Autophosphorylation allosterisch aktiviert (Zhang, Stiegler et al., 2010). Durch diese Autophosphorylation kann die Kinase ihrerseits wiederum Tyrosinreste der zytostolischen Domäne des Rezeptors phosphorylieren. Die neu gebildeten Phosphotyrosinreste dienen als sogenannte „Docking-sites“ für Signaltransduktionsmoleküle mit Src homology (SH2)- und phosphotyrosine binding (PTB)-Domänen. Über diese Domänen kann eine Plattform von Signalmolekülen über verschiedene Mechanismen aktiviert werden (Rassow, Hauer et al., 2008, Hunter, 2001). Abhängig von Ligand und gebundenem downstream-Molekül werden Signalkaskaden induziert, die für unterschiedliche zelluläre Prozesse verantwortlich sind.

2.3.3 Liganden-vermittelte EGFR-Signaltransduktion

Die Signaltransduktion beschreibt eine Zellkommunikation, bei der extrazelluläre Signale in das Zellinnere über unterschiedliche Signalwege weitergeleitet werden.

Die Signalkaskaden, die nach Aktivierung des EGFR induziert werden, vermitteln folgende Zelleigenschaften: Überleben, Proliferation, Angiogenese, Migration und Invasion. Der EGFR spielt damit eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von Normalgewebe, indem er Morphogenese und Differenzierung vermittelt nachgeschalteten Signalwege werden im Folgenden beschrieben (Dutta and Maity, 2007).

1. Einen der Hauptsignaltransduktionswege stellt der rat sarcome Protein-rat fibrosarcoma-Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Weg (Ras-Raf-MAP-Kinase-Weg) dar. Über die EGFR-Stimulation wird Son of Sevenless (Sos) aktiviert. Indem Sos den Austausch von rat sarcome Protein (Ras) gebundenem GDP

gegen GTP ermöglicht, erfolgt die Aktivierung von Ras, ein monomeres G-Protein, das seinerseits wiederum das rat fibrosarcoma Protein (Raf) aktiviert. Das aktivierte Ras-Protein löst eine Reihe von Phosphorylationen aus. Auf diesem Weg wird die extracellular signal regulated kinase 1/2/mitogen activated protein kinase (ERK1/2/MAPK) in Gang geschaltet. Somit nimmt der EGFR Einfluss auf den Zellzyklus (Alroy and Yarden, 1997; Dutta and Maity, 2007).

2. Ein weiterer bedeutender Signalweg, der entweder direkt über den EGFR oder sekundär über Ras initiiert wird, ist die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3)/AKT-Kaskade. Die PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5,-trisphosphat (PIP₃). PIP₃ rekrutiert dann die Proteinkinase B (PKB=AKT) zur inneren Zellmembran. Einerseits vermittelt PIP₃ über die Aktivierung des mammalian target of rapamycin (mTOR) durch die PKB die Proteinsynthese und das Zellwachstum. Andererseits nimmt PIP₃ Einfluss auf die Motilität der Zellen, indem es das Protein Rac aktiviert. Die Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) hemmt in diesem Zusammenhang die Aktivität der PI3-Kinase und damit die Proteinkinase B (AKT).
3. Des Weiteren wird über die EGFR-Phosphorylation die Janus-Kinase (JAK) aktiviert. JAK wiederum vermittelt die Aktivierung der signal transducers and activators of transcription Proteine (STATs) und fördert so das Überleben der Zelle.
4. Eine andere Möglichkeit der Signalweiterleitung stellt die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) dar. Diese wird zu Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) und Diacylglycerine (DAG) gespalten. DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und vermittelt auf diesem Weg die Zellproliferation.

Abbildung 3 veranschaulicht die oben beschriebenen Signalwege des EGFR.

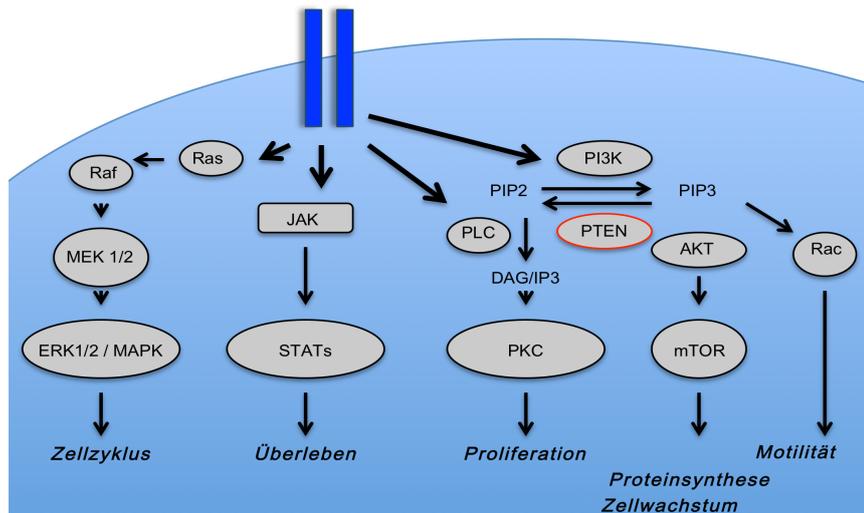


Abbildung 3: Signalwege des EGFR; modifiziert nach Dutta et al., 2007

2.3.4 Veränderte Rezeptoraktivität

Der EGFR hat eine entscheidende regulatorische Rolle für das Zellwachstum in unverändertem Epithelgewebe. Kommt es zu einer Dysregulation des EGFR und seiner nachgeschalteten Signalwege, hat dies eine Transformation zu Malignomen epithelialen Ursprungs zur Folge. Eine Dysregulation als Konsequenz einer EGFR Überexpression an der Zelloberfläche ist oft mit einer Genamplifikation oder einer Mutation assoziiert (Gan, Kaye et al., 2009). Die am häufigsten vorkommende Variante ist die EGFR Variante III (EGFR vIII) (Markovic and Chung, 2012).

2.4 EGFR Variante III (EGFR vIII)

2.4.1 Grundlagen der EGFR vIII-Genvariante

Die EGFR vIII (auch de2-7 EGFR oder Δ -EGFR) ist die häufigste extrazelluläre Mutation des EGFR (Markovic and Chung, 2012). Sie wurde erstmals in Glioblastomen entdeckt (Pedersen, Meltorn et al., 2001). EGFR vIII ist eine tumorspezifische Variante und wurde bisher nicht im Normalgewebe beobachtet. Die vIII-Variante resultiert aus einer in-frame Deletion von 801 Basenpaaren, die dem

Verlust der Exons 2-7 der mRNA und den Aminosäurereste 6-273 der Extrazellulärdomäne entsprechen. An der Fusionsstelle der entstandenen Aminosäurereste wird Glycin als neue Aminosäure generiert. Damit weist EGFR VIII eine einzigartige primäre Sequenz auf. Daraus resultiert ein im Vergleich zum Wildtyp (170 kDa) verkleinertes Protein von 150 kDa mit einer verkürzten Extrazellulärdomäne (Pedersen, Meltorn et al., 2001; Batra, Castelino-Prabhu et al., 1995). Außerdem ist zu erwähnen, dass der EGFR VIII neben einer genomischen Deletion auch durch alternatives Splicing entstehen kann (Pedersen, Meltorn et al., 2001). Charakteristikum des EGFR VIII ist, dass er keine Liganden binden kann und trotzdem konstitutiv phosphoryliert und somit fähig ist, downstream-Signalkaskaden zu aktivieren (Gan, Cvrljevic et al., 2013).

2.4.2 Liganden-unabhängige Dimerisierung und Rezeptoraktivität des EGFR vIII

Durch den Verlust von 267 Aminosäuren fehlen der Deletionsmutante die gesamte L1-Domäne und zwei Drittel der C2-Domäne (Pedersen, Meltorn et al., 2001).

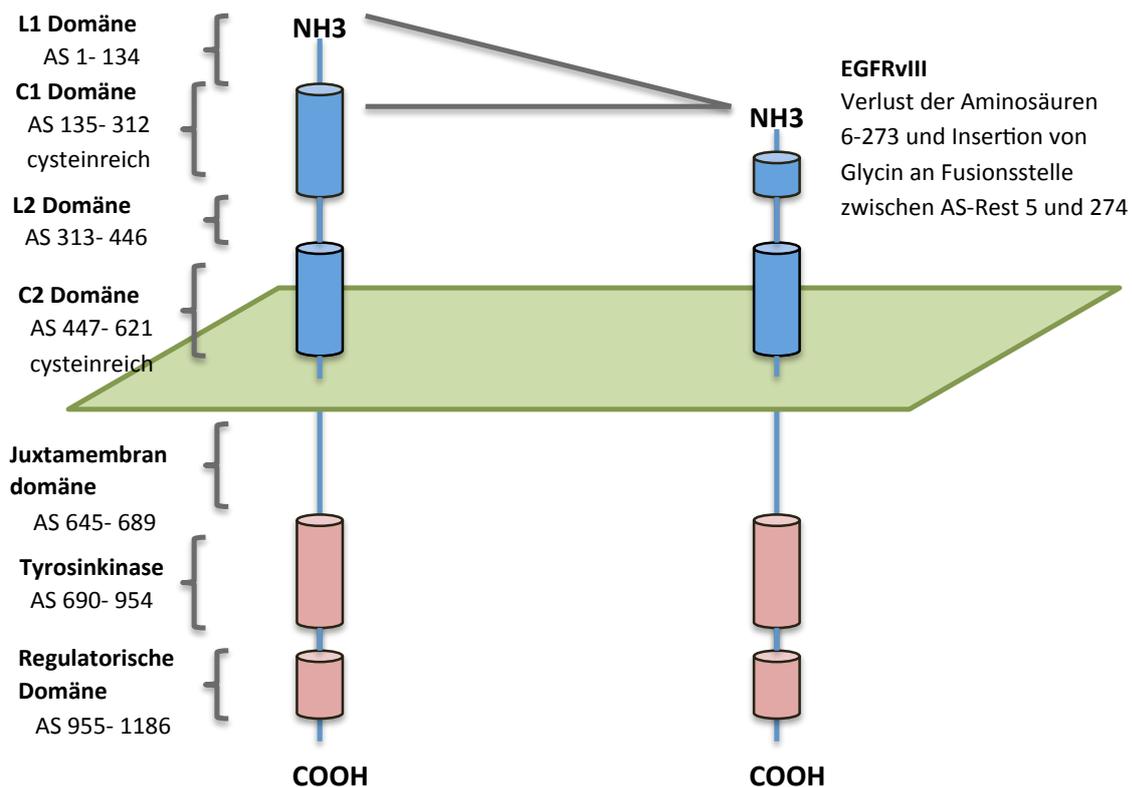


Abbildung 4: Aufbau des humanen EGFR und des EGFR vIII; modifiziert nach Pedersen, 2001

Damit verliert die EGFR vIII im Gegensatz zum Wildtyp-EGFR die Eigenschaft Liganden zu binden (Jorissen, Epa et al., 2000). Die Dimerisierung der EGFR vIII scheint demnach unabhängig von einer Ligandenbindung und unkontrolliert zu erfolgen. Der Mechanismus der Dimerisierung per se ähnelt der ligandenabhängigen Dimerisierung des EGFR (Chu, Everiss et al., 1997; Tang, Gong et al., 2000). Die konstitutiv-aktivierte Isoform des EGFR kann ebenfalls sowohl Homodimere mit EGFR vIII Tyrosinkinasen eingehen als auch Heterodimere mit anderen Tyrosinkinasen aus der ErbB-Familie (Gan, Cvrljevic et al., 2013). Die Hetero- oder Homodimere werden konstitutiv phosphoryliert. Dabei entspricht der intrazelluläre

Teil von EGFR vIII in seiner Primär- und Sekundärstruktur dem des Wildtyps, bis auf einige Unterschiede in der Tyrosinkinaseaktivität und einiger Autophosphorylationsstellen (Pedersen, Meltorn et al., 2001).

2.4.3 EGFR vIII-vermittelte Signaltransduktion

Die Rolle der EGFR vIII bei der Tumorigenese auf der Basis phosphorylierter Effektormoleküle zu verstehen, hat sich als äußerst schwierig dargestellt. Bisher konnten Adaptermoleküle mit sogenannten SH2- und Grb2-Domänen nachgewiesen werden, die an der zytostolischen Rezeptordomäne andocken.

Über diese Domänen aktiviert EGFR vIII diverse Signalwege. Die tumorigenen Effekte des EGFR vIII scheinen hauptsächlich über die Signaltransduktionswege PI3K/Akt, Ras/Raf/MAPK, Signaltransduktoren und Aktivatoren von signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) sowie nuclear factor of activated B-cells (NFκB) moduliert zu werden. Einige Studien sprechen dafür, dass EGFR vIII präferentiell den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert. Die EGFR vIII Expression korreliert mit einer Aktivierung der downstream Moleküle von PI3K/AKT, wie mTOR (Pedersen, Meltorn et al., 2001).

2.5 EGFR und EGFR vIII in Tumoren

Der EGFR ist ein epidermaler Wachstumsrezeptor und in der gesunden Zelle für die Aufrechterhaltung normaler zellulärer Funktionen und das Zellüberleben verantwortlich. Bei einer erhöhten Rezeptoraktivität kann dieser Rezeptor aber auch in Zusammenhang mit der Entartung von Zellen stehen.

Schon in den 80er Jahren haben diverse Studien die Überexpression des EGFR in unzähligen Tumoren epithelialen Ursprungs beschrieben und die tragende Rolle der deregulierten EGFR-Signalwege in Tumorgewebe propagiert (Gschwind, Fischer et al., 2004). Heute kann eine Überexpression des EGFR in mehr als 90% aller HNSCC-Fälle nachgewiesen werden, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert

sind, die sich wiederum in einer reduzierten Überlebenszeit, erhöhtem Metastasierungs- und Rezidivrisiko sowie schlechterem Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie manifestierten (Chung, Zhang et al., 2011; Zhang, Stiegler et al., 2010; Tang, Gong et al., 2000; Schmitz, Ang et al., 2014).

In Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches variieren die Zahlen der EGFR vIII-Expression zwischen 0% und 80% (Melchers, Clausen et al., 2014). Sok et al. beispielsweise nennt eine 42%ige Expression der konstitutiv-aktivierten Isoform EGFR vIII in HNSCC (Sok, Coppelli et al., 2006; Pickhard, Piontek et al., 2014). Die Expression EGFR vIII wurde bisher nur in Tumorgewebe nachgewiesen. Die hohe Prävalenz nicht nur in HNSCC, sondern darüber hinaus in den verschiedensten Tumorgeweben, zeigt, dass die Anwesenheit des EGFR vIII für den Prozess der Tumorgenese maßgebend ist. Viele Studien unterstützen diese Hypothese und weisen eindeutig auf eine Korrelation innerhalb der EGFR vIII-Expression und einer verstärkten Tumorigenität von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* hin. In Mausexperimenten wurde nach Verpflanzung EGFR vIII-transfizierter Zellen ein eindeutig verstärktes tumorauslösendes Potenzial der Zellen festgestellt (Pedersen, Meltorn et al., 2001).

Folglich tragen der EGFR und besonders der EGFR vIII maßgeblich an Tumorentwicklung und Tumorprogression bei.

Klinisch bedeutsam ist die mit dem Nachweis des EGFR vIII in Tumorgewebe ebenfalls verbundene schlechtere Prognose und damit die kürzere Überlebenszeit sowie das erhöhte Rezidiv- und Metastasierungsrisiko für den Patienten (Nagane, Coufal et al., 1996; Moscatello, Holgado-Madruga et al., 1995).

2.6 EGFR- und EGFR vIII-basierte Therapieansätze

Obwohl der EGFR kein tumorspezifischer Rezeptor ist, ist er in Tumoren epidermalen oder ektodermalen Ursprungs sehr häufig überexprimiert und repräsentiert damit ein potentiell Target in der molekularen Tumorthherapie. Daher wurden einige Strategien entwickelt, die Überexpression des EGFR herunter zu

regulieren oder dessen Aktivierung zu inhibieren. Hier hat der monoklonale Antikörper Cetuximab Einzug in die Klinik gefunden.

Eine Möglichkeit, die klassische Tumorthherapie weiterhin zu verbessern, bietet die tumorspezifische target therapy (Schmitz, Ang et al., 2014). Für diese stellt sich EGFR vIII als vielversprechendes Zielprotein dar.

2.6.1 Monoklonaler Antikörper Cetuximab (Erbix®)

Cetuximab ist ein therapeutischer chimärer monoklonaler Antikörper des IgG1 Isotyps gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor. Cetuximab verhindert durch das Binden an die Extrazellulärdomäne des EGFR die Anlagerung endogener Liganden. Somit inhibiert Cetuximab die Aktivierung des Rezeptors und die nachgeschalteten Signalkaskaden. Leider zeigt aber nur die Minderheit der HNSCC Patienten in rezidiviertem oder metastasiertem Stadium, die mit monoklonalen Antikörpern behandelt wurden, eine klinisch bedeutende Tumorregression. Zudem entwickeln so gut wie alle Patienten eine Resistenz nach wenigen Monaten der Behandlung (Goerner, Seiwert et al., 2010; Schmitz, Ang et al., 2014).

2.6.2 Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)

Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) sind Moleküle, die intrazellulär die Tyrosinkinaseaktivität inhibieren, indem sie die ATP-Bindestelle blockieren und so die Autophosphorylation und die nachgeschaltete Aktivierung der downstream-Signalwege hemmen. Gefitinib gehört dabei zu den bisher am meist erforschtesten TKI. In Phase I/II Studien konnten bereits Ansprechraten von 4-10% in rezidivierten oder metastasierten HNSCC nach Therapie mit TKI ausgewertet werden (Goerner, Seiwert et al., 2010). Aufgrund des intrazellulären Angriffspunktes zeigen TKI zum einen das Potential der simultanen Blockade des EGFR und EGFR vIII, ganz im Gegensatz zu dem Antikörper Cetuximab, der als Target auf ein

Extrazellulärdomäne angewiesen ist, zum anderen weisen die TKI den Vorteil der oralen Verfügbarkeit auf.

2.7 Zielsetzung

Eine Strategie, den EGFR zu blockieren, stellt der monoklonale Antikörper Cetuximab dar, der bereits seit 2004 Anwendung in der Klinik findet. Jedoch stößt die Therapie mit Cetuximab aufgrund von Resistenzmechanismen an ihre Grenzen. Diese Entwicklung fordert zur Suche nach neuen Therapiestrategien auf.

Die hohe Relevanz des EGFR und EGFR vIII wurde nicht nur für HNSCC, sondern auch für andere Tumorentitäten bereits des Öfteren beschrieben. Da vor allem EGFR vIII ausschließlich in Tumoren exprimiert wird, stellt es sich als vielversprechendes Zielprotein in der molekularen Tumorthherapie dar.

Das Thema dieser Promotion hat sich demzufolge mit Therapiemöglichkeiten des EGFR und EGFR vIII beschäftigt. Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt der Bestrahlung und verschiedener Inhibitoren, mit dem besonderen Augenmerk auf Tyrosinkinaseinhibitoren, auf das Proliferations-, Migrations- und Überlebensverhalten der Tumorzellen allein und bei simultaner Behandlung mit Bestrahlung von 2 Gray im Zellkulturmodell, darzustellen. Mit Hilfe etablierter HNSCC-Zelllinien und EGFR vIII transfizierter Zellen wurde dabei besonders das Verhalten von Wildtyp EGFR und EGFR vIII im Vergleich beobachtet.

3 Material

3.1 Biologische Materialien

Das biologische Material der in dieser Doktorarbeit untersuchten Versuchsreihen sind drei verschiedene humane Plattenepithel-Karzinomzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich (HNSCC). Die Zelllinien Cal27 und HN wurden vom Leibnitz-Institut DSMZ Braunschweig bezogen, UD-SCC-5 wurde von der Hals-Nasen-Ohren-Klinik Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Im Folgenden soll näher auf die in den Experimenten verwendeten Zelllinien eingegangen werden.

3.1.1 HNSCC Zelllinien

Die nachfolgende Tabelle enthält Informationen zu Tumorlokalisation, TNM-Klassifikation, Grading, Alter, Geschlecht und Status der untersuchten Zelllinien. Der EGF-Rezeptor liegt bei diesen Zelllinien als Wildtyp vor.

Zelllinie	Tumorlokalisation	TNM-Klassifikation	Grading	Alter	Geschlecht
Cal27	Zunge	TxNxMx	G3	56	m
UD-SCC-5	Supraglottis	T1N1M0	G3	44	m
HN	Weichgaumen	TxNxM1	G2	60	m

Tabelle 10: Verwendete HNSCC Zelllinien (Lin, Grandis et al., 2007)

3.1.2 EGFR vIII-transgene Zelllinien

Um die biologischen und biochemischen Funktionsweisen der EGFR vIII zu untersuchen, wurden alle oben beschriebenen Zelllinien mit der cDNA von EGFR vIII transfiziert.

Die unveränderten Zelllinien werden als Wildtyp Zellen bezeichnet (EGFR wt), im Unterschied zu den transfizierten EGFR vIII-exprimierenden Zelllinien (EGFR vIII).

3.1.3 EGFR vIII-Plasmid Vektor

Der verwendete Expressionsvektor pLEARN-EGFR vIII wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. Ulrich Keller aus der III. Medizinischen Klinik (Hämotologie/Onkologie), Klinikum rechts der Isar TU München, zur Verfügung gestellt. Ursprünglich hergestellt wurde der Vektor von Frank Furnari aus La Jolla, Kalifornien.

3.2 Kulturmedien und Zusätze

Reagenzien der Zellkultur	Firma und Firmensitz
Accutase	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DSMO) ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
DPBS (1x) Dulbecco's Phosphat-buffered Saline (-)CaCl ₂ (-)MgCl ₂	gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM (1x) + GlutaMAX™-I	gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Geneticin (G418)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin 200mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
TrypLE™ Express (1x) Stable Trypsin Replacement Encyme (+) Phenol Red	gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 11: Kulturmedien und Zusätze

3.3 Antikörper

Die folgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, deren Firmensitz und die ausgewählte Konzentration.

Tabelle 12 listet die im Western Blot verwendeten Primärantikörper auf.

Primärantikörper	Firma und Firmensitz	Verdünnung	Molekulargewicht
EGFR (1005)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1:2500	175 kDa
p-AKT Ser473	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1:500	60 kDa
p-EGFR Tyr1068	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1:2500	175 kDa
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1:1000	42, 44 kDa
Tubulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:10000	50kDa

Tabelle 12: Primärantikörper

3.4 Inhibitoren

Die in den Hauptversuchen verwendeten Konzentrationen ergaben sich aus den entsprechenden Konzentrationskinetiken und zeigt Tabelle 13. Die Inhibitoren und Antikörper, die für diese Arbeit zum Tragen gekommen sind, sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Inhibitor	Konzentration
Erbitux® (Cetuximab)	0 - 20 µg/ml
Iressa® (Gefitinib)	0 – 5,0 µM
Tyrophostin (AG1478)	0 – 5,0 µM

Tabelle 13: Zusammenfassung der Konzentrationskinetiken

Inhibitor	Firma und Firmensitz	Verwendete Konzentration
Erbitux® (Cetuximab)	Merck, Darmstadt, Deutschland	140 nM
Iressa® (Gefitinib)	Selleckchem, Houston, TX, USA	0,1 µM
Tyrophostin (AG1478)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland	0,1 µM

Tabelle 14: Verwendete Inhibitoren und Antikörper

3.5 Plasmid

Name	Literaturnachweis und Herkunft
pLERN VIII	(Batra, Castelino-Prabhu et al., 1995), Frank Furnari (La Jolla, Kalifornien)

Tabelle 15: Plasmid

3.6 Primer

Primer	Sequenz	Annealing	Länge	Melting Peak
vIII for rev	5'-GGCTCTGGAGGAAAAGAAAG-3' 5'-TCCTCCATCTCATAGCTGTCG-3'	57.0°C	90 bp	81.0°C

Tabelle 16: Primer

Die folgende Darstellung zeigt das nach Yoshimoto et al. modifizierte Prinzip der annealing sites für die spezifischen forward (EGFR vIII-2) und reverse Primer (EGFR vIII-1) der primären Sequenz der EGFR vIII (Yoshimoto, Dang et al., 2008).

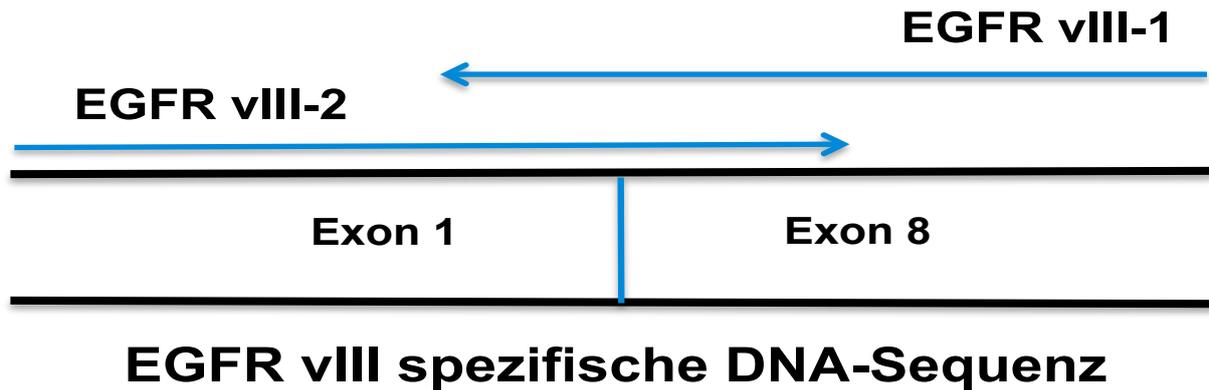


Abbildung 5: Prinzip der annealing sites für die Primer der EGFR VIII Sequenz, modifiziert nach Yoshimoto et al., 2008

3.7 Transfektion

Mit Hilfe einer Transfektion wurden exogene Nukleinsäuren in eine Zelle eingeschleußt. Die Transfektionstechnik, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurde, war die sogenannte Lipofektion. Hierbei handelt es sich um eine transiente Transfektion. Für eine ausreichende Zellzahl waren rund 1×10^5 – $2,5 \times 10^5$ Zellen erforderlich. Diese wurden schließlich auf 6-well-Platten ausplattiert und 24 Stunden kultiviert. Optimal für die Durchführung der Transfektion war eine Zellkonfluenz von 70-80%. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Ziel-DNA mit Hilfe eines Plasmid-Kits. Daran anschließend wurden 2-5 μg DNA in 100 μl Medium (OPTIMEM) aufgenommen, vorsichtig durchmischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel erfolgte die Pipettierung der Lipofektin-Mix mit 15 μl Lipofektin-Reagenz in 100 μl OPTIMEM und zum wiederholten Mal eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden beide Ansätze zusammen pipettiert, vorsichtig vermischt und nochmals 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden dann 800 μl Medium (Optimem) zum Lipofektin/DNA-Gemisch zugegeben und das Reaktionsgemisch tropfenweise auf die mit OPTIMEM gespülten Zellen pipettiert.

Schließlich wurden die Zellen über Nacht bei 37°C im Brutschrank zusammen mit dem Transfektionsgemisch aufbewahrt. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit OPTIMEM für 24 Stunden. Daraufhin wurden die Zellen auf eine 10 cm Kulturschale umgesetzt. Nun schloss sich die Selektion der positiv transfizierten Zellen mit einer Konzentration des Aminoglykosides Geneticin (G418) mit 0,8–1,0 mg/ml an. Die Konzentration konnte bei Bedarf auf 1,2 mg/ml angehoben werden. Der Selektionseffekt wurde nach 5-7 Tagen kontrolliert.

3.8 Kits

Kits	Firma und Firmensitz
Rneasy Kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 17: Kits

3.9 Reagenzien

Tabelle 18 gibt alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien wider. Tabelle 19 listet alle gemischte Reagenzien, Enzyme, Puffer und Gele auf.

Reagenzien	Firma und Firmensitz
1,4 Dithiotreitol (DTT) ≥99,9% p.a.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
1% Promphenol Blau	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
10x PCR Puffer S	PeqLab Biotechnologie, Deutschland
10x Tris-buffered saline 2- Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
1M Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

2x SYBR® Master Mix	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
5x First strand buffer	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS) ≥ 98% p.a.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	SAV Liquids Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) 2mg/ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bradford Reagenz: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Crystal Violett	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	GE-Healthcare, München, Deutschland
DNTP Polymerisation Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
DPBS (1x) Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (-)CaCl₂ (-) MgCl₂	gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Amresco, Solon, OH, USA
Formaldehydlösung säurefrei ≥ 37%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Glycerol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Glycin ≥99%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Hexanukleotid Mix 10x conc.	Roche, Mannheim, Deutschland
Lipofektion-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Methanol ≥99,5% p.a.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid <99,8%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) Acrylamidstammlösung 30% mit 0,8% Bisacrylamide	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
sodium dodecyl sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Tris Pufferan® ≥99,9% p.a.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 18: Reagenzien

Gemischte Reagenzien, Enzyme, Puffer, Gele	Zusammensetzung
0,01% Triton X-100/PBS	10 µl Triton X-100 1x DPBS ad 100ml
0,04% Crystal Violett	40 mg Crystal Violett 100 ml 4% Ethanol

0,1% Triton X-100/PBS	500 µl Triton X-100 1x DPBS ad 500ml
0,25% Triton X-100/PBS	250 µl Triton X-100 1x DPBS ad 100ml
1 M Tris-Cl pH 6.8	12,1 g Tris Aqua dest. ad 100 ml Mit Essigsäure auf pH 6,8 einstellen
1 M Tris-Cl pH 8.8	12,1 g Tris Aqua dest. ad 100 ml Mit Essigsäure af pH 8,8 einstellen
1% SDS	25ml SDS 20% Aqua dest. ad 500 ml
10% APS	1 g APS Aqua dest. ad 10 ml
10% Tween	10 ml Tween-20 1x DPBS ad 100 ml
10x SDS Laufpuffer (für 1 l)	30,3 g Tris 140,42 g Glycin 50 ml 20% SDS Aqua dest. Ad 1000ml (ggf. 1:10 mit Aqua dest. verdünnt)
10x TBS	20 mM Tris 24,2 g 137 mM NaCl 80 g Aqua dest. Auffüllen ad 1000 ml pH mit Essigsäure auf 7,6 einstellen Lagerung bei 4°C
10x TBS (für 1 l)	24,2 g Tris 80 g NaCl Aqua dest. Ad 1 l pH auf 7,6 mit Essigsäure einstellen
1x TTBS (Waschpuffer)	1x 10x TBS 100 ml 0,1% 10% Tween 10 ml Aqua dest. 890 ml
4% Formaldehyd/PBS	27 ml Formaldehyd 37% 1x DPBS ad 250ml
50 mM NH₄Cl/PBS	1 ml 500 mM NH ₄ Cl PBS ad 10 ml

5x SDS Sample Buffer (10ml)	3,125 ml Tros pH 6,8 1 M 386 mg DTT 1 g SDS 0,5 ml 1% Bromphenol Blau 5 ml Glycerol 1,375 ml Aqua dest.
Anodenpuffer	Anodenpuffer I 300 mM Tris (Base) 18,16 g 20% Methanol 100 ml aqua dest. Auffüllen ad 500 ml Anodenpuffer II 25 mM Tris (base) 1,51 g 20% Methanol 100 ml aqua dest. Auffüllen ad 500 ml
Antikörperverdünungs- und Blockingpuffer (für 1 l)	100 ml 10x TBS 10 ml 10% Tween 50 g Magermilchpulver 890 ml Aqua dest.
Bovine Serum Albumin 0,2 mg/ml	2 µl BSA 0,01x% Triton X-100 ad 1 ml
Cell lysis buffer (10X)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Kathodenpuffer	25 mM Tris (Base) 1,51 g 20% Methanol 100 ml 40 mM amino-n-caprioic acid 2,62 g Aqua dest. auffüllen ad 500 ml
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Strippig buffer	100 ml Methanol ≥99,5% p.a. 100 ml Eisessigsäure 800 ml Aqua dest.
SYBR® MasterMix	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Taq-Polymerase	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Tabelle 19: Gemischte Reagenzien, Enzyme, Puffer, Gele

3.10 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma und Firmensitz
15 ml Reaktionsgefäße „Cellstar Tubes“	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
50 ml Reaktionsgefäße „Cellstar Tubes“	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Biosphere Micro Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
ImmobilonP Transfer Membranes = Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore GmbH, Schwalbach
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten-Spitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Röntgenfilme Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare München, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Tissue Culture Dish 100 x 20 mm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Tissue Culture Dish 150 x 20 mm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Tissue Culture Plate 24-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Toppits Frischhaltefolie	Cofresco Frischhalteprodukte, Minden, Deutschland
Whatmann Gel Blotting Papier	Carl Roth AG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien

3.11 Geräte

Firma	Firma und Firmensitz
Absaugpumpe Vacuum Pump ME2	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Accu-jet® pro	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Analysenwaage SBC32	Scaltec, Heiligenstadt, Deutschland
Bestrahlungsgerät Gulmay Medical LTD RS225 X-Ray Box	Gulmay Medical LTD, Camberley, England
Blotting System Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Cleanbench: HeraSafe KS	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HeraCell 150i	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
ELISA Reader Multiscan FC	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Eppendorf Research-Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laborabzug	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze, Deutschland
Liebherr Gefrierschrank Premium No frost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Liebherr Kühlschranks comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer RCTbasic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop Leica DMI6000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
NanoDrop 1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Peqette	PeqLab, Erlangen, Deutschland

pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pipetman	Gilson, Middletown USA
Power Pac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Schüttler/ Mischer Vibrax VXR	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Taumel-Rollenmischer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland
Thermal Cycler C1000 Real-Time System CFX96™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vortexer: MS2 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zellzähler Cellometer™ Auto T4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge PerfectSpin Mini	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Tabelle 21: Geräte

3.12 Computerprogramme

Computerprogramm	Firma und Firmensitz
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
Image Lab™ 5.2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Leica Application Suite Software V3.8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Prism Graph Pad 6.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Quantity One Software 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

SkaniIt for Multiskan FC 2.5.1	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Software Cellometer Auto T4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Windows Office 2011	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

Tabelle 22: Computerprogramme

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung einer Zelllinie

Zur Kultivierung wurden die Zelllinien in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% aufbewahrt. Das als Nährmedium verwendete Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) wurde zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (FBS), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

4.1.2 Auftauen einer Zelllinie

Für die sogenannte Kryokonservierung im Verfahren der Zellkulturtechnik wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel eingesetzt. Aufgrund dessen zelltoxischer Wirkung war ein zügiges Arbeiten beim Auftauen von Zellen, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, gefordert. Um die Zelllinien aufzutauen, wurden diese für wenige Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gelegt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit Kulturmedium (10%, FBS, 2 mM Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin) resuspendiert. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde dann in 7 ml frischem Medium aufgenommen. Sobald sich die Zellen an der Zellkulturschale angeheftet hatten, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Reste des DMSO zu entfernen.

4.1.3 Einfrieren einer Zelllinie

Das Anlegen von Kryokonserven der Zelllinien war ein notwendiger Schritt in der Zellkultur, um im Bedarfsfall auf Reserven zurückgreifen zu können, falls diese beispielsweise bei Kontamination durch Mikroorganismen nicht überlebt hätten.

Für das Einfrieren wurden die Zellen mit einem bestimmten Freezing-Medium resuspendiert, das aus 20% FCS zu je 47,5 ml und aus 5% DMSO zu je 2,5 ml bestand. Zunächst sind die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 4 ml PBS gewaschen worden, um sie anschließend zu trypsinieren. Wenn sich die adhärennten Zellen nach wenigen Minuten Inkubation gelöst haben, konnten sie zusammen mit 4 ml frischem Medium in ein Kryoröhrchen überführt werden. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 21°C und 1500rpm für je 2 Minuten. Daraufhin wurde der Überrest mittels Sauger entfernt und das Pellet zusammen mit dem genannten Einfriermedium in ein Kryoröhrchen pipettiert. Das Kryoröhrchen wurde zunächst für wenige Minuten auf Eis gestellt, über Nacht auf -20°C abgekühlt, um es schließlich für die Langzeitaufbewahrung bei -80°C in flüssigen Stickstoff zu überführen.

4.1.4 Mediumwechsel

Für optimale Zellkulturbedingungen war ein regelmäßiges Wechseln des Nährmediums erforderlich. Hierfür wurde im Rhythmus von ca. 2-3 Tagen das bestehende Medium abgesaugt und anschließend ca. 4-6 ml neues Medium in die Kulturschale pipettiert.

4.1.5 Splitten einer Zelllinie

Durch das Splitten von Tumorzellen wurden bestehende Zellkolonien einer Kulturschale auf mehrere Schalen aufgeteilt und somit verdünnt. Um einen Wachstumsstopp oder ein Ablösen der Zellen mit nachfolgendem Zelltod zu vermeiden, war regelmäßiges Splitting erforderlich. Das Splitting war abhängig von der Verdoppelungsrate der Zellen. Im Rhythmus von etwa 2-3 Tagen, nach Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz, konnten die Zellen gesplittet werden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Kulturschale mit 4 ml PBS gespült. Die Zellen wurden dann mit 2 ml Accutase benetzt und lösten sich nach kurzer Inkubationszeit ab. Den trypsinisierten Zellen wurden je nach Verdünnungsreihe 4-8 ml frisches Medium

zugeführt und in ein Kulturröhrchen pipettiert. Es folgte ein sorgfältiges Durchmischen der Suspension zur Vereinzelung der Zellkolonien. Anschließend wurden je nach Bedarf wenige Milliliter der resuspendierten Zellen in neue Zellkulturschalen zusammen mit 7 ml Medium aufgeteilt.

4.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl ist grundlegend für die Reproduzierbarkeit von Experimenten.

Waren Zellen für eine vorgesehene Versuchsreihe ausreichend konfluent, wurden sie nach Absaugen des Mediums und Waschen mittels 4 ml 1x DPBS trypsiniert. Nach wenigen Minuten Inkubation im Brutschrank wurde der konfluente Zellrasen mit 4 ml Medium in ein Kulturröhrchen überführt. Nach mehrmaligem Durchmischen zur Vereinzelung der Kolonien wurden 21 µl in eine auf einem Objektträger integrierte Zellkammer pipettiert. Die für die einzelnen Versuchsreihen unterschiedlichen Zellzahlen wurden mit Hilfe des Zellzählers Cell Counter der Firma Peplab bestimmt. Die Maßeinheit wurde in Zellzahl/Mikroliter angegeben.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels qRT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen reversen Transkriptase-PCR konnte die Effizienz der EGFR vIII-Transfektion überprüft werden. Über Schmelzkurvenanalyse sollte sichergestellt werden, dass die RNA des vIII-Plasmids in den jeweiligen Zellen exprimiert wird.

4.2.2 RNA-Isolierung aus humanen Zelllinien

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen war der erste Schritt bei der Herstellung von cDNA, welche die Grundlage für die Polymerasekettenreaktions-Versuche darstellte.

Die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Quiagen durchgeführt. Alle hierfür erforderlichen Puffer sind in dem RNeasy Kit enthalten. Bei einer 80% konfluenten Zellkulturschale wurde zunächst das bestehende Medium abgesaugt und die Schale zweimal mit 4 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mittels 500 µl Lysepuffer und 10 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur abgelöst. Die konfluente Zellsuspension wurde dann nach sorgfältigem Abstreifen mit Hilfe eines Zellschabers in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 70%igem Ethanol vermischt. Nach Durchmischen des Lysats wurde das Volumen auf ein Spin Column übertragen und bei 12000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der nächste Arbeitsschritt umfasste wiederum eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit RW1 Puffer von 700 µl und das Abzentrifugieren der Flüssigkeit. Im Folgenden wurden die Zellen je zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Am Ende der Arbeitsreihe wurde die RNA mit 100 µl RNase free water eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei -20°C im Gefrierschrank gelagert und für die Langzeitlagerung bei -80°C aufbewahrt.

4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe des PeqLab NanoDrop Gerätes konnten sowohl die Konzentration als auch die Qualität der Nukleinsäuren bestimmt werden.

Für die Konzentrations- und Qualitätsmessungen wurde das Gerät zunächst mit 1 µl destilliertem Wasser initialisiert. Anschließend wurde gemäß der Geräteanleitung die RNA-Menge pro Mikroliter bestimmt. Zusätzlich wurde der Reinheitsgrad der Probe mittels OD ermittelt, der im Verhältnis von OD260/OD280 angegeben wird und für RNA im Bereich von 2,0 liegen sollte.

4.2.4 cDNA-Synthese

Die Herstellung von cDNA stellte eine Voraussetzung für die Durchführung einer PCR da.

Der RNA- und RT-Mix wurde folgendermaßen angesetzt.

RNA-Mix:

Reagenz	Stockkonzentration	Volumen	Endkonzentration
total RNA	x ng/μl	x μl	500 ng
Hexamers	10 x	1 μl	0,5 x
aqua dest.		x μl	-
Volumen		11 μl	-

Tabelle 23: RNA-Mix

RT-Mix:

Reagenz	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
DTT	100mM	2 μl	10mM
Reaktionspuffer	5x	4 μl	1x
dNTP's	40mM	0,5 μl	1mM
DPEC	-	1,5 μl	-
Volumen	-	8 μl	-

Tabelle 24: RT-Mix

Mit Hilfe der vorangegangenen RNA-Messung wurde ein entsprechendes Volumen von 500 ng RNA vorbereitet und dem RNA-Mix nach Vorgabe der oben genannten Tabelle auf Eis hinzugefügt. Der Mix wurde anschließend auf ein Volumen von 11 μl mit Diethylpyrocarbonat (DPEC) ergänzt. Um Sekundärstrukturen der DNA aufzulösen, wurde der RNA-Mix für 10 Minuten bei 70°C im Heizblock inkubiert, wenige Sekunden abzentrifugiert und schließlich auf Eis gestellt. Bei

Raumtemperatur wurde nach Hinzufügen von 8 µl RT-Mix die Reaktion inkubiert. Den nächsten Schritt stellte die 2,5 stündige Reaktion bei 37°C im Heizblock dar, nachdem der Suspension 1 µl Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV) (200 U/µl) zugegeben wurde. Die Inkubation bei 95°C führte schließlich zur Inaktivierung aller Enzyme.

Die dabei hergestellte cDNA wurde am Ende 1:2 mit aqua dest. verdünnt und bei -20°C im Gefrierschrank für weitere Versuche aufbewahrt.

4.2.5 Quantitative Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion diente zur Vervielfältigung spezieller Genabschnitte und Bestimmung der Expressionsrate der zugrundeliegenden RNA.

Master-Mix (qReal-Time-PCR):

Reagenz	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
SYBR® Master Mix	2x	12,5 µl	1
Primer for	10 µM	1 µl	0,8 pM
Primer rev	20 µM	1 µl	0,8 pM
aqua dest.		8,5 µl	
cDNA	12,5 ng/µl	2 µl	25 ng

Tabelle 25: Master-Mix

Die Menge des Master-Mix war abhängig von der Anzahl der verwendeten Zelllinien. Nach der Herstellung des Master-Mix wurden je 92 µl davon und je 8 µl Template der auf Eis liegenden cDNA auf ein Gesamtvolumen von 100 µl zusammenpipettiert. Anschließend wurden pro Ansatz je 3 x 25 µl in ein 96-well zugefügt, um dann folgendes Real-Time-PCR-Programm im Thermocycler CFX96 von BioRad zu durchlaufen:

PCR-Programm für den BioRad Thermocycler :

Temperatur	Zeit
95°C	7 Min.
95°C	30 Sek.
Annealing	30 Sek.
72°C	1 Min. 30 Sek.
72°C	7 Min.

Tabelle 26: PCR-Programm

4.2.6 Expressionsanalysen auf Proteinebene

4.2.6.1 Proteinisolierung

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen konnte die Proteinexpression bestimmt werden. Voraussetzung dafür waren Proteinlysate. Hierfür wurden zunächst von einer 80% konfluenten Zellkulturschale Proteine 24 Stunden nach der entsprechenden Behandlung isoliert. Außerdem wurde eine Kinetik mit Isolation nach 24, 48, 72 und 96 Stunden angefertigt.

Zuerst wurde der Lysepuffer vorbereitet. Dazu pipettierte man 4,5 ml aqua dest., 500 µl 10x Zellysepuffer und 100 µl Phenylmethylsulfonylfluorid zusammen und kühlte dies in einem Reaktionsgefäß auf Eis. Das Medium der Zellschalen wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 4°C kaltem 1x DPBS gespült und wieder abgesaugt. 500 µl des 1:10 verdünnten Lysepuffers wurden auf die Zellschalen gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers erfolgte das Ablösen der Zellen, die daraufhin in 1,5 ml Micro Tubes überführt wurden. Innerhalb der 10-minütigen Kühlung wurde der Inhalt des Reaktionsgemisches mittels Vortexer durchgemischt. Der nächste Schritt beinhaltete die Zentrifugation der Zellsuspensionen für 15 Minuten bei 4°C und 10.000rpm. Nachdem nun die Membranbestandteile von dem flüssigen Überstand mit den gelösten Proteinen getrennt wurden, musste dieser in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei -20°C eingefroren werden. Eine Proteinmengenbestimmung konnte so jederzeit erfolgen.

4.2.6.2 Bradford-Assay

Mit Hilfe der Methode des Bradford-Assays konnte die Proteinmenge in Proteinisolaten mittels photometrischer Bestimmung quantifiziert werden. So wurde möglich gemacht, dass exakte äquimolare Mengen der einzelnen Proteinlysate für die Gelelektrophorese vergleichbar verwendet werden konnten. Ziel des Bradford-Assays war, eine Menge von 10 µg Gesamtprotein zu bestimmen. Zunächst wurden die Proteinlysate mit 1x DPBS 1:10 verdünnt. 20 µl dieses verdünnten Lysates wurden mit 180 µl 1x DPBS und 200 µl 0,01% Triton X-100/1x DPBS vermengt. Das Bradford Reagenz wurde mit 1x DPBS 1:4 verdünnt und 600 µl davon zu den Probelösungen hinzugegeben. Um eine Kalibrierungskurve für die anstehende Messung zu erhalten, mussten die Standardlösungen aus einer 0,2 mg/ml BSA Lösung und 0,01% Triton X-100 hergestellt werden. 600 µl des verdünnten Bradford Reagenz wurden dann zu jeder der BSA Konzentrationen hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für die photometrische Messung in ein 96-well überführt. Die Messung der Extinktion der Probelösungen und der Kalibrierungslösungen erfolgte photometrisch bei 595nm mittels ELISA Reader Multiskan FC. Die gemessenen Werte wurden in das Computerprogramm Excel übertragen, um eine Kalibrierungsgerade zu erstellen. So konnten schließlich die benötigten Mengen Probelösung für die Gelelektrophorese bestimmt werden.

BSA (μg)	0,2 mg/ml BSA (μl)	0,01% Triton X-100/PBS (μl)
0	0	400
2	10	390
4	20	380
6	30	370
8	40	360

Tabelle 27: Kalibrationskurve für Bradford-Assay

4.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellt eine biochemische Methode zum Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe dar. Durchgeführt wurde diese Methode auf der Basis eines Tris-Glycin-Laufpuffers. Es mussten zweierlei Gele hergestellt werden: Das Running Gel und das Stacking Gel. Zunächst wurde das Running Gel benötigt, dessen Zusammensetzung Tabelle 28 zeigt. Die Dichte des Running Gels wurde in Abhängigkeit der Proteingröße gewählt, die es zu detektieren galt. Dementsprechend wurden für größere Proteine Gele mit geringerer Dichte verwendet und für kleine Proteingrößen Running Gele mit höherer Dichte. Die angegebenen Mengen in den folgenden Tabellen reichten für 4 Running Gele bzw. 4 Stacking Gele.

Running-Gel-Dichte	7,5%	10%	12,5%
aqua dest.	5,72 ml	6,64 ml	4 ml
Acrylamidstammlösung 30% mit 0,8% Bisacrylamide	5,08 ml	5,32 ml	8,4 ml
1M Tris pH 8,8	7,48 ml	4 ml	7,48 ml
20% SDS Lösung	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
N,N,N',N'- Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	25 µl	25 µl	25 µl

Tabelle 28: Zusammensetzung des Running Gels

Nachdem die Gele hergestellt waren, wurden die Gelkammern hiermit zu 2/3 aufgefüllt, mit aqua dest. übergossen und anschließend 45 Minuten bei Raumtemperatur polymerisiert. Das übrige Drittel der Gelkammer wurde im Anschluss mit dem Stacking Gel befüllt (s. Tab. 29) und die Kammschablonen eingebracht, welche so die Ladekammern für die Proteinlösungen formten. Nach 15 minütiger Polymerisationsdauer konnten die Gele beladen oder für die Verwendung am folgenden Tag im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

Stacking-Gel-Dichte	5%
aqua dest.	7 ml
Acrylamidstammlösung 30% mit 0,8% Bisacrylamide	1,672 ml
1M Tris pH 8,8	1,252 ml
20% SDS Lösung	50 µl
10% APS	100 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	25 µl

Tabelle 29: Zusammensetzung des Stacking Gels

Nach Auftauen der Proteinlysate wurde die mittels Kalibrationskurve berechnete

Menge des Proteinlysats für 10 µg Protein mit 5:1 5x Sample Puffer vermischt und 5 Minuten bei 98°C im Thermomixer denaturiert. Es folgte ein kurzes Abzentrifugieren. Im Anschluss wurde der Probenansatz in die Gelkammern übertragen. Als Größenstandard wurde 3 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder in die jeweils letzte Tasche des Gels hinzugefügt. Bei maximal 120 V betrug der Zeitraum 3 bis 4 Stunden im Blotting System Mini-PROTEAN® Tetra System, je nach Proteingröße.

4.2.6.4 Westernblot: Semidry-Blot System

Der Western Blot ist ein Verfahren, das zum Nachweis von Proteinen dient, indem diese auf eine Trägermembran übertragen werden (Blotting). Die Proteine wurden vorher in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Trägermembranen waren Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen.

Die 9 cm x 4,5 cm große PVDF-Membran wurde 5 Minuten in Methanol p.a. inkubiert und mit aqua dest. gespült. Anschließend folgte eine 5 minütige Inkubation in Anodenpuffer II (vgl. Tabelle 19). Eine Markierung diente zur Orientierung. Es wurden je für ca. 5 Minuten 6 Blotting Papiere in Anodenpuffer I eingeweicht, 3 Papiere in Anodenpuffer II, 9 Papiere in Kathodenpuffer. Für den Proteintransfer im elektrischen Feld von Kathode zu Anode wurde folgender in Abbildung 6 gezeigter schematischer Aufbau des Semidry Blots gewählt.

Der Proteintransfer erfolgte im Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell bei 225 mA in 80 Minuten.

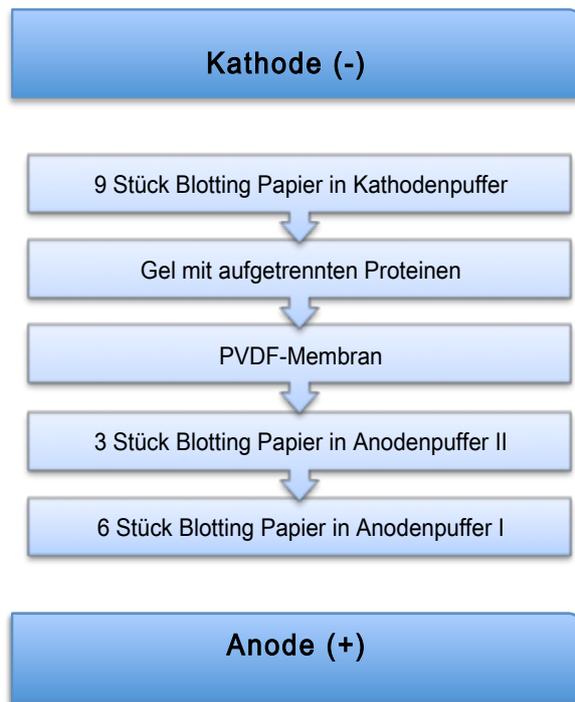


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Proteintransfers (Semidry Blot)

4.2.6.5 Immundetektion

Die Immundetektion ist eine Methode, die der quantitativen Darstellung von Banden spezifischer Proteine durch Bindung von Primärantikörpern und Sekundärantikörper für Mouse- oder Rabbit-IgG dient. Die Chemilumineszenz Reaktion wurde zur Visualisierung herangezogen.

Nach erfolgreicher Durchführung des Western Blots wurde die Membran in Waschpuffer (1x TTBS) geschwenkt. Im Anschluss folgte die Inkubation über Nacht in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 4°C auf einem Rollenmischer mit 10 ml Antikörperverdünnungspuffer (vgl. Tabelle 19) und dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung. 24 Stunden später wurden 3 Waschschrte der Membran für je 7 Minuten in Waschpuffer (1x TTBS) durchgeführt. Der nächste Schritt stellte eine weitere Inkubation mit 10 ml Antikörperverdünnungspuffer und dem eingesetzten Sekundärantikörper im 50 ml Reaktionsgefäß für 1 Stunde auf dem Rollenmischer dar. Die Membran wurde anschließend erneut 3 Mal für 7 Minuten im Waschpuffer geschwenkt. Der folgende Schritt beinhaltet die Inkubation

der Membran für 1 Minute in 10 ml SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate. Daraufhin wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und die Bilder im Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ von Bio-Rad entwickelt. Bei der hier verwendeten sog. Chemilumineszenz-Reaktion wurden Sekundärantikörper „HRP-linked“ verwendet, das heißt mit einer Horseradisch-Peroxidase verbunden. Mit Hilfe dieses Enzyms wurde eine Reaktion mit der immunfluoreszierenden Lösung (ECL Detection System) ausgelöst. Dies konnte mittels des Molecular Imager ChemiDoc von Bio-Rad detektiert werden. So wurden die Proteinbanden schließlich sichtbar gemacht und mit dem Computerprogramm ImageLab von der Firma Bio-Rad verarbeitet.

4.2.7 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen wurde in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Stephanie Combs durchgeführt.

Als Standardeinstellung für das Strahlengerät der Firma Gulmay Medicals wurde für alle Experimente eine Spannung von 70 kV, eine Stromstärke von 10 mA, eine Tischhöhe von 490 mm und der Filter #3 gewählt.

Entsprechend der vorgesehenen Strahlendosis wurden die Zellen unterschiedlich lange bestrahlt. Eine Dosis von 1 Gray entspricht analog 1 Minute, eine Dosis von 5 Gray 5 Minuten und eine Dosis von 8 Gray 8 Minuten. Nach umfangreichen Vorversuchen wurde eine Bestrahlungsdosis von 2 Gray für die Expressionsanalysen und für die Überlebens-, Proliferations- und Migrationsanalysen festgelegt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte stets in der Kulturschale mit Medium und Deckel.

4.2.8 Proliferations- und Überlebensanalysen

4.2.8.1 *Crystal-Violett ELISA Proliferations-Assay*

Der Crystal-Violett ELISA Langzeit-Proliferations-Assay ist eine Methode, die zur näheren Bestimmung der Zellviabilität nach einem Zeitraum von 10 Tagen dient. Das Versuchsprinzip stellte die Extinktionsmessung bei 595 nm dar, nachdem die Zellen nach zytotoxischen Kombinationsbehandlungen mit Crystal-Violett angefärbt wurden. Zu Beginn des Experiments wurden pro well je 5×10^3 Zellen von einer 80% konfluenten Kulturschale in 5 ml Medium ausgesät. Nach einer 24 stündigen Wachstumsphase im Brutschrank bei 37°C fanden an Tag 2 die Behandlungen statt. Die Zellen wurden mit den folgenden Inhibitoren behandelt: AG1478, Gefitinib und Cetuximab (vgl. Tabelle 14). Nach einer Stunde wurden die Zellen mit 2 Gray bestrahlt. Nach weiteren 10 Tagen Kultivierung bei 37°C ohne Mediumwechsel bildeten die Tumorzellen Kolonien, die nun mit Hilfe des Farbstoffes Crystal Violett dargestellt wurden, um den Effekt der Kombination aus Bestrahlung und Antikörperbehandlung zu messen.

Vor der Messung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 20 Minuten mit 4% Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach Absaugen des Formaldehyds wurden die Zellen zweimalig je mit PBS/Triton und destilliertem Wasser gewaschen. Der nächste Schritte stellte die 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur nach Zugabe einer 0,04%igen Crystal-Violett-Lösung dar. Anschließend wurden die Zellen wiederum 3 Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Der folgende Schritt stellte die Zugabe von 2 ml 1%SDS-Lösung und das Lysieren der Zellen für eine Stunde auf den Rüttler dar. Am Ende folgte eine Umpipettierung von je 100 µl des SDS-Lysats in ein 96-well um schließlich die Extinktion bei 595 nm mit dem Gerät Multiskan FC von der Firma Thermo Scientific zu messen.

4.2.8.2 *Colony-Formation-Assay*

Den Goldstandard zur Messung des Effekts zytotoxischer Substanzen auf Tumorzellen *in vitro* stellt der Colony-Formation-Assay dar (Katz, Ito et al., 2008).

Die Durchführung des Experiments lehnte sich an die des Crystal-Violett ELISA Langzeitproliferations-Assays an. Zunächst wurden pro well je 5×10^2 Zellen von einer 80% konfluenten Kulturschale in 5 ml Medium ausgesät. Es folgte eine 24 stündige Wachstumsphase im Brutschrank bei 37°C. Die Behandlungen fanden an Tag 2 statt. Die Zellen wurden wiederum mit den folgenden Inhibitoren behandelt: AG1478, Gefitinib und Cetuximab (vgl. Tabelle 14). Eine Stunde später wurden die Zellen mit 2 Gray bestrahlt. Nach 10 Tagen Kultivierung bei 37°C ohne Mediumwechsel bildeten die Tumorzellen Kolonien, die nun mit Hilfe des Farbstoffes Crystal Violett dargestellt wurden, um den Effekt der Kombination aus Bestrahlung und Antikörpern zu messen.

Die Fixierung mit Hilfe des 4%igen Formaldehyds sowie das Waschen mit PBS/Triton und destilliertem Wasser glich den Schritten des Proliferation-Assays. Nach Zugabe der Crystal-Violett-Lösung zur Anfärbung der Zellen wurden diese lediglich mit Leitungswasser ausgewaschen und anschließend zum Trocknen ausgelegt. Schließlich wurden die Kolonien, die sich nach 10 Tagen gebildet hatten, mit dem Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ digitalisiert und mit Hilfe des Programms Quantity One der Firma BioRad ausgezählt.

4.2.8.3 Scratch-Migrations-Assay

Der Scratch-Assay ist eine etablierte und gut entwickelte Methode zur Messung von Migration von Zellen *in vitro*. Als „Scratch“ wird eine strichförmige Unterbrechung eines konfluenten Zellrasens bezeichnet. Dabei wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze in einem Zell-Monolayer eine linienförmige Unterbrechung im Zellrasen erzeugt. Zellen migrierten in diesen manuell erstellten Scratch, sodass die manuell entstandene Lücke schrittweise geschlossen wurde.

Zu Beginn der Durchführung des sogenannten „Scratch-Assays“ wurden von einer 80% konfluenten Zellkulturschale 10^6 Zellen pro well mit je 2 ml Medium ausgesät. Nachdem die Zellen über 24 Stunden bei 37°C kultiviert wurden, setzte man den Scratch in den über 24 Stunden gebildeten Zell-Monolayer mittels einer

Pipettenspitze in vertikaler Richtung des jeweiligen wells. Es schloss sich die Bestrahlung mit 2 Gray für entsprechende 2 Minuten und die Behandlung mit den Inhibitoren AG1478, Gefitinib und Cetuximab mit den vorgesehenen Konzentrationen an. Anschließend wurde der Scratch zu den folgenden Zeitpunkten zur Bestimmung der Migration nach 0, 5 und 10 Stunden mit Hilfe des Leicamikroskops und dem Leica Application Suite abfotografiert.

Zur Orientierung wurden zu Beginn des Versuchs am Boden der 6-wells Horizontallinien angezeichnet, die den Scratch zu 90° schnitten, sodass ein örtlicher Referenzpunkt festgelegt war. Mit Hilfe dieser optischen Markierung war der exakte Vergleich der abfotografierten Migrationsorte im Zeitverlauf (0, 5, 10 Stunden) stets gewährleistet.

Indem die Zellen innerhalb der 10 Stunden in den Scratch migrierten, konnte schließlich die Migrationsrate der Zellen durch Vergleich der abfotografierten Bilder zu den unterschiedlichen Zeitpunkten quantifiziert werden.

Für die Auswertung der Bilder zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurde das Programm Photoshop verwendet. Indem zunächst die Gesamtpixelzahl eines Bildes abgelesen wurde, wurde darauf folgend der linienförmige, vertikalverlaufende Scratch mit dem Lasso-Werkzeug nachgefahren und schließlich die Pixelzahl des Scratches bestimmt. Mit Hilfe der folgenden Formel konnte ein Vergleichswert innerhalb der Zeitintervalle berechnet werden:

$$\frac{(x_2 - x_1) \times 100}{X_{\text{gesamt}}}$$

Formel 1: Statistische Auswertung des Scratch-Migrations-Assays

x_1 : Gesamtpixelzahl-Pixelzahl zu 0h, bzw. 5h

x_2 : Gesamtpixelzahl-Pixelzahl zu 5h, bzw. 10h

X_{gesamt} : Gesamtpixelzahl X.

Die aus dieser Formel gewonnenen Daten zeigen die prozentuale Verkleinerung der Scratchfläche und lassen somit Rückschlüsse auf das Migrationsverhalten der Zelllinie zu.

4.2.9 Statistik

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse des Crystal-Violett ELISA Proliferations-Assays, des Colony-Formation-Assays und des Scratch-Migration-Assays wurde mit Hilfe des Statistik-Programms Graph Pad Prism 6.0 ermittelt. Außerdem wurden mit diesem Programm die Auswertung der Ergebnisse, die Darstellung derselben mittels Graphen und die p-Wert Berechnung durchgeführt. Die statistische Auswertung basierte bei allen Versuchen auf paarigen Ansätzen. Demzufolge sind die unterschiedlichen Behandlungen der einzelnen Versuchsreihen zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt worden. Mit Hilfe des ungepaarten t-Tests mit einem 95% Konfidenzintervall wurde die Signifikanz der einzelnen Behandlungen im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle der entsprechenden Wildtypzelllinie berechnet. Die folgende Tabelle definiert die einzelnen Signifikanzniveaus.

Signifikanzniveau	Darstellung
$p < 0,05$	* (signifikant)
$p < 0,01$	** (sehr signifikant)
$p < 0,001$	*** (höchst signifikant)

Tabelle 30: Definition der Signifikanzniveaus

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis der Transfektionseffizienz mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit EGFR VIII-exprimierenden Zelllinien gearbeitet. Mit Hilfe der quantitativen reversen Transkriptase-PCR wurde die Effizienz der EGFR VIII-Transfektion überprüft. Im Folgenden werden hierfür exemplarisch die Schmelzkurvenanalysen der Zelllinie Cal27 präsentiert.

Folgende Abbildung 7 zeigt zum einen die Daten des EGFR VIII-Plasmidvektors als Referenz für die transfizierten Zelllinien, zum anderen die Zelllinien Cal27 wt und Cal27 VIII im Vergleich. Neben der Amplifikationskurve werden in Abbildung 7 außerdem der Schmelzpeak und die Schmelzkurve dargestellt. Genannte Abbildungen weisen also die Expression der RNA des VIII-Plasmides in den Zellen nach und damit die erfolgreich durchgeführte Transfektion. Außerdem kann die Expression der EGFR VIII-RNA für die Zelllinien Cal wt und Cal27 VIII eindeutig nachgewiesen werden. Die Schmelztemperatur sowie der Schmelzpeak des Plasmidvektors liegen bei 82,50°C. Mit einer Schmelztemperatur von 83,5°C kann die Zelllinie Cal27 wt identifiziert werden.

Die C(t)-Werte, die den Kurventeil beschreiben, in dem die Fluoreszenz zum ersten Mal exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt, wurden von den Tabellen 31 und 32 zusammengefasst. Die Schmelztemperaturen der Plasmidvektoren zeigt Tabelle 33. Die Tabelle 34 veranschaulicht die Schmelztemperaturen der Zelllinien Cal27 wt und Cal27 VIII.

Dieselben Ergebnisse und damit eine stabile Transfektion konnten ebenfalls für die Zelllinien HN und UD-SCC-5 wt nachgewiesen werden. Die Daten sind hier nicht aufgeführt.

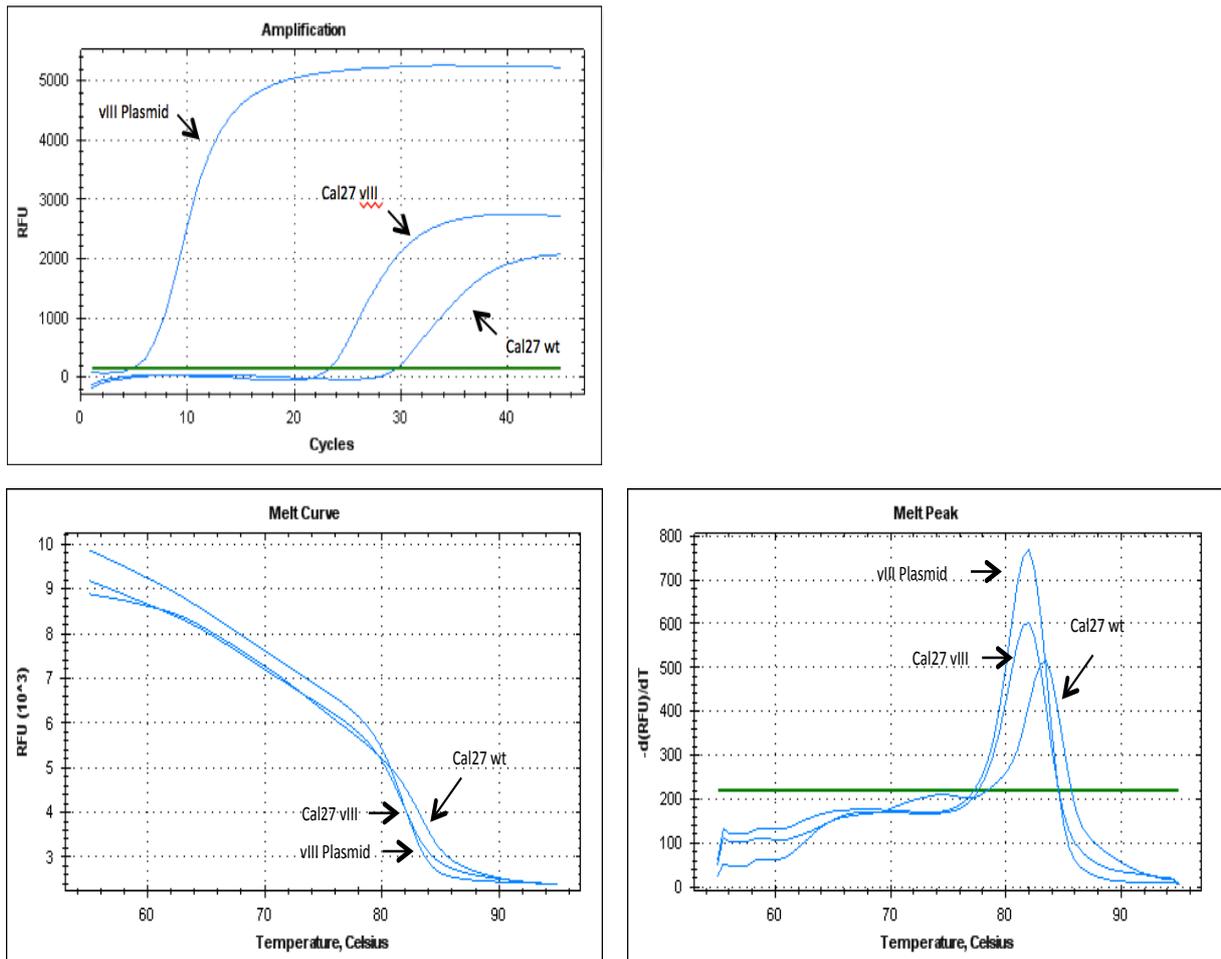


Abbildung 7: Amplifikationskurve, Schmelzkurve und Schmelzpeak der Zelllinie Cal27 wt, Cal27 VIII und des VIII Plasmidvektors

Probe	C(t)-Werte
vIII Plasmid	9,25
vIII Plasmid	9,38
vIII Plasmid	9,25

Tabelle 31: Zusammenfassung der C(t)-Werte der Amplifikation des vIII-Plasmidvektors

Probe	C(t)-Werte
Cal27 wt	29,57
Cal27 vIII	23,28
Cal27 vIII-Plasmid	4,70

Tabelle 32: Zusammenfassung der C(t)-Werte der Amplifikation der Zelllinie Cal27 wt und Cal27 vIII

Probe	Schmelztemperatur
vIII-Plasmid	82,50° C
vIII-Plasmid	82,50° C
vIII-Plasmid	82,50° C

Tabelle 33: Zusammenfassung der Schmelztemperatur des vIII-Plasmidvektors

Probe	Schmelztemperatur
Cal27 wt	83,50° C
Cal27 vIII	82,00° C
Cal27 vIII-Plasmid	82,00° C

Tabelle 34: Zusammenfassung der Schmelztemperaturen der Zelllinie Cal27wt und Cal27 vIII

5.2 Crystal-Violett ELISA Proliferations-Assay

Der Crystal-Violett ELISA Langzeit-Proliferations-Assay ist eine Methode, die zur Bestimmung der Zellproliferation nach einem längeren Zeitraum und stattgefundenener Behandlung dient. Besonderes der Effekt der Bestrahlung und der Inhibitoren auf das Überleben der Zellen sollen in dieser Arbeit dargestellt werden.

5.2.1 Proliferationsverhalten der Zelllinien: Vergleich wt versus vIII

Im Folgenden wird das Proliferationsverhalten zwischen Wildtyp und EGFR vIII der einzelnen Zelllinien miteinander verglichen. Der Zeitraum der Proliferationsanalysen betrug 9 Tage.

Bei der Zelllinie Cal27 ist zwischen Tag 0 und Tag 3 sowohl bei Cal27 wt als auch bei Cal27 vIII ein leichter Anstieg der Proliferation zu erkennen. Nach 72 Stunden ist für die Wildtypzelllinie ein linearer Anstieg und damit ein vermehrtes Proliferationsverhalten im Vergleich zu Cal27 vIII festzustellen.

Die Geraden der Zelllinie HN nehmen ebenfalls an Tag 3 einen unterschiedlichen Verlauf. An Tag 6 weist die Wildtypzelllinie einen exponentiellen Proliferationsanstieg auf, wohingegen EGFR vIII weiterhin sehr langsam proliferiert.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei UD-SCC-5 festgestellt. Während der ersten 3 Tage zeigen sowohl die Wildtypzellen als auch die transgenen Zellen nur einen minimalen Anstieg der Proliferation. Der Unterschied des Proliferationsverhaltens zwischen EGFR wt und EGFR vIII fällt ab Tag 3 ebenfalls sehr deutlich aus.

Zusammenfassend charakterisieren sich die Wildtypzellen mit einer deutlich stärkeren Proliferation, die sich vor allem ab Tag 3 manifestiert. UD-SCC-5 vIII proliferiert dagegen während der kompletten Beobachtungsdauer langsamer als die EGFR-Wildtypklone. Von allen drei HNSCC-Zelllinien weist die Zelllinie Cal27 die höchste Proliferationsrate auf.

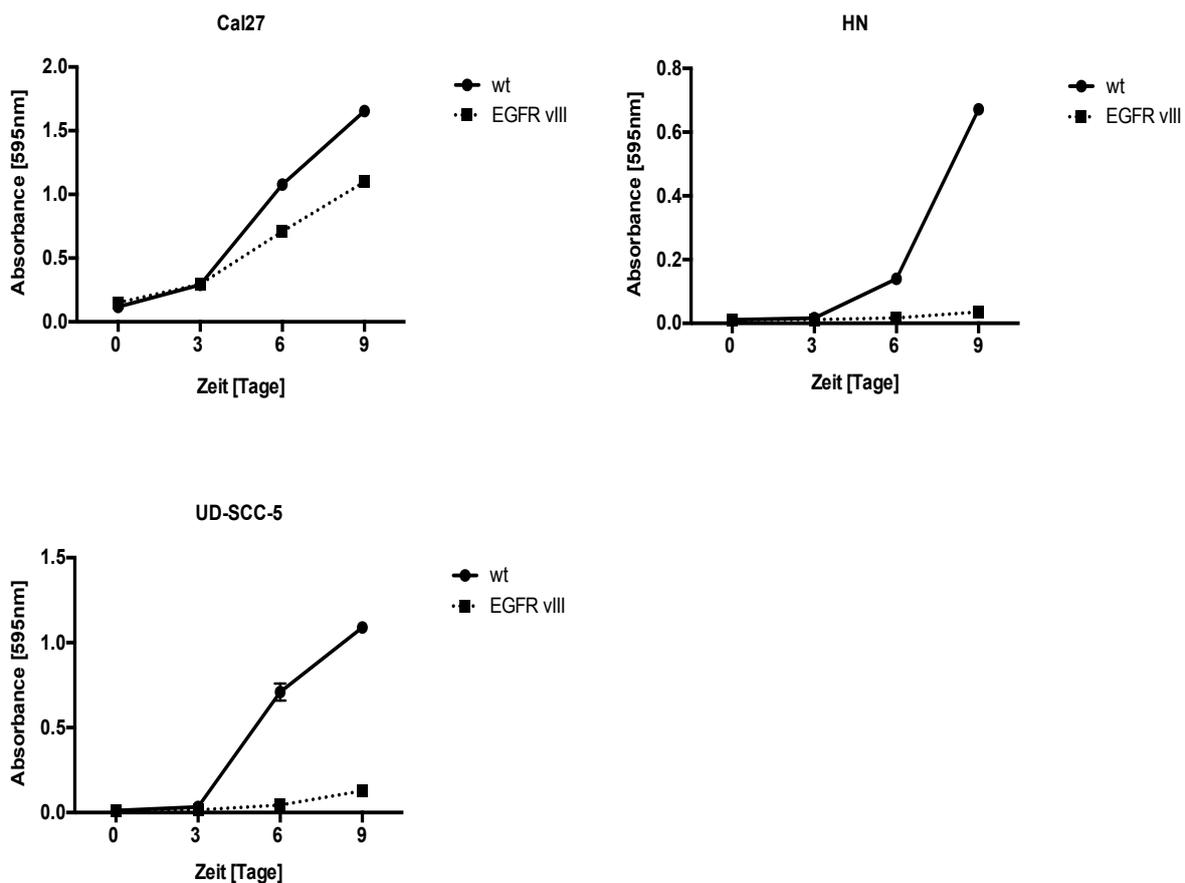


Abbildung 8: Proliferationskinetiken der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5

5.2.2 Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation und das klonogene Überleben der EGFR wt-Zelllinien

Um das Verhalten der Zellen bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen aufzuzeigen, wurden die Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5 mit 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 Gray bestrahlt. Die Berechnung der IC_{50} -Konzentrationen wurde durch nicht-lineare Regression und Mittelwertbildung drei Mal bestimmt. Tabelle 35 fasst die ermittelten IC_{50} -Konzentrationen der drei untersuchten Zelllinien nochmals zusammen. Die hier genannten Daten basieren auf den Ergebnissen vorangehender Proliferationsanalysen, die innerhalb der Arbeitsgruppe vielfach durchgeführt wurden. Bei der Zelllinie Cal27 zeigt die Bestrahlung einen deutlich hemmenden Effekt. Die mittlere inhibitorische Konzentration, also die Bestrahlungsdosis, bei der noch 50% der Zellen überleben, liegt bei 7,65 Gray.

Die Zelllinie HN zeigt sich im Vergleich zu Cal27 strahlensensibler. Die halbmaximale Inhibition liegt bei einer Bestrahlungsdosis von 5,83 Gray.

Strahlenresistenter dagegen zeigt sich die Zelllinie UD-SCC-5. Hier wird ein Zelluntergang von 50% erst bei 9,20 Gray erreicht. UD-SCC-5 wt präsentiert sich als strahlenresistenteste Zelllinie.

Zelllinie	IC_{50} -Dosis
Cal27	7,65 Gy
HN	5,83 Gy
UD-SCC-5	9,20 Gy

Tabelle 35: Zusammenfassung der IC_{50} -Dosen nach Bestrahlung der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5

Zur besseren Übersicht wird das klonogene Überleben nach Bestrahlung unter diesem Punkt aufgeführt.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte für die Analyse des klonogenen Überlebens mit jeweils mit 2, 5, 8 und 10 Gray. Als Vergleich diente eine unbestrahlte Kontrolle, die hier mit 0 Gray beschriftet ist.

Bei 8 Gray Bestrahlungsdosis hat das klonogene Überleben von Cal27 wt bereits mehr als 50% abgenommen. Bei 10 Gray überleben nur noch 20% der Kolonien.

Cal27 vIII überlebt nach 2 Gray Bestrahlung mit nur mehr 60% der Kolonien. 5 Gray erreichen eine 50%ige Reduktion des klonogenen Überlebens. Weniger als 25% überleben nach 10 Gray Bestrahlung. Cal27 vIII präsentiert sich damit als strahlensensibler.

Die Zelllinie HN zeigt sich als strahlensensibelste Zelllinie. Während 2 Gray nur einen geringen Effekt zeigen, konnte das klonogene Überleben nach Bestrahlung mit 5 Gray auf bis zu fast 50% reduziert werden. Eine Therapie mit 10 Gray bewirkt eine klonogene Überlebensrate von nur mehr ca. 7%.

HN vIII überlebt mit ca. 75% nach Bestrahlung mit 2 Gray. Mit einer Bestrahlungsdosis von 8 Gray oder mehr werden mehr als 75% der Kolonien reduziert.

UD-SCC-5 lässt sich als die strahlenresistenteste der drei Zelllinien charakterisieren. Die mit 8 Gray bestrahlten Zellen weisen noch eine Überlebensrate von über 50% auf. 10 Gray Bestrahlungsdosis erreicht eine Reduktion von über 50%.

Im Vergleich zu den Wildtypzellen verhalten sich die transgenen Zellen gegenüber 2 Gray Bestrahlung mit einer Reduktion von nur knapp 25%. Eine Reduktion um 50% erreichen 5 Gray. 8 und 10 Gray reduzieren das klonogene Überleben um mehr als 75%.

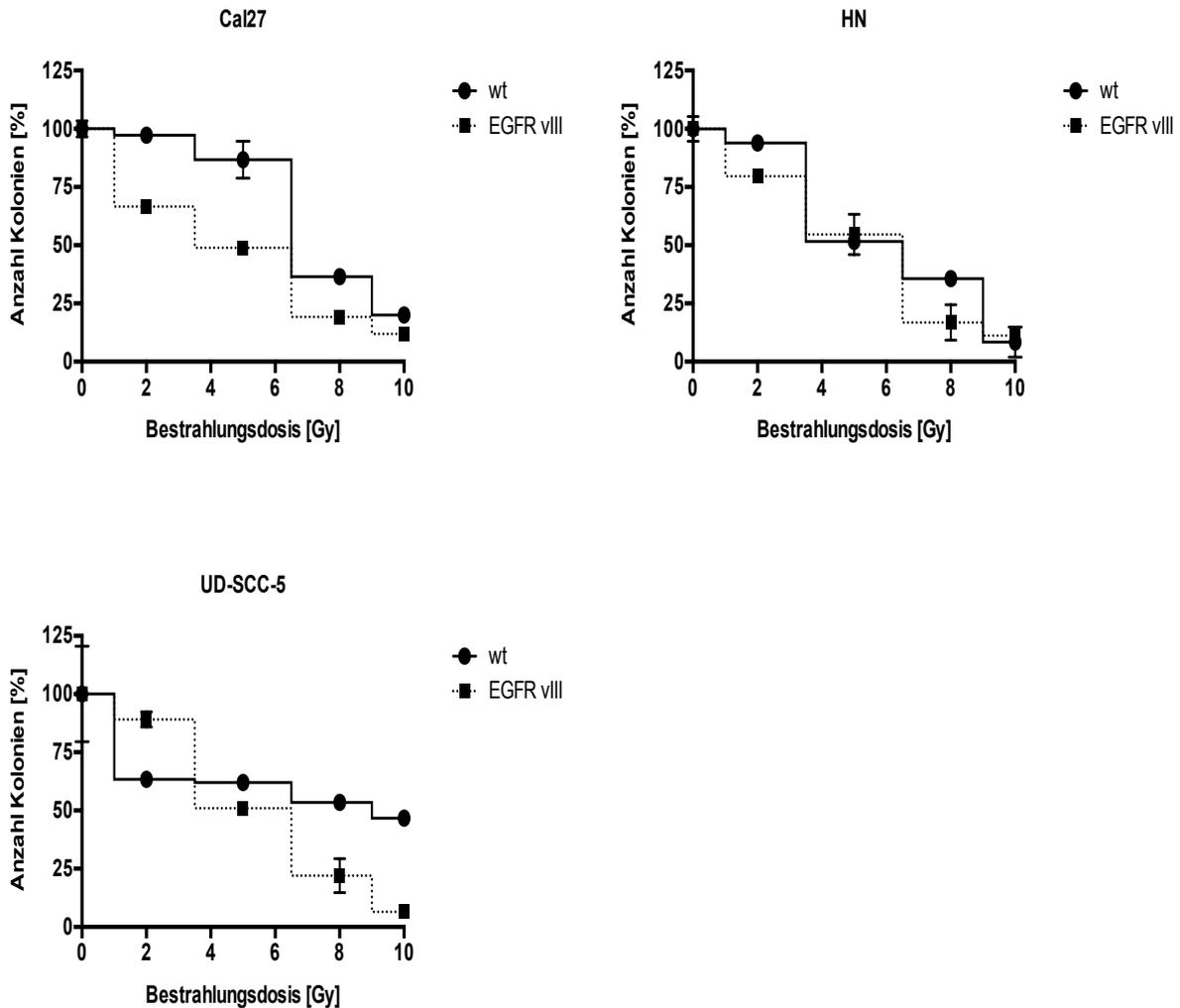


Abbildung 9: Einfluss der Bestrahlung auf das klonogene Überleben der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5

5.2.3 Einfluss der Blockade des EGFR wt auf die Proliferation der Zelllinien

Die für diese Arbeit ausgewählten Inhibitoren bzw. Antikörper sind zum einen AG1478 und Gefitinib und zum anderen Cetuximab. Alle Inhibitoren blockieren den EGF-Rezeptor. Die verwendeten Konzentrationen liegen im Bereich von 0-5 μM bzw. 0-20 $\mu\text{g/ml}$. Anhand dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss der Inhibitoren bzw. des Antikörpers auf die Proliferation der einzelnen Zelllinien dargestellt und die IC_{50} -Konzentration für die jeweiligen Inhibitoren bzw. des Antikörpers ermittelt.

5.2.3.1 Einfluss von AG1478 auf die Proliferation der Zelllinien

Der Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 zeigt bei allen drei Zelllinien einen antiproliferativen Effekt.

Bei Cal27 hat sich die Lebendzellzahl bei einer Konzentration von 0,5 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf 50% reduziert. Mit zunehmenden Konzentrationen zeigt sich weiterhin ein abnehmendes Überleben der Zellen. Bei einer Menge von über 5 μM des TKIs AG1478 ist kein Zellüberleben mehr nachzuweisen.

Die Zelllinie HN reagiert sensibler auf den TKI AG1478. Die Zellen zeigen bei einer Konzentration von 0,5 μM bereits einen Rückgang des Überlebens von mehr als 80%. Ab 4 μM zeigt sich erneut ein deutlich hemmender Effekt und es lässt sich bei 5 μM eine Überlebensrate von nur mehr knapp 10% feststellen.

Die Zelllinie UD-SCC-5 zeigt eine Reduktion der Zellproliferation von mehr als 50% ab einer Konzentration von AG1478 bei ca. 0,5 μM . Zwischen den Konzentrationen 3-5 μM zeigt der Inhibitor eine Reduktion der Überlebensrate von mehr als 90%. In Zusammenschau aller drei Kurven sind die Verläufe der Zellproliferationskurven nach AG1478-Gabe aller drei Zelllinien vergleichbar.

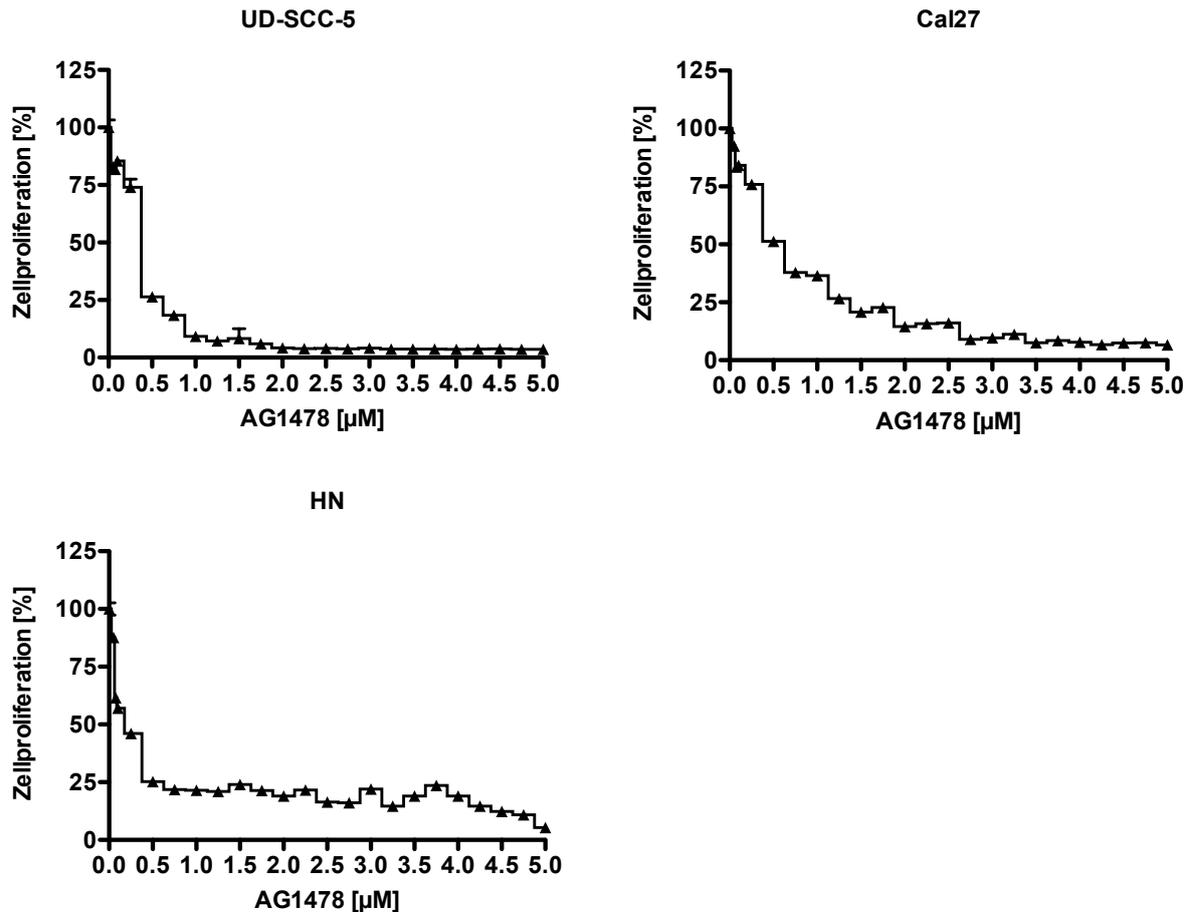


Abbildung 10: Einfluss von AG1478 auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5

5.2.3.2 Einfluss von Gefitinib auf die Proliferation der Zelllinien

Um das Ansprechen der Zelllinie auf den Inhibitor Gefitinib zu beurteilen, wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von 0 bis zu einer Maximalkonzentration von 5 µM mit Gefitinib behandelt.

Das Überleben der Zelllinie Cal27 reduziert sich auf 50% im Bereich der Konzentration von ca. 0,05 µM. Bezüglich des Überlebens der Zellen sind ab einer Konzentration von 1 µM keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Hier schwanken die Überlebensraten zwischen 10% und 15%.

Sensibler auf die Inhibition mit Gefitinib reagiert die Zelllinie HN. Hier liegt die IC_{50} -Konzentration bereits im Bereich von 0,02 µM. Zwischen 2,5 µM und 5 µM nimmt die prozentuale Proliferation von etwa 15% auf ca. 5% ab.

Die Proliferation der UD-SCC-5 Zellen können erst bei Konzentrationen im Bereich von 0,06-0,08 μM auf weniger als 50% gesenkt werden. Ab einer Dosis von 2,5 μM bis 5 μM reduziert sich die Proliferation von 5% auf 0%.

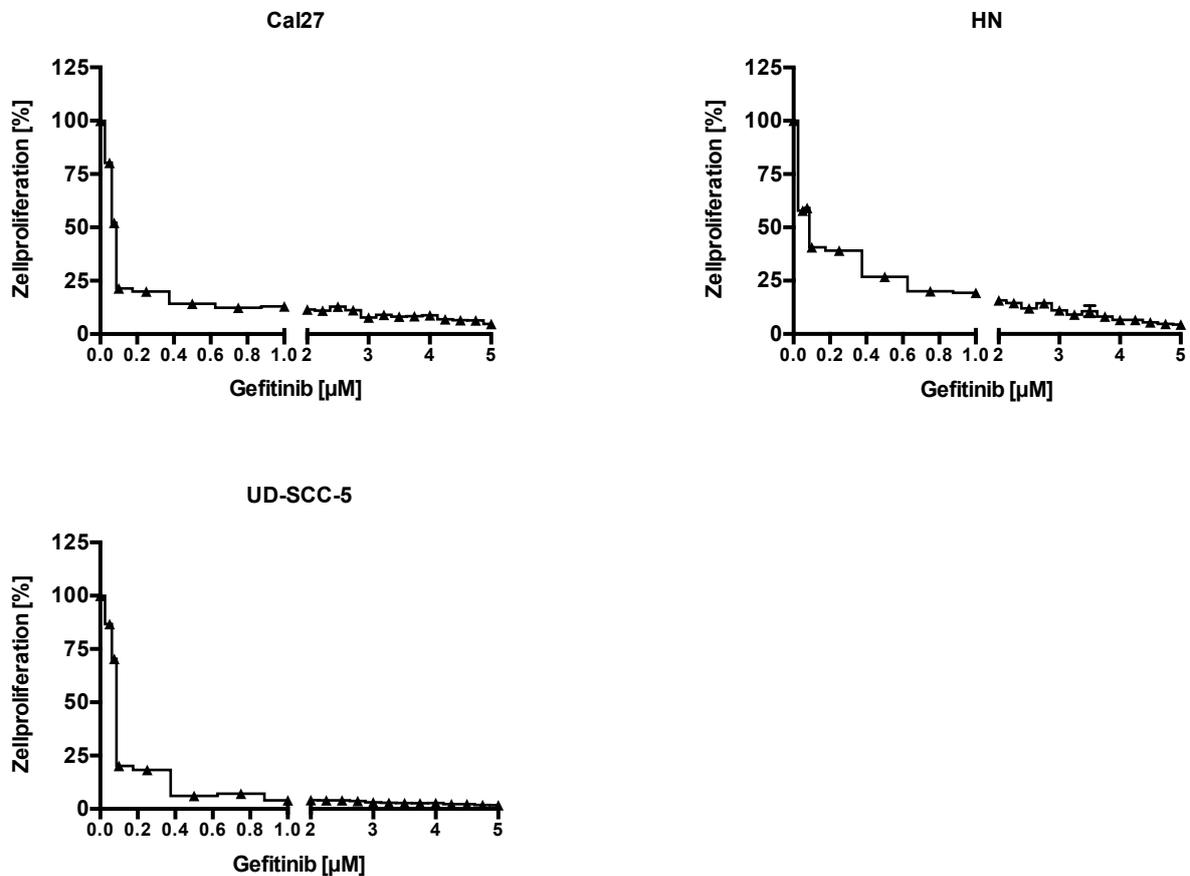


Abbildung 11: Einfluss von Gefitinib auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5

5.2.3.3 Einfluss von Cetuximab auf die Proliferation der Zelllinien

Der Antikörper Cetuximab präsentiert bei allen drei Zelllinien unregelmäßige Ergebnisse. Bei Cal27 erreicht Cetuximab lediglich einen mäßigen Effekt auf die Proliferation. Zwischen dem Dosisbereich von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ zeigt der Antikörper eine Reduktion von 10% bis maximal 20%.

Auch bei HN kann Cetuximab keine signifikanten Effekte verzeichnen. Die Proliferation bewegt sich bei allen Konzentrationen lediglich zwischen 50% und 60%. Dieselbe Beobachtung wie bei den vorher genannten Zelllinien kann auch bei UD-SCC-5 gemacht werden. Der Antikörper Cetuximab zeigt bei den angewendeten

Konzentrationen ebenfalls keinen einschlagenden Effekt auf die Proliferation der Zellen. Die Proliferationswerte schwanken zwischen 80% und 100%. Bei keiner der drei Zelllinien lässt sich also eine zunehmende Reduktion der Proliferation trotz steigender Antikörper-Konzentration feststellen.

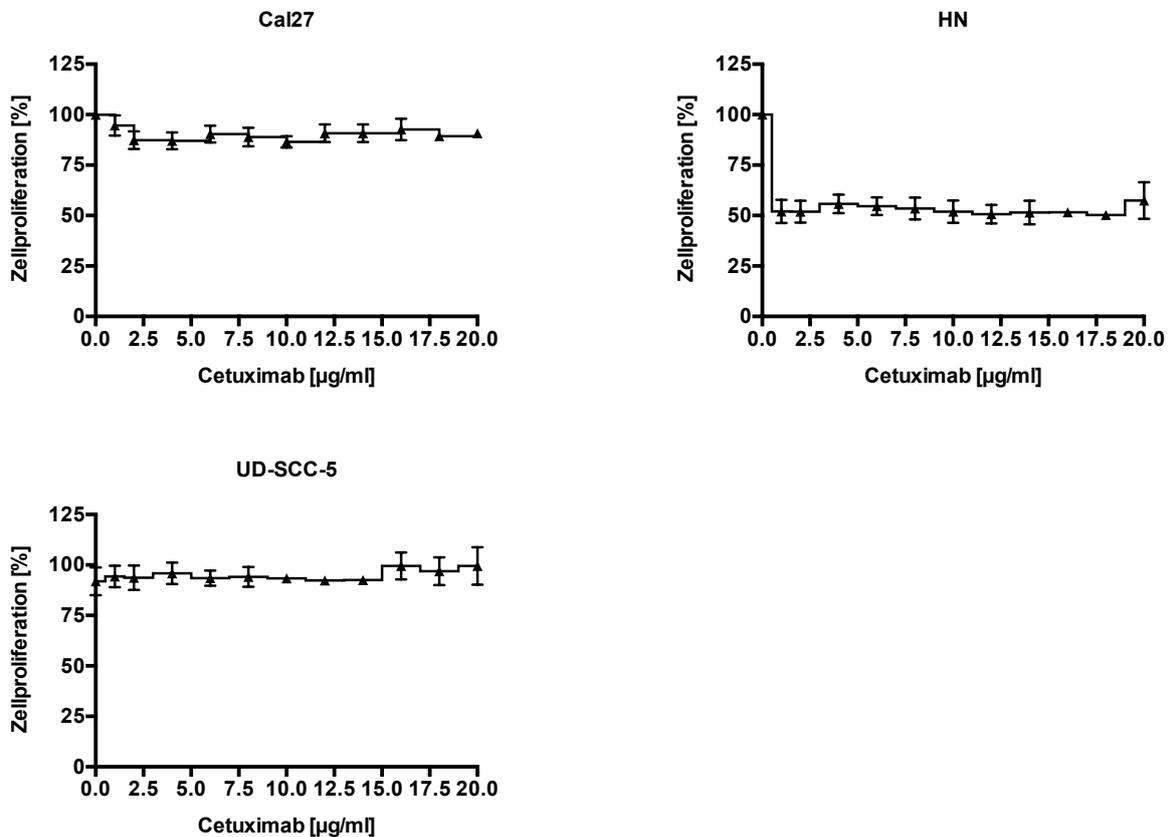


Abbildung 12: Einfluss von Cetuximab auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5

5.2.3.4 Einfluss der Kombinationsbehandlungen auf die Proliferation der Zelllinien

Bei den Kombinationsbehandlungen wurden die Zelllinien mit den in Tabelle 14 angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren behandelt. Diese Konzentrationen leiten sich aus den oben gezeigten Proliferationskinetiken ab. Simultan wurden die Zellen mit der therapeutischen Dosis von 2 Gray bestrahlt. In den folgenden Graphen werden die Effekte sowohl der Einzelbehandlungen mit AG1748, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray als auch der Kombinationsbehandlungen der EGFR wt und EGFR vIII Zelllinien veranschaulicht.

Die Zelllinie Cal27 wt zeigt signifikante Ergebnisse bei der Einzelbehandlung mit AG1478, der Kombinationstherapie und im Vergleich Einzel- versus Kombinationsbehandlung mit AG1478. Die Cal27 vIII dagegen zeigen nur bei der Kombinationstherapie AG1478 + 2 Gy im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein signifikantes Ergebnis, jedoch keinen additiven Effekt durch die Bestrahlung nach AG1478 Behandlung, wie aus Abbildung 13 abzulesen ist.

Der TKI Gefitinib hingegen bewirkt bei Cal27 wt eine deutliche Proliferationshemmung auf ca. 10% und ist damit als höchst signifikant einzustufen. Ebenfalls signifikant zeigt sich die Kombinationsbehandlung im Vergleich zu dem unbehandelten Wildtyp. Allerdings ist auch hier kein zusätzlicher Effekt nach einer Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Gefitinib nachzuweisen.

Der Antikörper Cetuximab weist signifikante Ergebnisse bei Cal27 wt auf. Die Einzeltherapie sowie die Kombinationstherapie erweisen sich als effektiv. Gegenüber den Cal27 vIII jedoch kann Cetuximab keine signifikanten Resultate erzielen.

Abbildung 14 veranschaulicht, wie HN wt nach Einzelbehandlung mit AG1478 und nach Kombinationsbehandlung signifikant reduziert proliferiert. Außerdem lässt sich ein additiver Effekt durch Bestrahlung nachweisen. HN vIII reagiert ebenfalls mit signifikant reduzierter Proliferation nach Einzel- und Kombinationsbehandlung. Ebenfalls deutlich zeigt sich der additive Effekt der doppelten Inhibition.

Die Hemmung mit dem TKI Gefitinib gegenüber den Zelllinien HN wt und HN vIII weist ebenfalls höchst signifikante Ergebnisse auf. Die simultane Behandlung präsentiert sich hier als effektiv und präsentiert einen kombinatorischen Effekt. Anzumerken ist, dass die Behandlungen mit dem TKI Gefitinib jeweils eine deutliche Proliferationsreduktion auf unter 50% zeigen.

Durch Cetuximab wird das Proliferationsverhalten bei HN wt und HN vIII deutlich reduziert. Damit bewirken Bestrahlung und Inhibition als Einzeltherapien bei den HN vIII ähnliche Effekte. Ein kombinatorischer Effekt ist bei den Zelllinien nachzuweisen.

Hinsichtlich der Zellproliferation zeigt sich die Zelllinie UD-SCC-5 wt nach AG1478-Behandlung nicht sensibel, lediglich nach 2 Gray reduziert sich das proliferative

Verhalten signifikant, wohingegen die UD-SCC-5 durch die Inhibition des TKI AG1478 und die simultane Therapie ebenfalls eine signifikant reduzierte Proliferation aufweisen. Eine Therapie mit AG1478 plus zusätzlicher Bestrahlung zeigt keinen additiven Effekt.

Gefitinib reduziert das Proliferationsverhalten sowohl bei UD-SCC-5 wt, als auch bei den UD-SCC-5 vIII um mehr als die Hälfte und damit signifikant, so wie die doppelte Inhibition. Ein kombinatorischer Einfluss ist jedoch auch hier nicht festzustellen.

UD-SCC-5 wt und UD-SCC-5 vIII reagieren auf eine Cetuximab-Therapie, indem UD-SCC-5 wt um ca. 25% weniger proliferiert. UD-SCC-5 wt zeigt nach der Kombinationsbehandlung eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den Monotherapien. Auf die transgenen Zellen haben die Mono- und Kombinationstherapien einen größeren Einfluss und zeigen einen additiven Effekt. Abbildung 15 veranschaulicht die Ergebnisse der Zelllinie UD-SCC-5.

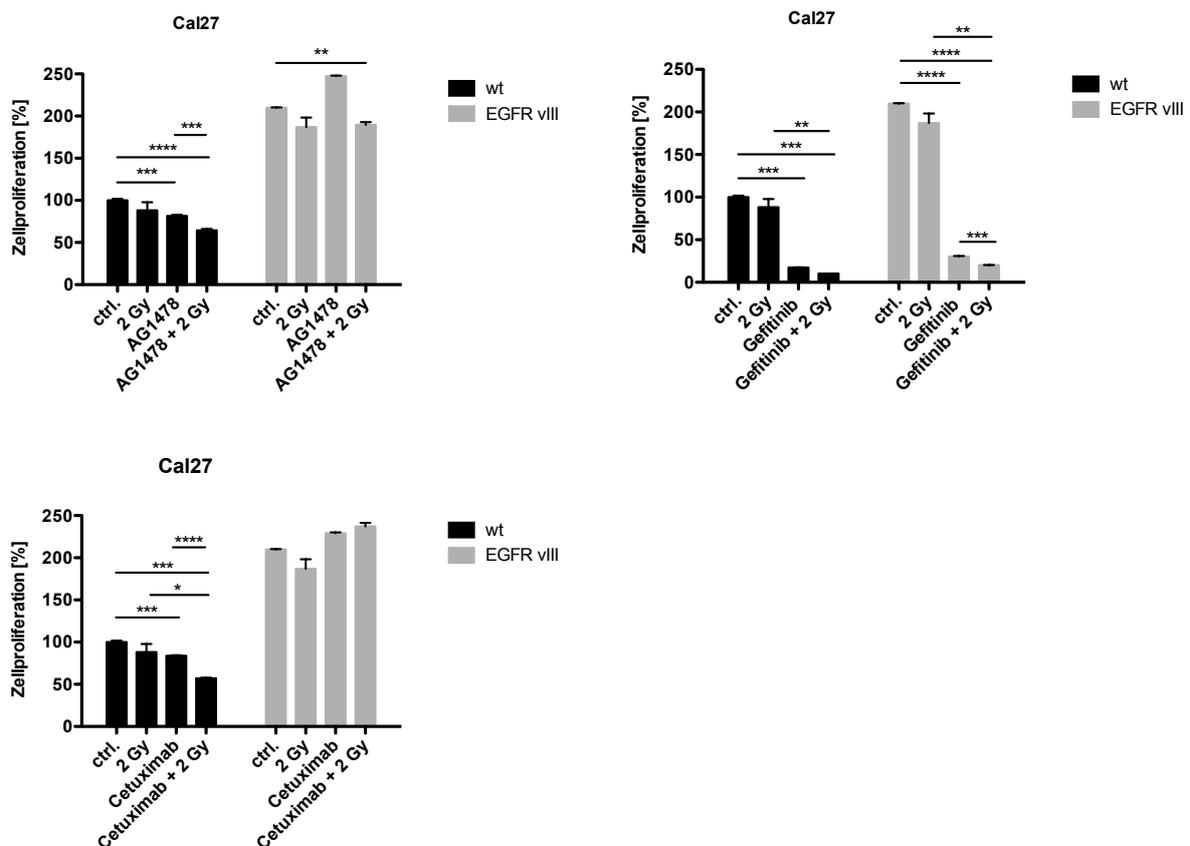


Abbildung 13: Einfluss der Einzelbehandlungen und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das Proliferationsverhalten der Cal27-Zelllinien

	Cal27 wt	Cal27 vIII
2 Gy	ns	ns
AG1478	p = 0,0006 (***)	ns
AG1478 + 2Gy	p < 0,0001 (****)	p = 0,0076 (**)
AG1478 vs. AG1478 + 2 Gy	p = 0,0007 (***)	ns

	Cal27 wt	Cal27 vIII
2 Gy	ns	ns
Gefitinib	p = 0,0001 (***)	p < 0.0001 (****)
Gefitinib + 2Gy	p = 0,0001 (***)	p < 0.0001 (****)
2 Gy vs. Gefitinib + 2 Gy	p = 0,0051 (**)	p = 0,0015 (**)
Gefitinib vs. Gefitinib + 2Gy	ns	p = 0.0001 (***)

	Cal27 wt	Cal27 vIII
Cetuximab	p = 0,0008 (***)	ns
Cetuximab + 2Gy	p = 0,0001(***)	ns
2 Gy vs. Cetuximab + 2 Gy	p = 0,0303 (*)	ns
Cetuximab vs. Cetuximab + 2 Gy	p < 0.0001 (****)	ns

Tabelle 36: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das Proliferationsverhalten von Cal27 wt und Cal27 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von Cal27 wt und Cal27 vIII.

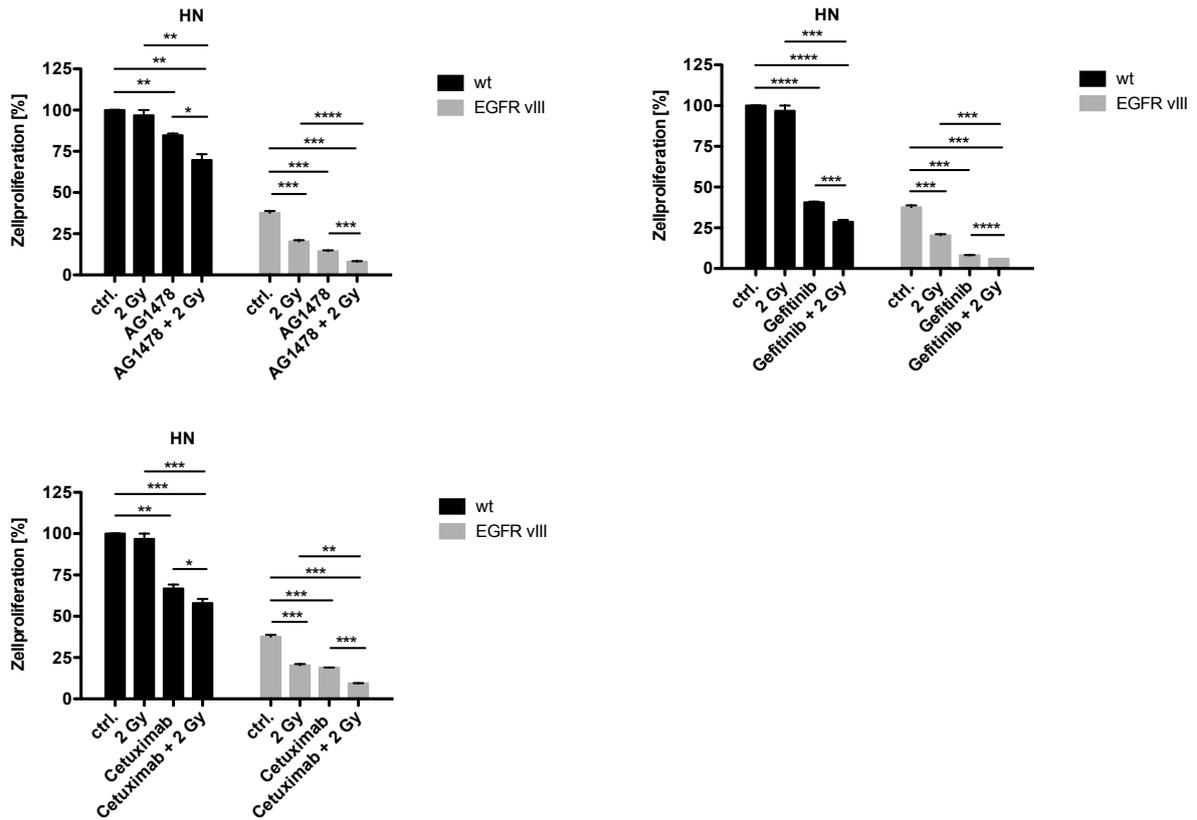


Abbildung 14: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das Proliferationsverhalten der HN-Zelllinien

	HN wt	HN vIII
2 Gy	ns	p = 0,0002 (***)
AG1478	p = 0,0018 (**)	p = 0,0001 (***)
AG1478 + 2Gy	p = 0,0044 (**)	p = 0,0006 (***)
AG1478 vs. AG1478 + 2 Gy	p = 0,0195 (*)	p = 0,0004 (***)
2 Gy vs. AG1478 + 2 Gy	p = 0,0022 (**)	p < 0,0001 (****)

	HN wt	HN vIII
2 Gy	ns	p = 0,0002 (***)
Gefitinib	p < 0,0001 (****)	p = 0.0005 (***)
Gefitinib + 2Gy	p < 0,0001 (****)	p = 0.0005 (***)
Gefitinib vs. Gefitinib + 2 Gy	p = 0,0009 (***)	p < 0,0001 (****)
2 Gy vs. Gefitinib + 2 Gy	p = 0,0002 (***)	p = 0,0007 (***)

	HN wt	HN vIII
2 Gy	ns	p = 0,0002 (***)
Cetuximab	p = 0,0011 (**)	p = 0,0001 (***)
Cetuximab + 2Gy	p = 0,0001 (***)	p = 0,0006 (***)
2 Gy vs. Cetuximab + 2 Gy	p = 0,0005 (***)	p = 0,0010 (**)
Cetuximab vs. Cetuximab + 2 Gy	p = 0.0219 (*)	p = 0,0001 (***)

Tabelle 37: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das Proliferationsverhalten von HN wt und HN vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von HN wt und HN vIII.

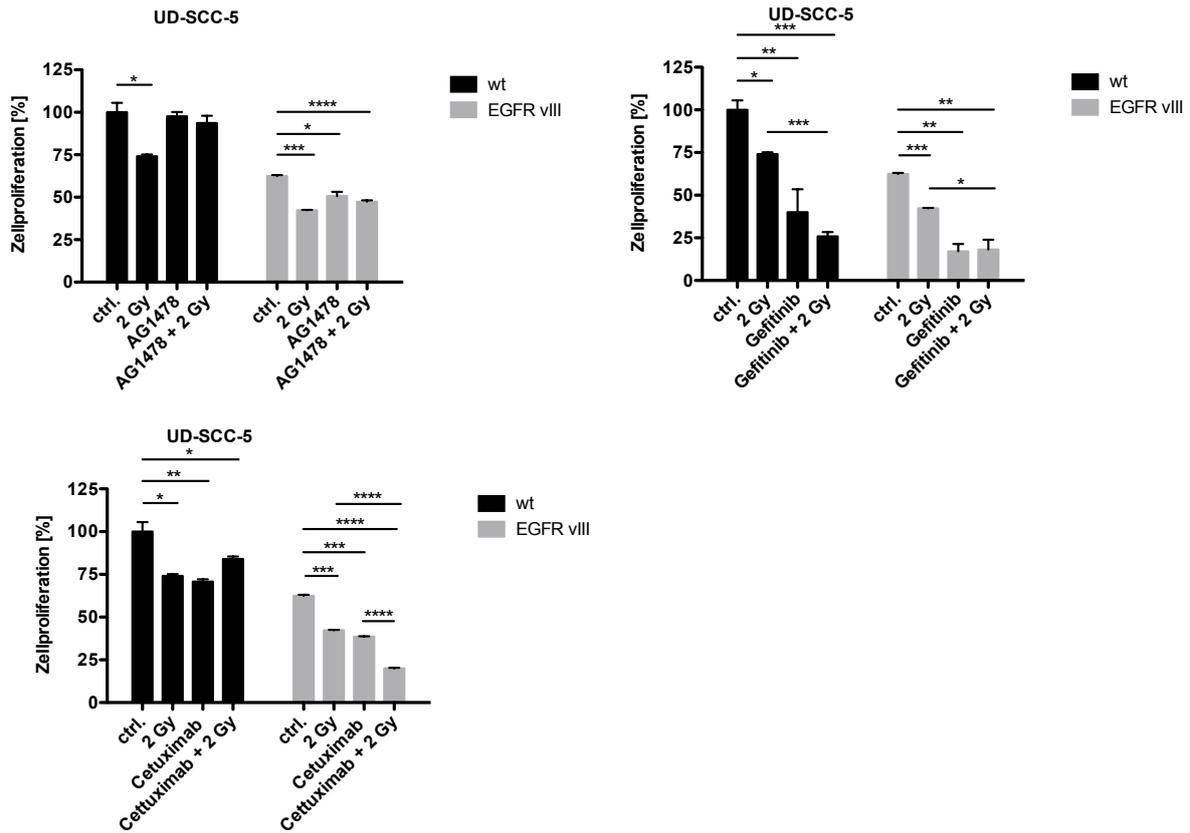


Abbildung 15: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das Proliferationsverhalten der UD-SCC-5-Zelllinien

	UD-SCC-5 wt	UD-SCC-5 vIII
2 Gy	p = 0,0128 (*)	p = 0,0001 (***)
AG1478	ns	p = 0,0153 (*)
AG1478 + 2Gy	ns	p < 0,0001 (****)

	UD-SCC-5 wt	UD-SCC-5 vIII
2 Gy	p = 0,0128 (*)	p = 0,0001 (***)
Gefitinib	p = 0,0083 (**)	p = 0.0030 (**)
Gefitinib + 2Gy	p = 0,0004 (***)	p = 0.0056 (**)
2 Gy vs. Gefitinib + 2 Gy	p = 0,0002 (***)	p = 0,0181 (*)

	UD-SCC-5 wt	UD-SCC-5 vIII
2 Gy	p = 0,0128 (*)	p = 0,0001 (***)
Cetuximab	p = 0,0088 (**)	p = 0,0001 (***)
Cetuximab + 2Gy	p = 0,0324 (*)	p < 0,0001 (****)
2 Gy vs. Cetuximab + 2 Gy	ns	p < 0,0001 (****)
Cetuximab vs. Cetuximab + 2 Gy	ns	p < 0,0001 (****)

Tabelle 38: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das klonogene Überleben von UD-SCC-5 wt und UD-SCC-5 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von UD-SCC-5 wt und UD-SCC-5 vIII.

5.3 Colony-Formation-Assay

Der Colony-Formation-Assay ist ein Verfahren, um das klonogene Überleben der Zelllinien über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Besonderes Augenmerk lag in dieser Arbeit auf dem Effekt der Bestrahlung mit der therapeutischen Dosis von 2 Gray und der Behandlung mit Inhibitoren bzw. Antikörper.

Grundsätzlich bilden die unbehandelten Zellen Cal27 vIII mehr Kolonien aus als Cal27 wt. Auf Bestrahlung mit 2 Gray reagiert Cal27 wt mit einer deutlich reduzierten Überlebensrate von 50%. Cal27 vIII dagegen wird durch Bestrahlung in ihrem klonogenen Überleben kaum beeinflusst. Die Therapie mit AG1478 präsentiert einen geringeren hemmenden Einfluss als die Bestrahlung. Die Kombinationsbehandlung bewirkt bei Cal27 vIII lediglich einen geringen zusätzlichen Effekt, wie Abbildung 16 veranschaulicht.

Durch Gefitinib wird das klonogene Überleben derselben Zelllinie sowohl bei Cal27 wt als auch bei Cal27 vIII signifikant gehemmt. Ein additiver Effekt der beiden Behandlungen wird hier jedoch nur bei Cal27 wt erreicht.

Die Cetuximab-Therapie zeigt im Vergleich die geringste Inhibition der Überlebensrate. Die kombinierte Therapie hat hier keinen Einfluss auf das Überleben der Wildtypzellen.

Abbildung 17 veranschaulicht alle Kombinationsbehandlungen der Zelllinien HN. Nach 2 Gray Bestrahlung reagiert HN vIII mit einer reduzierteren Überlebensrate als HN wt. AG1478 bewirkt kaum eine Hemmung des Überlebens. Bestrahlung und Inhibitor kombiniert bewirken nur bei HN wt einen zusätzlichen Effekt.

Der TKI Gefitinib inhibiert wie bei den Zelllinien HN das Überleben deutlich. Die Kombinationstherapie kann bezüglich der Überlebensrate keinen zusätzlichen Effekt erreichen.

Der Antikörper Cetuximab hemmt das Überleben der Zellen kaum. Die Therapie der kombinierten Inhibition erweist sich bei HN wt zwar als effektiv, jedoch kann kein kombinatorischer Effekt nachgewiesen werden.

Die UD-SCC-5 Zelllinien präsentieren sich in Abbildung 18 als strahlenresistent. Eine signifikante Hemmung der Überlebensrate durch AG1478 kann nicht erzielt werden. Die Kombinationsbehandlung wirkt nicht zusätzlich inhibierend.

Die TKI Gefitinib erreicht eine signifikante Reduktion der Überlebensrate von UD-SCC-5 wt. Die Bestrahlung mit kombinierter Inhibition erreicht keinen zusätzlichen Effekt.

Sowohl bei der Monotherapie mit Cetuximab als auch bei der Kombinationstherapie kann ein gesteigertes Überleben bei UD-SCC-5 vIII beobachtet werden.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass AG1478 in den in den meisten Fällen wenig Einfluss auf das klonogene Überleben demonstriert. Dagegen erweist sich Gefitinib als effektiver Inhibitor. Die Kombinationsbehandlungen bewirken zum Großteil keinen zusätzlichen Effekt.

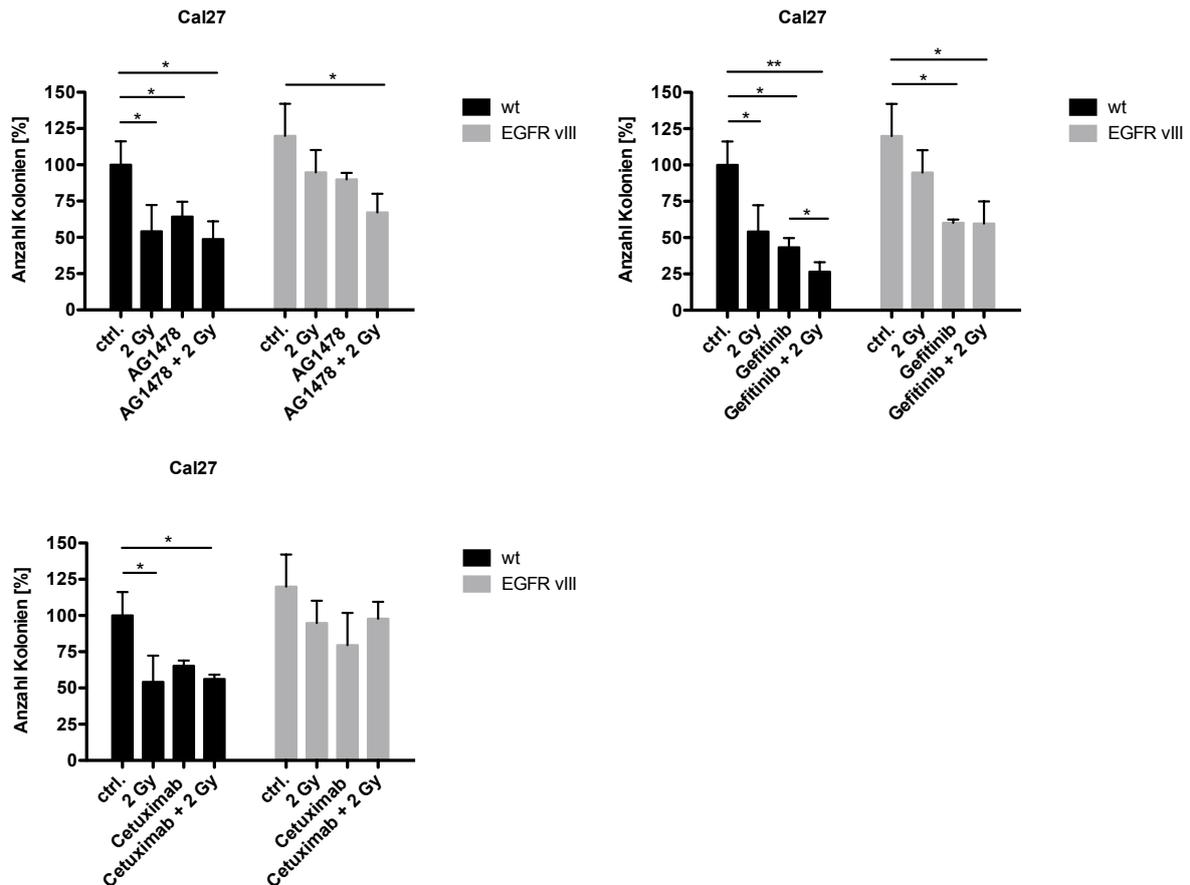


Abbildung 16: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das klonogene Überleben der Cal27-Zelllinien

	Cal27 wt	Cal27 vIII
2 Gy	p = 0,0469 (*)	ns
AG1478	p = 0,0482 (*)	ns
AG1478 + 2Gy	p = 0,0222 (*)	p = 0,0377 (*)

	Cal27 wt	Cal27 vIII
2 Gy	p = 0,0469 (*)	ns
Gefitinib	p = 0,0300 (*)	p = 0.0434 (*)
Gefitinib + 2Gy	p = 0,0082 (**)	p = 0.0303 (*)
Gefitinib vs. Gefitinib + 2 Gy	p = 0,0322 (*)	ns

	Cal27 wt	Cal27 vIII
2 Gy	p = 0,0469 (*)	ns
Cetuximab	ns	ns
Cetuximab + 2Gy	p = 0,0441 (*)	ns

Tabelle 39: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das klonogene Überleben von Cal27 wt und Cal27 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von Cal27 wt und Cal27 vIII.

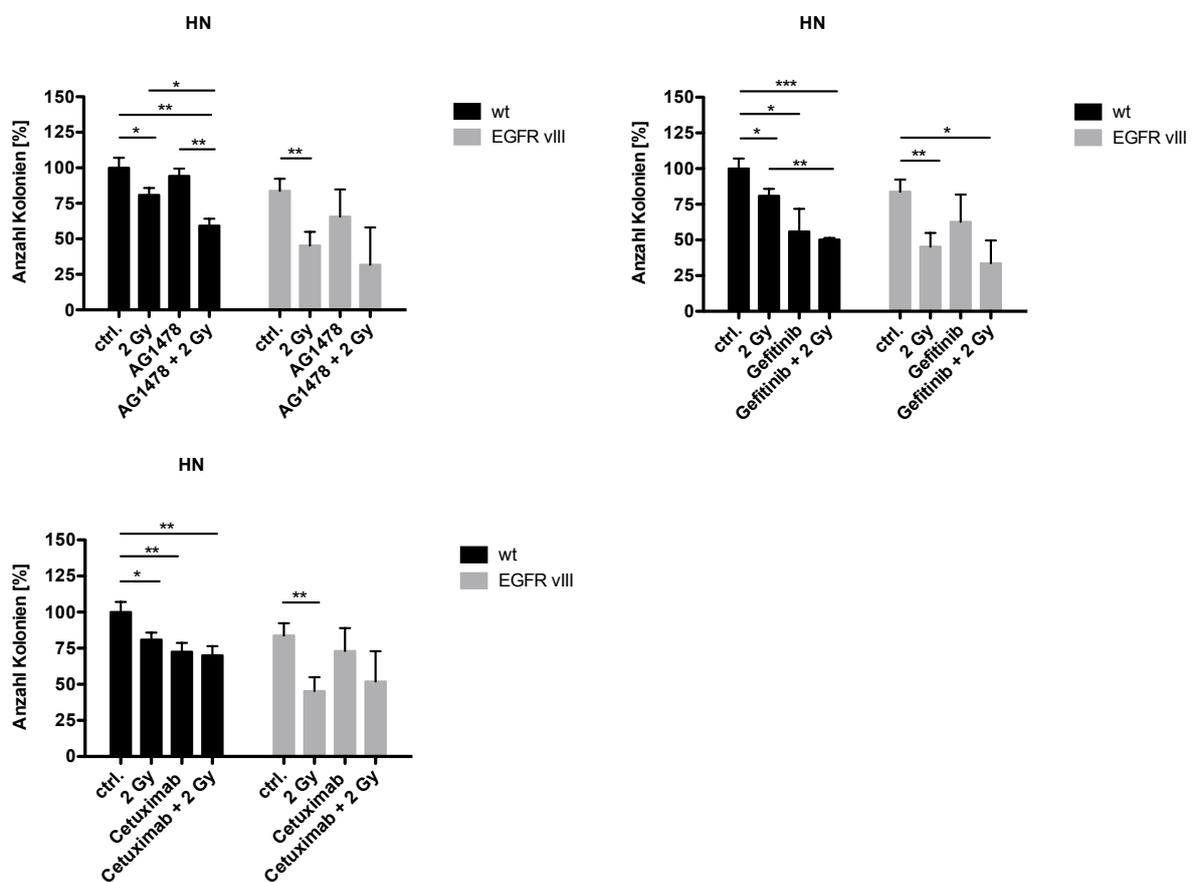


Abbildung 17: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von Ag1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das klonogene Überleben der HN-Zelllinien

	HN wt	HN vIII
2 Gy	p = 0,0309 (*)	p = 0,007 (**)
AG1478 + 2Gy	p = 0,0038 (**)	ns
AG1478 vs. AG1478 + 2 Gy	p = 0,0032 (**)	ns
2 Gy vs. AG1478 + 2 Gy	p = 0,0118 (*)	ns

	HN wt	HN vIII
2 Gy	p = 0,0309 (*)	p = 0,007 (**)
Gefitinib	p = 0,0483 (*)	ns
Gefitinib + 2Gy	p = 0,0003 (***)	p = 0,0174 (*)
2 Gy vs. Gefitinib + 2 Gy	p = 0,0085 (**)	ns

	HN wt	HN vIII
2 Gy	p = 0,0309 (*)	p = 0,007 (**)
Cetuximab	p = 0,0075 (**)	ns
Cetuximab + 2Gy	p = 0,0057 (**)	ns

Tabelle 40: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das klonogene Überleben von HN wt und HN vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von HN wt und HN vIII.

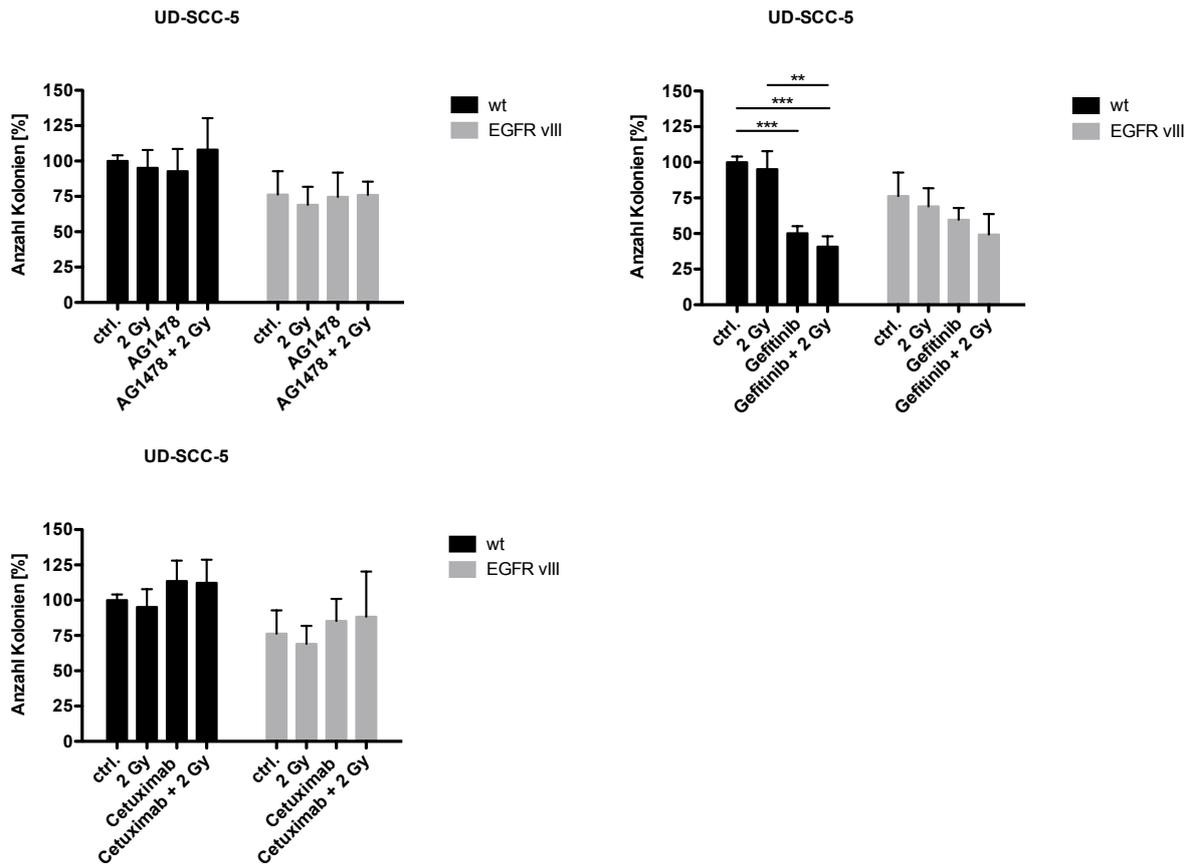


Abbildung 18: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das klonogene Überleben der UD-SCC-5-Zelllinien

	UD-SCC-5 wt	UD-SCC-5 vIII
2 Gy	ns	ns
Gefitinib	$p = 0,0009$ (***)	ns
Gefitinib + 2Gy	$p = 0,0009$ (***)	ns
2 Gy vs. Gefitinib + 2 Gy	$p = 0,0074$ (**)	ns

Tabelle 41: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von Gefitinib auf das klonogene Überleben der UD-SCC-5 wt und UD-SCC-5 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von UD-SCC5 wt und UD-SCC-5-vIII.

5.4 Scratch-Migrations-Assay

Mit Hilfe des Scratch-Migrations-Assay wurde das Migrationsverhalten der Zellen dargestellt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Untersuchung der Kombinationsbehandlungen.

Die unten dargestellten Graphen in Abbildung 19 zeigen das Migrationsverhalten der Wildtypzellen und der vIII-Variante 5 Stunden nach stattgefundenener Kombinationsbehandlung. Exemplarisch wurde für diesen Versuch die Zelllinie Cal 27 herausgegriffen, da sich diese Zellen aufgrund ihres Wachstumsverhaltens am besten geeignet für den Scratch-Migrations-Assay erwiesen.

Nach 5 Stunden Migrationszeit kann sowohl bei den wt als auch bei den vIII transgenen Zellen eine signifikante Tendenz zur strahleninduzierten Migration festgestellt werden.

Diese Migration kann aber in beiden Fällen nach kombinierter Behandlung eingedämmt werden. Hier zeigt sich durchgehend ein signifikanter Rückgang der Migration nach simultaner Inhibition im Gegensatz zur alleinigen Bestrahlung mit 2 Gray.

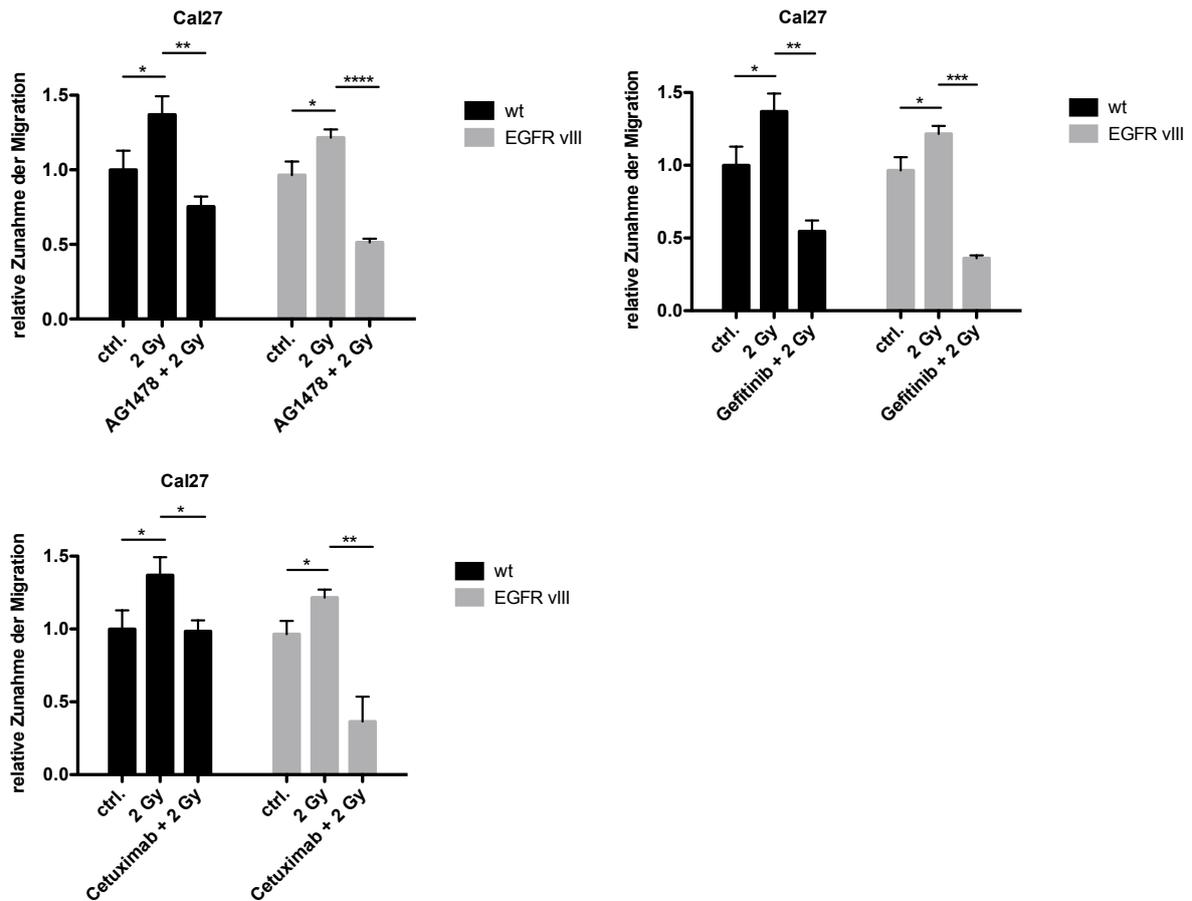


Abbildung 19: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf die Migration der Cal27-Zelllinien nach 5 Stunden

	Cal27 wt	Cal27 vIII
2 Gy	p = 0,0371 (*)	p = 0,0217 (*)
2 Gy vs. AG1478 + 2 Gy	p = 0,0048 (**)	p < 0,0001 (****)

	Cal27 wt	Cal27 vIII
2 Gy	p = 0,0371 (*)	p = 0,0217 (*)
2 Gy vs. Gefitinib + 2 Gy	p = 0,0015 (**)	p = 0,0004 (***)

	Cal27 wt	Cal27 vIII
2 Gy	p = 0,0371 (*)	p = 0,0217 (*)
2 Gy vs. Cetuximab + 2 Gy	p = 0,0192 (*)	p = 0,008 (**)

Tabelle 42: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf die Migration von Cal27 wt und Cal27 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von Cal27 wt und Cal27 vIII.

5.5 Biochemische Effekte: Western Blot Analysen

Die biochemischen Effekte der Bestrahlung, nach Zugabe der Inhibitoren, sowie der Kombinationstherapien wurden mit Hilfe von Western Blots analysiert und dargestellt. Analog zu den bisherigen Versuchen wurde eine Bestrahlungsdosis von 2 Gray und die bisherigen Dosen der Inhibitoren/AK (s. Tabelle 14) verwendet. In den folgenden Darstellungen werden die Western Blot Analysen exemplarisch der Zelllinie HN gezeigt.

Prinzipiell konnten anhand der Ergebnisse der Western Blot Analysen folgende Beobachtungen demonstriert werden: Erstens zeigen die nachgeschalteten Proteine des EGFR vIII grundsätzlich im direkten Vergleich zu EGFR wt sowohl ohne als auch mit Therapie stärker ausgeprägte Expressionsniveaus; zweitens zeigen die unbehandelten Kontrollen beider Rezeptoren eine deutliche Expression aller Proteine bis auf p-EGFR, der ein deutlich geringeres Expressionsniveau zeigt; drittens während EGFR wt nach Monotherapie mit der Herunterregulierung aller nachgeschalteten Proteine reagiert, konnte bei EGFR vIII die Nicht-Expression nur eines Proteins (p-EGFR) nach TK-Inhibition gezeigt werden.

Abbildung 20 zeigt die Ladekontrollen für alle Versuchsreihen mit Einzelbehandlung. Abbildung 21 demonstriert die Darstellung für die Versuchsreihen der Kombinationsbehandlungen. Tabelle 43 fasst die Effekte der Bestrahlung zusammen.

Die Ergebnisse der Einzelbehandlungen zusammengefasst demonstriert Tabelle 44.

Die Kombinationsbehandlungen, wie in Tabelle 45 zusammengefasst, inhibieren die Expression der Proteine von HN wt bis auf eine Ausnahme. Diese ist das Protein p-EGFR, das nach kombinierter Bestrahlung und Cetuximab-Therapie verstärkt exprimiert wird.

Die VIII-Variante reagiert nur zum Teil mit reduzierten Expressionsniveaus. Während sich der EGF-Rezeptor bei allen Behandlungen durch gleichbleibende Expression charakterisiert, stellt sich bei p-EGFR sowohl nach AG1478 + 2 Gray als auch nach der Kombination Gefitinib + 2 Gray mit deutlich erniedrigten Expressionsraten dar. Die deutlichste Reduktion des Expressionsniveaus zeigt sich bei p-EGFR.

Cetuximab zusammen mit ionisierender Strahlung präsentiert unterschiedliche Ergebnisse: p-EGFR reagiert mit sehr starken Expressionsraten, p-AKT exprimiert gleichbleibend und p-ER1/2 reduziert die Expression. Insgesamt werden also die Wildtypzellen mit genannter Ausnahme durchgehend durch die Kombinationsbehandlungen in ihrer Proteinexpression gehemmt. HN VIII demonstriert unregelmäßige Ergebnisse.

HN	wt ctrl	wt + 2 Gy	vIII Ø	vIII + 2 Gy
EGFR	+	↓	↑	↔
p-EGFR Tyr1068	-	↔	↑	↔
p-AKT Ser473	++	↓	↔	↔
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204	++	↔	↔	↔

Tabelle 43: Effekt der Bestrahlung auf die Proteinexpression der Zelllinien; Ø unbestrahlt, ++ stark exprimiert, + mäßig exprimiert, - schwach exprimiert; ↑ verstärkte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, ↔ gleichbleibendes Expressionsniveau im Vergleich zur Kontrolle, ↓ schwächere Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle

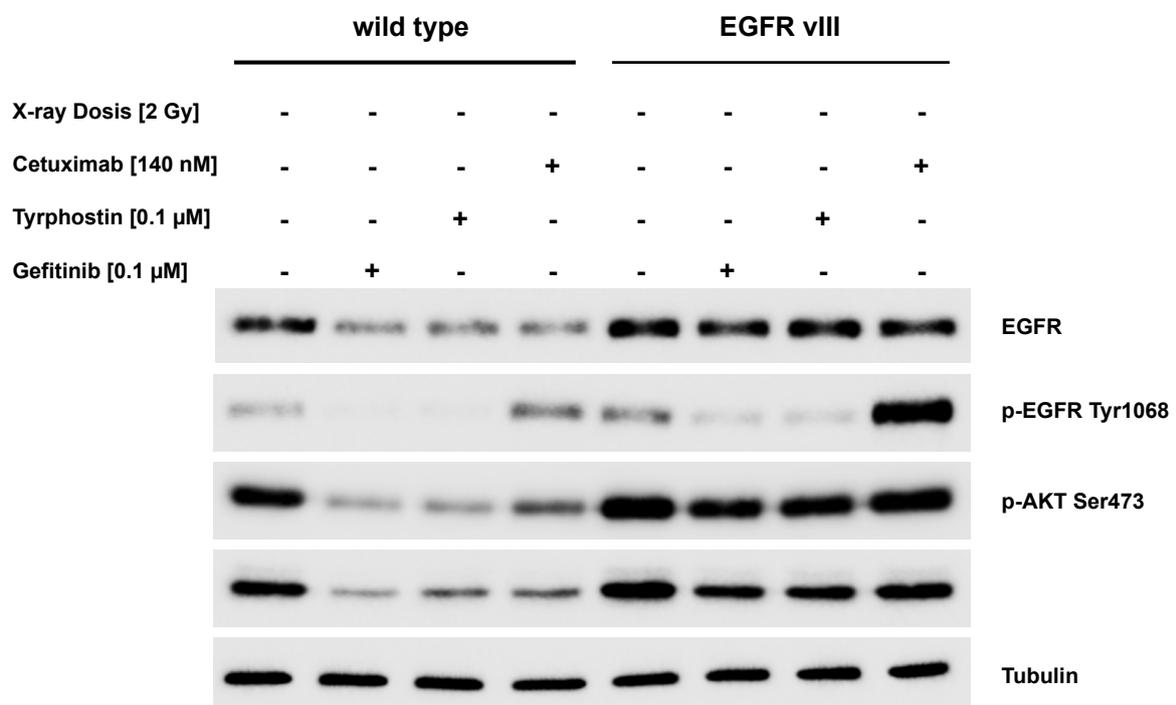


Abbildung 20: Western Blot Analysen der Einzelbehandlungen mit Tubulinladekontrollen; Größe der Proteine EGFR 170 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pERK1/2 42/44kDa

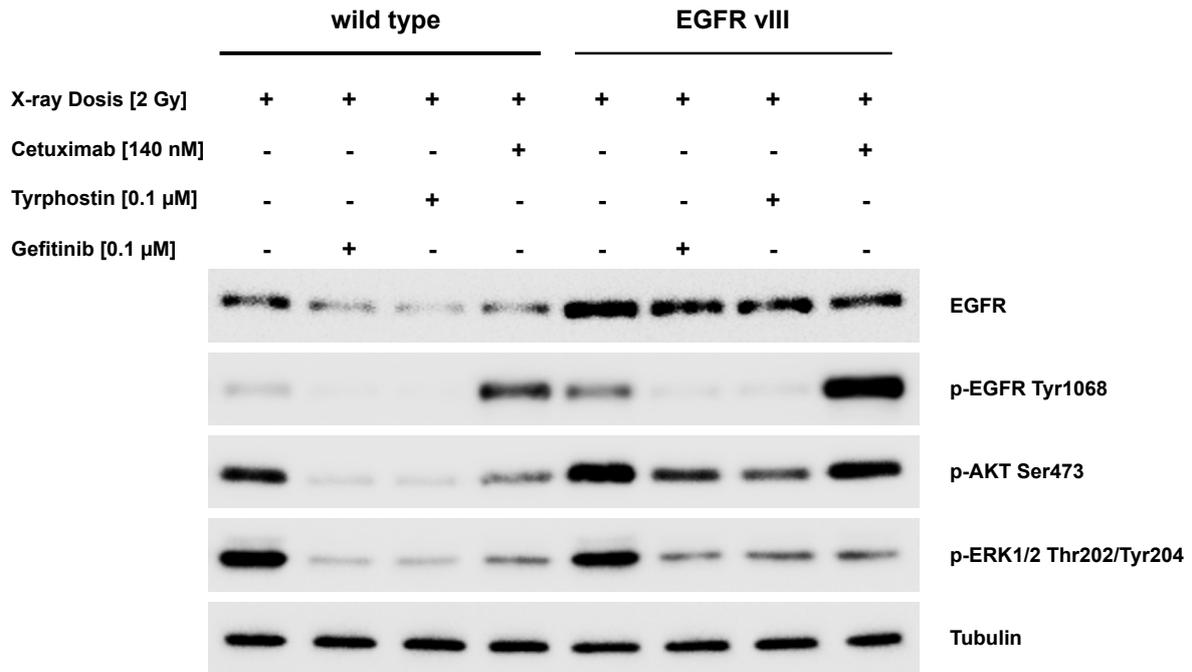


Abbildung 21: Western Blot Analysen der Kombinationsbehandlungen mit Tubulinladekontrollen; Größe der Proteine EGFR 170 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pERK1/2 42/44kDa

HN	wt + AG1478	wt + Gefi tinib	wt + Cetuximab	vIII + AG1478	vIII + Gefitinib	vIII + Cetuxi mab
EGFR	↓	↓	↓	↔	↔	↔
p-EGFR Tyr1068	↓	↓	↓	↓	↓	↑
p-AKT Ser473	↓	↓	↓	↔	↔	↔
p-ERK1/2 Thr202/Tyr2 04	↓	↓	↓	↔	↔	↔

Tabelle 44: Effekt der TKI- und Antikörper-Inhibition auf die Proteinexpression der Zelllinien; ∅ unbestrahlt, ++ stark exprimiert, + mäßig exprimiert, - schwach exprimiert;

↑ verstärkte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, ↔ gleichbleibendes Expressionsniveau im Vergleich zur Kontrolle, ↓ schwächere Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle

HN	wt + AG1478 + 2 Gy	wt + Gefitinib + 2 Gy	wt + Cetuximab + 2 Gy	vIII + AG1478 + 2 Gy	vIII + Gefitinib + 2 Gy	vIII + Cetuximab + 2 Gy
EGFR	↓	↓	↓	↔	↔	↔
p-EGFR Tyr1068	↓	↓	↑↑	↓	↓	↑↑
p-AKT Ser473	↓	↓	↓	↓, ↔	↓, ↔	↔
p- ERK1/2 Thr202/ Tyr204	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Tabelle 45: Effekt der Kombinationsbehandlungen auf die Proteinexpression der Zelllinien; ∅ unbestrahlt, ++ stark exprimiert, + mäßig exprimiert, - schwach exprimiert;

↑ verstärkte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, ↔ gleichbleibendes Expressionsniveau im Vergleich zur Kontrolle, ↓ schwächere Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle

6 Diskussion

6.1 Einfluss des EGF-Rezeptors und der VIII-Variante auf die Tumorbiologie bei HNSCC und deren aktuellen Therapiestandards

Seit 2013 steht das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches in den weltweiten Statistiken an sechster Stelle der häufigsten Krebsarten (Pickhard, Siegl et al., 2015). In Deutschland werden pro Jahr 500.000 Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches neu diagnostiziert. Davon sind die meisten mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet, das heißt bei mehr als der Hälfte aller betroffenen Patienten kann keine vollständige Heilung erreicht werden (Bose, Brockton et al., 2013). Diese Problematik erscheint in dem Zusammenhang der aktuell beschriebenen Resistenzmechanismen des EGF-Rezeptors gegen den monoklonalen Antikörper Cetuximab noch dramatischer (Markovic and Chung, 2012). Da die tumorspezifische EGFR VIII-Isoform hier eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Resistenzmechanismen zu spielen scheint, stellt diese Extrazellulärmutation des Wachstumsrezeptors EGFR einen wichtigen Marker in der aktuellen Wissenschaft für die onkologische Targettherapie dar (Goerner, Seiwert et al., 2010). Durch die biochemischen Eigenschaften der VIII-Mutation werden bei Expression der selbigen die tumorigenen Eigenschaften einer Krebsart verstärkt, in dem sie die mitogenen Eigenschaften, die anti-apoptotischen und pro-invasiven Signalwege aktivieren und aufrechterhalten (Gan, Kaye et al., 2009).

Um also in der Onkologie bessere Therapieerfolge erlangen zu können, müssen neue Biomarker für zielgerichtete Behandlungsstrategien identifiziert werden. Aufgrund ihrer Wirkungsweise könnte beispielsweise Gefitinib den umstrittenen Antikörper Cetuximab in der aktuellen Therapie ersetzen, indem dieser Tyrosinkinaseinhibitor sowohl den Wildtyp EGFR als auch die VIII-Variante zu inhibieren vermag. Vor genannten Hintergründen werden Tyrosinkinaseinhibitoren neben der operativen Entfernung, adjuvanter und definitiver Radiotherapie als vielversprechender Kandidat einer neuen Antitumorthherapie gehandelt.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Effektivität des Antikörpers Cetuximab mit und ohne zusätzliche Radiotherapie auf EGFR- und EGFR vIII-exprimierende HNSCC-Zellen im Vergleich zu zielgerichteten Substanzen, wie Tyrosinkinaseinhibitoren, zu analysieren. Schwerpunkte wurden hier in der Charakterisierung des Migrations- und Proliferationsverhalten der behandelten Zellen gelegt, sowie die Auswertung der Proteinexpression nach Einzel- und Kombinationstherapien.

6.2 Material- und Methodendiskussion

Im Folgenden sollen zunächst die verwendeten Therapeutika und anschließend die eingesetzten Methoden in ihrer Wirksamkeit und Anwendbarkeit kritisch beleuchtet werden.

Durch die nachgewiesene Überexpression in Tumorgewebe repräsentiert der EGFR ein vielversprechendes Target in der molekularen Tumorthherapie. Die Überexpression des EGFR oder dessen Aktivierung ließen sich spezifisch durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab herunter regulieren oder inhibieren. Wie eingangs beschrieben, hat Cetuximab an Wirksamkeit verloren. Mitunter ist der EGFR vIII für die rückläufigen Therapieerfolge von Cetuximab verantwortlich. Da sich diese resistente Isoform des EGF-Rezeptors durchzusetzen scheint, wird die Dringlichkeit der Identifikation gezielter Targets gegen den vIII-Rezeptor deutlich (Schmitz, Ang et al., 2014). Für die tumorspezifische Targettherapie stellt sich also der EGFR vIII als vielversprechendes Zielprotein dar. Hierbei könnte die Substanzklasse der Tyrosinkinaseinhibitoren in der Zukunft eine wichtige Rolle übernehmen (Pedersen, Meltorn et al., 2001).

Die beschriebenen Resistenzmechanismen lassen sich durch den molekularen Aufbau der beiden Rezeptoren begründen: Cetuximab ist auf die unveränderte Extrazellulärdomäne des EGFR als spezifisches Antigen angewiesen. Da sich die vIII-Isoform gegenüber des EGFR-Wildtyps durch das Fehlen der fast gesamten L1- und Zweidrittel der CR1-Domäne unterscheidet, erkennt Cetuximab diese strukturelle Veränderung nicht mehr als spezifisches Antigen an und kann so nicht mehr als

Antikörper wirken. Die Grundidee einer synchronen Hemmung des EGFR und der vIII-Mutation beruht demnach auf einer Identifikation eines neuen Angriffspunktes, die bei beiden Isoformen identisch vorliegt: Die intrazellulär gelegene ATP-Bindestelle. Tyrosinkinaseinhibitoren sind Moleküle, die intrazellulär die Tyrosinkinaseaktivität inhibieren und so das Potential der simultanen Blockade des EGFR und des EGFR vIII bieten, indem sie die ATP-Bindestelle blockieren und so die Autophosphorylation und die nachgeschaltete Aktivierung der Downstream-Signalwege hemmen. Gefitinib gehört dabei zu den bisher am besten erforschten TKI und wurde deshalb als TKI gewählt. AG1478 als ebenfalls im Routinealltag bekannter TKI diente dabei stets als Kontrolle gegenüber dem Einsatz von Gefitinib bei den ausgewählten Zelllinien, um etwaige äußere Störfaktoren bei der Durchführung der Experimente ausschließen zu können. Die Wirksamkeit beider TKI konnten im Rahmen der Vorversuche mit Hilfe der durchgeführten Kinetiken gezeigt werden. Bei allen Zelllinien hat das Überleben der Zellen mit Zunahme der Inhibitorkonzentration progredient abgenommen. Die unbehandelten Kontrollen verifizieren die alleinige Wirksamkeit der TKI in den Ergebnistabellen.

Cetuximab gehört zu den neueren Antikörpern, die in der aktuellen Standardtherapie vertreten sind. Cetuximab wird laut den heutigen Therapiestandards bei Tumorpatienten eingesetzt, bei denen eine operative Sanierung nicht möglich ist. In diesem Fall wird eine primäre kombinierte Radioimmuntherapie mit Cetuximab präferiert. Kommt dieser chimäre monoklonale Antikörper des IgG1 Isotyps zum Einsatz, richtet er sich spezifisch gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR. Cetuximab verhindert durch das Binden an die Extrazellulärdomäne des EGFR die Anlagerung endogener Liganden und inhibiert somit die Aktivierung des Rezeptors und die nachgeschalteten Signalwege. Laut mehreren Studien zeigt jedoch nur die Minderheit der Patienten mit rezidierten oder metastasierten Kopf-Hals-Tumoren, die mit monoklonalen AK behandelt wurden, eine signifikante Tumorregression. Zudem ist die Problematik der Entwicklung von Resistenzen zu

erwähnen, die sich bei so gut wie allen Patienten nach wenigen Monaten der Behandlung zeigt (Goerner, Seiwert et al., 2010; Schmitz, Ang et al., 2014).

Die Verwendbarkeit von Cetuximab ist durch den klinischen Einsatz demnach auch bei *in vitro* Versuchen hinlänglich bekannt und gut erforscht. Die Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers jedoch hat in der Forschungsgruppe und den unterschiedlichen Versuchsreihen und Versuchsleitern unzuverlässige Ergebnisse gezeigt. Auch das Wechseln des Herstellers hat zu keinen reproduzierbaren Resultaten geführt. Die Proliferation der einzelnen EGFR-Wildtypzelllinien unter dem Einfluss von Cetuximab präsentiert sich beispielsweise bei höheren Dosierungen stärker als bei deutlich niedrigeren Konzentrationen. Es lässt sich bei keiner der drei Zelllinien eine nachvollziehbare Proliferationskurve ausmachen. Die verlässliche Wirksamkeit von Cetuximab und deren Aussagekraft muss daher unter diesem Aspekt in allen nachfolgenden Versuchsreihen kritisch bewertet werden.

Über das klonogene Überleben der in den Experimenten verwendeten Zelllinien gibt der Colony-Formation-Assay Auskunft. 10 Tage nach Einzel- oder Kombinationsbehandlungen werden die gebildeten Kolonien angefärbt und dann manuell ausgezählt. So können die Effekte der zytotoxischen Behandlungen nachvollzogen und interpretiert werden. Da sich die Durchführung des Experiments an die Methode des Crystal-Violet ELISA Langzeitproliferations-Assay anlehnt, stellt der Colony-Formation-Assay eine gute Ergänzung dar, um das Zellverhalten unter einem weiteren Aspekt des klonogenen Überlebens zu beleuchten. Als nachteilig stellte sich jedoch heraus, dass bei diesem Versuch nicht die Größen der einzelnen Kolonien berücksichtigt werden konnte, sondern ausschließlich die Anzahl. Die Nichtberücksichtigung dieses Korrelates bedeutet, dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, wie sich die Klone nach entsprechender Therapiemodalität tatsächlich verhalten: Erfahren die überlebenden Klone einen zusätzlichen Proliferationsschub nach Behandlung oder verkleinert sich die Größe der Klone? Daher sollten während des Untersuchungsintervalls parallel Proliferationsanalysen angestellt werden, um das Verhalten der Zellklone umfassender charakterisieren zu

können. Ideal wäre die Anwendung einer Software, mit Hilfe derer neben der manuellen Auszählung außerdem der Durchmesser der einzelnen Klone gemessen werden kann. So könnte man innerhalb eines Versuchsansatzes das klonogene Überleben und das Proliferationsverhalten aufzeigen. Auch die nicht standardisierten Methoden bezüglich der manuellen Auszählung führen zu variablen Ergebnissen und korrelieren demnach kaum mit einem klinischen Outcome oder der Effizienz verwendeter Behandlungsmethoden (Powell, Kwee et al., 2016; Lumley, Burgess et al., 1997).

Der Scratch-Assay ist eine Methode zur Messung von Migration von Zellen *in vitro*. Der „Scratch“ als solches bezeichnet eine strichförmige Unterbrechung eines konfluenten Zellrasens, eines sogenannten Monolayers. Das Migrationsverhalten der Zellen wird dann visuell gemessen, indem nach fünf Stunden der progredient zuwachsende Scratch abfotografiert und dokumentiert wird. Die Methode erfüllt die Kriterien der Reliabilität und Validität. Die Objektivität dieses Experiments stellt jedoch einen Nachteil dar. Die sehr anspruchsvolle Durchführung erfordert genaue Kenntnisse des Versuchsablaufs, sowie ein manuelles Geschick des Versuchsleiters. Ohne diese Voraussetzungen sind die Ergebnisse dieser Methode nicht zuverlässig. Aufgrund der bisher nicht standardisierten Variablen ist demnach ein aussagekräftiger Vergleich unter den verschiedenen Ergebnissen in der Literatur nach wie vor schwierig (Jonkman, Cathcart et al., 2014). Der Versuch der Beurteilung von Migration nach einem Zeitintervall von lediglich fünf Stunden ist demnach nur mit gewissen Einschränkungen möglich und wird auf die wesentlichen Aussagen reduziert. Die Kernaussage bezüglich der Migration soll daher erst bei der Diskussion der Bestrahlung als Monotherapie und den Kombinationstherapien getroffen werden. Die Methode des Crystal-Violet ELISA Langzeit-Proliferations-Assays ist eine etablierte Methode, die die Kriterien der Objektivität, Validität und Reliabilität zuverlässig erfüllt. Äußere Störfaktoren sind außerdem leicht auszuschließen.

Der Western Blot ist ebenfalls ein etabliertes und routiniertes Verfahren, das eine weitere Aussage über biochemische Veränderungen auf der Ebene der Proteinexpression zulässt.

Die Bestrahlung als Therapiemodalität, die auch Anwendung in der klinischen Tumorthherapie findet, wurde nach ausreichender Konfluenz der Zellen mit 2 Gray durchgeführt. Anhand der durchgeführten Kinetiken und dem beispielhaften Verlauf der Proliferationskurven konnte der Einfluss von äußeren Störfaktoren weitestgehend ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe einer Transfektion konnten die exogenen Nukleinsäuren der vIII-Mutation in die einzelnen Zellen eingeschleust werden. Die Effizienz der Transfektion konnte im Anschluss mit einer Real-Time-PCR getestet werden und so den Erfolg des Verfahrens nachweisen.

6.3 Kritische Stimmen zur Existenz des EGFR vIII in verschiedenen Tumorgeweben und HNSCC

1990 wurde der EGFR vIII als tumorspezifische Extrazellulärmutation des EGF-Rezeptors zum ersten Mal in humanem Tumorgewebe nachgewiesen: In multiformen Glioblastomen (Zhang, Stiegler et al., 2010). In Glioblastomen wird der EGFR vIII als die am häufigsten vorkommende EGFR-Mutation benannt. In 25-64% der Fälle wird das Auftreten der EGFR vIII in Glioblastomen (GBM) beschrieben. Die Nachweise gelten als gesichert und reproduzierbar. Nach dem erfolgreichen Beweis der Existenz dieser Mutation in GBM wurde auch in anderen Tumorgeweben außerhalb des Nervensystems der Nachweis des EGFR vIII versucht. Die Ergebnisse über den Nachweis in anderen Malignomen werden kontrovers diskutiert, da das Kriterium der Reliabilität der verwendeten Methoden meist nicht hinreichend erfüllt werden konnte. Kritikpunkte ergaben sich hier bei der Verwendung nur einer einzigen Methode für den EGFR vIII-Nachweis oder Probleme bei der technischen Ausführung. Beispielsweise veröffentlichte Moscatello et al. den Nachweis des EGFR vIII in 75% der untersuchten Fälle in Ovariakarzinomen nur mit Hilfe von Western Blot Analysen

(Moscatello, Holgado-Madruga et al., 1995). Diese Ergebnisse konnten von anderen Forschungsgruppen, die verlässlichere und mehrere Nachweismethoden anwendeten, nicht reproduziert werden (Gan, Cvrljevic et al., 2013). Im Jahr 2002 konnte eine amerikanische Studie mit Hilfe von RT-PCR eine Inzidenz von 67,8% an EGFR vIII-mRNA Transskripten in primären humanem Brustkrebs nachweisen (Ge, Gong et al., 2002). Wildstrand et al. wiederum fand nur in 27% seiner Proben den Nachweis von EGFR vIII in Mammakarzinomen (Gan, Cvrljevic et al., 2013). Ähnliche Diskussionen werden bei Geweben des kolorektalen Karzinoms und des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms geführt (Gan, Cvrljevic et al., 2013). Auch in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches variieren die Zahlen der EGFR vIII-Expression zwischen 0 und 80%. Im Jahr 2014 hat dann Melchers et al. Untersuchungen zur Existenz des EGFR vIII in Kopf-Hals-Tumoren angestellt. Zum ersten Mal wurde hier das Vorgehen der doppelten Nachweismethode angewendet: Es wurden 531 HNSCC-Fälle zum einen durch immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper L8A4 und zum anderen durch RT-PCR mit auf FFPE optimierten Primern auf die Expression des EGFR vIII analysiert. Auf immunhistochemischer Ebene zeigten sich zwar 8% positiv für zytoplasmatische Färbungen, allerdings konnte keine Expression der EGFR vIII nach reverser Transskriptase-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen werden, sodass die 8% positiven Färbungen auf ein fehlerhaftes Protokoll zurückgeführt wurde, welches wohl auch in anderen Studien für die vermeintlich hohen Raten an detektierbaren EGFR vIII verantwortlich sein könnte. Somit wurde von Melchers et al. die Nicht-Existenz des EGFR vIII in HNSCC erklärt. Folglich kann laut dieser Studie die vIII-Variante nicht als klinischer Marker für die Effizienz der Tumorthherapie oder als Prognosemarker herangezogen werden (Melchers, Clausen et al., 2014).

Abschließend bleibt hier festzuhalten, dass die Existenz des EGFR vIII außerhalb des Nervengewebes bis heute kritisch diskutiert wird. Analog müssen EGFR vIII-spezifische Therapiestrategien oder kostenintensive Screeningverfahren nach EGFR vIII-Expression bei Krebspatienten kritisch hinterfragt werden.

6.4 *In vitro* Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der EGFR wt und EGFR vIII Zelllinien

Das *in vitro* Proliferationsverhalten der Zelllinien ohne Therapieeinfluss zeigt sich anders als erwartet. Zwar zeigt der Wildtyp einer jeder Zelllinie eine individuelle Proliferationsgeschwindigkeit und damit einen unterschiedlichen Anstieg der Proliferationskurve, jedoch weisen alle Zelllinien beim Vergleich zwischen den EGFR wt und EGFR vIII Zellen eine Gemeinsamkeit auf: Nach 72 h proliferieren die Zellen des EGFR vIII deutlich langsamer, als die des EGFR wt. Aufgrund der tumorigenen Eigenschaften, die den Zellen des EGFR vIII *in vivo* nachgewiesen wurden, nämlich verstärktes Tumorwachstum und reduzierte Apoptoseraten, wäre eine verstärkte Proliferationsrate zu erwarten gewesen (Pedersen, Meltorn et al., 2001; Nishikawa, Ji et al., 1994). Ähnliche *in vitro* Ergebnisse wurden auch in Japan erzielt. Die veröffentlichten Resultate zeigen bei EGFR vIII-veränderten Zellen kein verstärktes proliferatives Wachstum im Vergleich zu EGFR-Wildtypzellen *in vitro*. Trotz dieser Ergebnisse beeinflusst der EGFR vIII *in vivo* die Proliferationsrate deutlich positiv. Als Ursache für diese auseinanderweichenden Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Versuchen erwägte man zum einen bisher unbekannte Liganden, die *in vivo* die Proliferationsrate steuern könnten. Zum anderen herrschen andere Bedingungen *in vitro* als *in vivo*. *In vivo* wird das Zellmilieu häufig von Hypoxie beherrscht. Da der EGFR vIII wohl hauptsächlich am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und nicht wie der EGFR wt an der Plasmamembran, könnte auch nur die kleinste Veränderung des umgebenden Milieus der Rezeptoren an ihrem jeweiligen Liegeort die Tyrosinkinaseaktivität und so die Proliferation maßgebend beeinflussen. Damit ergeben sich natürlich *in vitro* andere Ergebnisse, als sie *in vivo* vorzufinden sind (Nagane, Coufal et al., 1996; Sugawa, Yamamoto et al., 1998).

Eine andere Erklärung wäre das unnatürliche Verhältnis an exprimiertem EGFR wt und EGFR vIII *in vitro*. Li et al. präsentiert hier ein neues Modell der vIII-Aktivierung und stellt die These auf, dass als Voraussetzung für die onkogene Aktivierung des EGFR vIII in Glioblastomen die Co-Expression des aktivierten EGFR wt gilt. Sowohl

der Dimerisationsarm als auch die Kinaseaktivität des Wildtyps sind für die Aktivierung des EGFR vIII notwendig. Der EGFR wt aktiviert den EGFR vIII also, indem er die EGFR vIII Dimerisation ermöglicht oder erleichtert. So konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes Expressionsniveau an EGFR wt zu einem deutlichen Anstieg der EGFR vIII Tyrosinkinasephosphorylation führt, wohingegen nicht aktivierte Wildtyprezeptoren die EGFR vIII Aktivierung wiederum inhibieren (Li, Chakraborty et al., 2014). Somit wäre dies ein weiterer möglicher Ansatz, das deutlich langsamere Proliferationsverhalten des EGFR vIII *in vitro* mit der geringeren Anzahl an vorliegendem aktivierten EGFR wt in den transfizierten Zelllinien zu erklären. Es bleibt also festzuhalten, dass es in der Literatur bereits verschiedene Erklärungsansätze dafür gibt, weshalb sich die Proliferationsraten des EGFR vIII *in vitro* anders präsentieren, als man es laut seiner beschriebenen Eigenschaften erwartet. Grundlegend scheinen hier die unterschiedlichen Milieus von *in vitro* Versuchen gegenüber *in vivo* Bedingungen ursächlich zu sein.

6.5 *In vitro* Charakterisierung der Wirkungseffizienz der Inhibition auf das Überleben von EGFR und EGFR vIII exprimierenden Zellen

Im Folgenden soll der Einfluss der einzelnen Inhibitoren auf das Verhalten der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5 diskutiert werden. Dabei wurden das proliferative und klonogene Überleben, sowie die Migration und die Proteinexpression analysiert.

Bezüglich der Proliferationsanalysen haben sich folgende Ergebnisse gezeigt. Die Überlegung der intrazellulären Inhibition mittels des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib, der sowohl den EGFR wt also auch den EGFR vIII gleichermaßen effektiv hemmen soll, hat sich bestätigt. Gefitinib hemmt die Proliferation bei allen Zelllinien effektiv und reduziert die Zellzahl weit unter 50%. Im Vergleich zu Cetuximab erweist sich Gefitinib gemäß den theoretischen Überlegungen als effektiv. In Glioblastomen konnten gleiche Ergebnisse erzielt werden. Carrasco-Garcia et al. zeigten 2011

ebenfalls die effektivere Inhibition der Proliferation von Glioblastomzellen durch TKI im Gegensatz zu Cetuximab (Carrasco-Garcia, Saceda et al., 2011). Auch Baselga und Arteaga fassen 2016 zusammen, dass Phase-I-Studien bei fortgeschrittenem NSCLC enorme Erfolge nach EGFR-Blockade durch TKI erlangten (Baselga and Arteaga, 2005). Gefitinib inhibiert in dieser Arbeit sogar effektiver als AG1478.

Cetuximab reduziert wie in Punkt 6.2 bereits erwähnt die Zellzahl unterschiedlich stark. Bei Cal27 vIII ist sogar ein Proliferationszuwachs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten. Die Erklärung für die Resultate liegt wohl in der bereits beschriebenen Problematik der veränderten Extrazellulärdomäne des vIII-Rezeptors. Die Tendenz der ineffektiven Inhibition lässt sich aber auch bei den unveränderten Wildtypzellen erkennen. Die ineffektive Blockade Cetuximabs sowohl bei EGFR wt als auch bei EGFR vIII konnte auch in Glioblastomen nachgewiesen werden (Carrasco-Garcia, Saceda et al., 2011). Demnach rechtfertigt die unregelmäßige Wirkung des extrazellulär angreifenden Antikörpers bei den unterschiedlichen Geweben laut dieser Ergebnisse nicht den Einsatz bei palliativen Behandlungsstrategien in Kopf-Hals-Tumoren in der Klinik.

Vergleichbare Ergebnisse wie der Crystal-Violet-Assay demonstrierte die Methode zur Ermittlung des klonogenen Überlebens. Gemäß den Erwartungen erreicht Gefitinib die deutlichste Reduktion des klonogenen Überlebens. Anzumerken ist hier jedoch, dass die Inhibition prozentual geringer ausfällt, verglichen mit den Zahlen der Proliferationsrate. Hier kann als Erklärung die in Punkt 6.2 genannte Problematik im Zusammenhang mit der Methode des Colony-Formation-Assays genannt werden, nämlich die Vernachlässigung der Größe der gebildeten Kolonien. Schließlich ist die Teilungsgeschwindigkeit der einzelnen Kolonien ein nicht zu vernachlässigender Faktor, der für das Wachstum eines Tumors ebenso entscheidend ist, wie die Bildung von Kolonien. Die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen könnte beispielsweise annäherungsweise mit Hilfe des Durchmessers der einzelnen Kolonien gemessen werden. Dieser Effekt wird bei der Auswertung dieser Methode nicht berücksichtigt. Auffallend ist nämlich, dass die Durchmesser der Kolonien nach Behandlung

abnehmen. Unter diesem Gesichtspunkt sind die Ergebnisse dieser Methode prinzipiell kritisch zu interpretieren und lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf ein klinisches Outcome oder den Effekt der Behandlungen zu (Powell, Kwee et al., 2016; Lumley, Burgess et al., 1997). Die Wirkung von Gefitinib ist also gewichtiger einzuschätzen, als es die Diagramme des Colony-Formation-Assays zeigen.

Exemplarisch für den Effekt der Behandlungen auf Proteinebene wurden die Zellen der Zelllinie HN ausgewählt. Die bestimmten Proteine sind EGFR, p-EGFR Tyr 1068, p-AKT Ser473 und p-ERK1/2 Thr202/Tyr204.

Anhand der Ergebnisse der Western Blot Analysen kann folgende Beobachtung demonstriert werden: Die nachgeschalteten Proteine des EGFR vIII zeigen im direkten Vergleich zu EGFR wt stärker ausgeprägte Expressionsniveaus, was wohl mit der konstitutiven, ligandenunabhängigen Aktivität und damit auch mit vermehrter Proteinexpression des EGFR vIII und seiner nachgeschalteten Proteine zu begründen ist.

Bei der Behandlung mit Gefitinib und AG1478 des EGFR wt lässt sich für p-EGFR bei EGFR wt und EGFR vIII kaum bis keine Expression mehr nachweisen. Dieses Protein wird demnach nach TK-Inhibition bei beiden Rezeptoren gleichermaßen herunterreguliert. Damit bestätigt sich anhand des Mechanismus das Potenzial der simultanen Inhibition von TKI von EGFR wt und EGFR vIII: TKI blockieren gleichermaßen kompetitiv die ATP-Bindedomäne des EGFR und hemmen damit dessen Aktivität und dessen Phosphorylation. Des Weiteren ist anzumerken, dass der nicht phosphorylierte EGFR bei dem EGFR vIII im Gegensatz zu EGFR wt nach Inhibition weiterhin exprimiert wird. Die bestehende Aktivität des nicht phosphorylierten EGFR bei der vIII-Variante lässt sich möglicherweise mit dem biochemischen Angriffspunkt der TKI begründen: Die TKI führen zu keiner Internalisierung des Rezeptors und somit auch zu keiner Reduktion der Proteinexpression desselbigen. Ein weiterer Unterschied zeigt sich bei p-AKT, welche im Gegensatz zu EGFR wt bei EGFR vIII nach TKI-Behandlung unverändert exprimiert wird. Hier wird in der Literatur ein möglicher Zusammenhang mit dem

Verlust von PTEN diskutiert, der über einen EGFR-unabhängigen Weg AKT aktiviert und so zu einer Resistenz gegenüber EGFR-Inhibition führt.

Bei der Monotherapie mit Cetuximab präsentiert sich bei EGFR vIII eine deutliche Expressionsbande. Die genannte Hyperphosphorylation von EGFR ist überraschend und unterscheidet sich deutlich von der Reaktion der Proteine nach TKI-Therapie. Theoretisch erfolgt nach Cetuximab-Behandlung eine ligandenabhängige Blockade des EGFR, demnach sollte der Rezeptor internalisiert werden und zu einer Down-Regulierung auf der Zelloberfläche und zur Inhibition der nachgeschalteten Kaskaden führen (Dutta and Maity, 2007). Pickhard et al. zeigte diese paradoxe Phosphorylation von EGFR nach Cetuximab-Behandlung ebenfalls (Pickhard, Siegl et al., 2015). Auch Mandic et al. beobachtete dieses Phänomen. Laut Literatur sollte Cetuximab nämlich erwartungsgemäß zu einer verringerten Phosphorylation führen, wenn man nach wie vor von einer Blockade der ligandenabhängigen Aktivierung (Phosphorylation) ausgeht. Andererseits erscheint dieser Mechanismus unter dem Aspekt nachvollziehbar, dass Cetuximab, als ursprünglich extrazellulär bindender Antikörper, unter bestimmten Umständen die Funktion von EGFR-Liganden, wie zum Beispiel EGF, imitieren und so eine verstärkte Aktivität induzieren kann (Mandic, Rodgarkia-Dara et al., 2006). Einen anderen Zusammenhang zwischen Cetuximab-Behandlung und verstärkter Phosphorylation des EGFR charakterisierte Molli et al. in Mammakarzinomen. Hier konnte ein Mechanismus einer verstärkten Interaktion von EGFR und Integrinen nach Cetuximab-Therapie nachgewiesen werden, die auf einer Korrelation zwischen einer verstärkten p-EGFR-Expressionsrate und einer erhöhten GTPase-Aktivität beruht und somit die Invasivität von Brustkrebszellen reduziert (Molli, Adam et al., 2008).

Die Zusammenschau der Ergebnisse aus den Einzelbehandlungen lässt die Schlussfolgerung zu, dass TKI einen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylation des EGFR haben, was eindeutig in Zusammenhang mit der gezielten Hemmung der Tyrosinkinase an der ATP-Bindedomäne steht. Im Vergleich zwischen den Wildtypzellen und der vIII-Mutation, ist EGFR vIII trotz Inhibition der EGFR

Phosphorylation in der Lage, Downstream-Moleküle weiterhin zu exprimieren. Interessant wäre die Analyse möglicher cross-links, die hier zur weiterführenden Signalkaskade führen.

Cetuximab Einzelbehandlung dagegen zeigt keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich einer Expressionsreduktion. Hier kann der deutlich angestiegene Aktivitätsstatus von pEGFR vor allem bei EGFR vIII festgehalten werden. Diese Beobachtung wäre eine denkbare Erklärung für die zum Teil sogar zunehmenden Proliferationsraten nach Cetuximab Monotherapie bei EGFR wt und EGFR vIII und bestätigt gleichzeitig die fehlende Wirkung bei EGFR vIII.

6.6 *In vitro* Charakterisierung der Wirkungseffizienz der Bestrahlung auf das Überleben von EGFR und EGFR vIII exprimierenden Zelllinien

Der Einfluss der Bestrahlung, die im Rahmen dieser Arbeit unter anderem als Monotherapie durchgeführt wurde, soll im Folgenden näher beschrieben werden. Als Bestrahlungsdosis wurde die therapeutische Dosis von 2 Gray ausgewählt. Augenmerk liegt hierbei wiederum auf dem Vergleich zwischen dem Wildtyp und der vIII-Variante.

Im Vergleich zu der Inhibition mit Gefitinib erreicht die Bestrahlung keine so deutlich erniedrigte Proliferationsrate. Gründe für eine Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung werden in der Literatur unter anderem damit diskutiert, dass der Strahlen- oder Cetuximab-induzierte Transport des EGFR in den Nucleus zur Entwicklung von Resistenzmechanismen beiträgt (Krause, Gurtner et al., 2009). Des Weiteren hat Chaachouay et al. veröffentlicht, dass bei strahlenresistenten Zelllinien eine durch ionisierende Strahlung induzierte Autophagie eine mögliche Ursache für die Entwicklung von Resistenzen darstellt. In Anlehnung an diese These, zeigte Schiefler et al. in der Zelllinie UD-SCC-5 den Zusammenhang zwischen einer strahlenabhängigen Induktion des S1P-5Rezeptors, der wiederum unter anderem für

Autophagie verantwortlich ist (Schiefler, Piontek et al., 2014; Chaachouay, Ohneseit et al., 2011).

Bezüglich des klonogenen Überlebens konnte auch bei den durchgeführten Kinetiken ein einschlagender Effekt erst bei höheren Bestrahlungsdosen als 2 Gray erreicht werden. Die Einzelbehandlung mit 2 Gray zeigt dennoch Wirksamkeit bei allen Zelllinien mit individuellen Unterschieden bei den einzelnen Tumorzellen: UD-SCC-5 erweist sich als das resistanteste Gewebe, Cal27 lässt sich in der Mitte einordnen, HN zeigt erneut die größten Effekte nach Radiatio. Diese Ergebnisse decken sich demnach mit denen der Proliferationsanalysen. Weiterhin präsentiert sich die Bestrahlung als effektive Monobehandlung, die vor allem bei EGFR wt zu deutlicher Reduktion des klonogenen Überlebens führt. EGFR vIII-transfizierte Zellen zeigen sich außer bei der Zelllinie HN als grundsätzlich strahlenresistenter im Vergleich zu den unveränderten Zellen des EGFR wt. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit der Literatur, in der EGFR vIII als eine eher strahlenresistente Mutation beschrieben wird (Chung, Zhang et al., 2011; Tang, Gong et al., 2000).

Wie bereits in Punkt 6.2 erwähnt, können die Effekte des Scratch-Assays nur andeutungsweise interpretiert werden. Dennoch ließ sich bei der Zelllinie Cal27 bereits nach 5h bei EGFR wt eine strahleninduzierte Migration erkennen, die bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte. Bei diesen Studien wird der Zusammenhang zwischen der strahleninduzierten Inaktivierung von GSK3 β und dem analogen Abbau von β -Catenin aufgezeigt, das wiederum in einer verstärkten Zellmotilität und Zellmigration resultiert (Schuettler, Piontek et al., 2015). Nach Behandlung mit 2 Gray zeigt EGFR vIII jedoch im Vergleich zu EGFR wt zumindest nach 5h keine Migration. Ob dies jedoch auf eine reduziertere Migration des EGFR vIII nach Bestrahlung schließen lässt, ist unwahrscheinlich, da eine vermehrte Metastasierung der Mutation bereits mehrmals nachgewiesen werden konnte (Tang, Gong et al., 2000; Schmitz, Ang et al., 2014). Eine mögliche Erklärung wäre allerdings auch die in Gegenüberstellung zu EGFR wt verlangsamte Proliferation der Zellen des EGFR vIII und die damit geringere Anzahl an potenziell migrierenden

Zellen. Weitere Untersuchungen, die eine eventuell verzögerte Migration des EGFR vIII über einen längeren Zeitraum hin analysieren, wären in diesem Zusammenhang interessant. Schließlich kann festgehalten werden, dass bereits mehrere Studien auf eine strahleninduzierte Migration hinweisen, die vermehrt Metastasen und Lokalrezidive in HNSCC induzieren kann (Schuettler, Piontek et al., 2015). Diese verstärkte Migration bestrahlter Tumorzellen konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bereits nach 5 Stunden andeutungsweise aufgezeigt werden.

Auf Ebene der Proteinexpression zeigen sich sowohl bei EGFR wt und EGFR vIII unveränderte Expressionsniveaus. Es soll darauf hingewiesen werden, dass die Aktivitätsstatus von EGFR, p-AKT und p-ERK1/2 trotz Radiatio anhalten. Die Aktivität dieser Proteine nach Bestrahlung wurde auch im Zusammenhang mit der strahleninduzierten Migration gezeigt (Schuettler, Piontek et al., 2015). Weiterhin wird hier nochmals die weiter oben erwähnte Cetuximab-spezifische Aktivierung von p-EGFR deutlich. p-EGFR verhält sich nämlich nach alleiniger Radiatio mit reduziertem Expressionslevel und nicht wie nach Cetuximab-Gabe mit einer verstärkter Expression. Unterschiede zwischen EGFR wt und EGFR vIII liegen hier lediglich in den stärker ausgeprägten Expressionsraten des EGFR vIII und zeigt also, dass der Effekt der Bestrahlung auf Proteinebene gering ausfällt.

6.7 *In vitro* Charakterisierung der Wirkungseffizienz der Kombinationsbehandlungen auf das Migrationsverhalten von EGFR und EGFR vIII

Die Charakterisierung der Monotherapien stellt die Grundlage zur Interpretation der Kombinationsbehandlungen dar. Nur der Vergleich zwischen Kontrolle, Monotherapie und Kombinationstherapie erlaubt eine Aussage über den Effekt der doppelten Behandlungsstrategie. Auf diesen Versuchen lag besonderes Augenmerk, da sich hierfür entscheidende Konsequenzen für die Klinik ableiten können: Bringt die bisher angewendete Radioimmuntherapie den Patienten den erhofften Überlebensvorteil

oder birgt die Monotherapie nicht nur den Vorteil der geringeren Toxizität sondern auch den erfolgreichsten Therapieeffekt.

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann eine entscheidende Aussage über die kombinierte Radioimmuntherapie im Rahmen der Proliferationsanalysen getroffen werden: Die drei Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5, sowohl bei EGFR wt, als auch bei EGFR vIII, zeigen überwiegend keinen zusätzlichen Effekt nach kombinierter Radioimmuntherapie. Die individuellen Unterschiede der einzelnen Gewebe ergeben keinen signifikanten Unterschied und führen somit geschlossen zu demselben Ergebnis der ineffektiven Kombinationstherapie. Auf Basis dieser Ergebnisse kann auch die entscheidende Frage nach der Relevanz des EGFR vIII Rezeptors beantwortet werden: Der EGFR vIII zeigt demnach keinen Einfluss auf das Therapieansprechen.

Entgegen mehrerer Studien, die eine vermehrte Radiosensitivität nach Cetuximab oder TKI-Behandlungen proklamieren, wie zum Beispiel Feng et al. bei *in vivo* Versuchen, konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Vorbehandlung durch genannte Inhibitoren zu keiner verbesserten Radiosensitivität in den Zellen führt (Dutta and Maity, 2007; Feng, Lopez et al., 2007).

Mögliche Erklärungen und Zusammenhänge sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

Die Zellen wurden nach klinischem Standard zunächst inhibiert und anschließend mit 2 Gray bestrahlt. Möglicherweise resultiert die Vorbehandlung mit den hier verwendeten Inhibitoren in einer molekularen Konstellation innerhalb der Signalwege und -proteine, in der die Bestrahlung keinen weiteren Effekt mehr erzielen kann. Mögliche pharmakokinetische Interaktionen zwischen den einzelnen Therapiekomponenten sind ebenfalls nicht auszuschließen. Andere Studien beleuchten die Hintergründe auf molekularbiologischer Ebene genauer, wie zum Beispiel Gurtner et al. In dieser Studie werden Effekte von kombinierter Strahlentherapie und EGFR Inhibition, vorwiegend mit Cetuximab, bei HNSCC näher charakterisiert. Zwar haben hier Einzeltherapien mit den Inhibitoren Cetuximab und

Erlotinib das Tumorstadium signifikant verzögert, aber im Gegensatz dazu konnte eine zusätzliche Bestrahlung keinen zusätzlichen Effekt mehr erzielen. Daraufhin wurden die Modalitäten der Bestrahlung verändert: Die Durchführung einer fraktionierten Bestrahlung nach EGFR-Inhibition mit Cetuximab zeigte dann eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle. Bei Erlotinib jedoch brachte auch die fraktionierte Bestrahlung keine Verbesserung. Als Ursache wurde hier zum ersten Mal eine Korrelation zwischen genetischer EGFR Expression, die mit Hilfe von FISH gemessen wurde, und dem kurativen Effekt von fraktionierter Bestrahlung und EGFR-Inhibition mit Cetuximab aufgezeigt (Gurtner, Deuse et al., 2011). Saki et al. veröffentlichte 2013, dass eine Cetuximab-Resistenz mit einer k-Ras Überexpression und außerdem dem Verlust einer Radiosensitivität assoziiert ist (Saki, Toulany et al., 2013). Demnach wäre also die Bestrahlung nach vorangegangener Cetuximab-Gabe hinfällig.

Darüber hinaus gibt es bisher nur wenige Studien, die sich ausschließlich auf die Kombination von TKI mit anderen Therapiemodalitäten konzentrierten (Krause, Gurtner et al., 2009). Trotzdem lässt sich aufgrund der bisherigen Untersuchungen eine Tendenz dahingehend erkennen, dass kombinierte Therapiestrategien zusammen mit TKI keinen Vorteil in der Tumorreduktion bringen.

Die Monotherapie mit TKI stellt sich dagegen als sehr wirksam dar. Diese These stützend, muss außerdem erwähnt werden, dass bisher nur sehr wenige Resultate vorliegen, die einen tatsächlichen Benefit für eine Kombinationsbehandlung mit vorangegangener TKI-Gabe nachweisen konnten. Moore et al. konnte als einer der wenigen bisher dokumentieren, dass bei simultaner Gabe von Gemcitabine und Erlotinib in fortgeschrittenem Pankreaskarzinom sich ein Behandlungsvorteil ergeben hat (Krause, Gurtner et al., 2009). Zum anderen zeigen auch Kombinationen aus Chemotherapie und TKI in vielen anderen Studien ebenfalls keinen Behandlungsvorteil: In insgesamt vier Versuchen, bei denen NSCLC-Patienten primär simultan mit TKI und Chemotherapie behandelt wurden, zeigte keine dieser

Untersuchungen Überlegenheit gegenüber alleiniger Chemotherapie (Krause, Gurtner et al., 2009; Gatzemeier, Pluzanska et al., 2007).

Zusammenfassend zeigen sich also TKI als effektive Monotherapeutika, die darüber hinaus nicht nur eine zusätzliche Radiotherapie, sondern auch eine zusätzliche Chemotherapie infrage stellen (Baselga and Arteaga, 2005). Obwohl es bereits präklinische Daten gibt, die die ineffektive Kombinationstherapie belegen, sind bisher keine Biomarker etabliert, die die ursächlichen Interaktionen hierfür hinreichend erklären. Mit Hilfe einzelner Studien konnten bisher nur wenige Faktoren identifiziert werden, die mitunter für diese Reaktionen verantwortlich sind. Die herabgesetzte Radiosensitivität nach Vorbehandlung sowohl mit Cetuximab als auch mit TKI zu erklären, stellt ein spannendes Thema dar und erfordert weiterführende Studien. Wichtig wäre auch eine Analyse, die die aktuellen Erkenntnisse über die möglichen Mechanismen der heterogenen Tumoransprechen zusammenfasst (Krause, Gurtner et al., 2009).

Richtet man auf Grundlage dieser Ergebnisse den Blick in die aktuelle Klinik, bieten diese Erkenntnisse, nämlich dass Gefitinib als Monotherapeutikum am effektivsten bei *in vitro* Versuchen wirkt, die Grundlage für die Etablierung neuer Therapiemodalitäten. Da sich die Radioimmuntherapie unter anderem als palliative Therapie darstellt, betrifft sie meist Patienten mit multiplen Vorbehandlungen oder schweren Erkrankungen. Demnach sind von der kombinierten Therapie Patienten betroffen, die die Belastung der additiven Toxizität noch stärker belastet. Aber auch Patienten in gutem Allgemeinzustand könnten demnach die Nebenwirkungsprofile zweier hoch toxischer Tumortherapien umgehen, die beispielsweise Mukositis, Dysphagie, Xerostomie und Schmerz bei kombinierter Therapie verursachen (Echarri, Lopez-Martin et al., 2016).

Bei den Analysen des klonogenen Überlebens lässt sich das Ergebnis der ineffektiven Kombinationstherapie verifizieren. Noch deutlicher zeigen hier die radioimmuntherapierten Zellen, dass das Konzept der doppelten Inhibition keinen Effekt hat.

Hinsichtlich der Migration konnte ein kombiniertes Therapiekonzept keine zusätzliche Reduktion der Migration erwirken. Der Effekt der Tyrosinkinaseinhibitoren kann durch Bestrahlung nicht zusätzlich verstärkt werden. Interessant ist, dass sich bei den Versuchen der Migrationsmessung nach Cetuximabbehandlung plus 2 Gray eine entscheidende Induktion der Migration bereits nach 5h zeigt. Besonders betroffen von diesem Effekt ist EGFR wt. Der beschriebene Effekt lässt sich möglicherweise durch die Hyperphosphorylation des EGFR nach Cetuximab-Behandlung erklären, die sich offensichtlich durch Bestrahlung nochmals verstärkt auf die Migration auswirkt. Hier könnten weiterführende Studien angesetzt werden, die einen additiven Effekt auf die strahleninduzierte Migration durch Cetuximab untersuchen. Möglicherweise ist dieses Ergebnis aber auch auf die bereits erwähnte unzuverlässige Wirksamkeit von Cetuximab zurückzuführen (s. 6.2).

Betrachtet man die Ergebnisse auf Proteinexpression und dabei EGFR wt, so erzeugt die Kombinationstherapie der TKI plus Bestrahlung den Effekt der reduzierten Proteinexpression von EGFR, pEGFR, p-AKT und p-ERK1/2. Im Vergleich zu den Monotherapien kann aber auch hier kein zusätzlicher Effekt erzielt werden. Auch bei der Behandlung Cetuximab plus 2 Gray sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Monotherapien mit dem monoklonalen Antikörper zu erkennen. EGFR vIII zeigt nach Kombinationstherapie den Effekt des leicht reduzierten Expressionsniveaus von p-ERK1/2 im Vergleich zu den Monotherapien und zählt damit zu dem einzigen Effekt, der sich nach zusätzlicher Bestrahlung manifestieren lässt. p-ERK1/2 ist ein für den Zellzyklus verantwortliches Protein, inwiefern aber die reduzierte Expression nach Kombinationsbehandlung diesen beeinflusst, darüber kann nur spekuliert werden. Da es aber keine signifikante Veränderung darstellt, kann hier in Zusammenschau der Ergebnisse die Aussage getroffen werden, dass nach Kombinationstherapie auch auf Proteinebene kein additiver Effekt verzeichnet werden kann.

6.8 Kritische Beurteilung der EGFR-Inhibition in Abhängigkeit des EGFR vIII und simultaner Strahlentherapie

Präklinische und klinische Daten zeigen, dass es eine große Heterogenität von Tumoransprechen auf die verschiedenen Konstellationen der Kombinationstherapie, zusammengesetzt aus Inhibition des EGFR und Radiotherapie oder Chemotherapie, gibt. Das unterschiedliche Ansprechen beruht offensichtlich nicht nur auf den verschiedenen Tumorentitäten, sondern auch auf den verschiedenen Therapieplänen und Medikamenten. Die zugrunde liegenden Ursachen jedoch konnten bisher nicht hinreichend geklärt werden (Krause, Gurtner et al., 2009; Gurtner, Deuse et al., 2011). Einigkeit jedoch scheint darüber zu herrschen, dass in unterschiedlichen Tumorentitäten, beispielsweise in Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen oder HNSCC, die TKI-Monotherapie als effektive Therapie angesehen werden kann (Gurtner, Deuse et al., 2011; Baselga and Arteaga, 2005). Außerdem zeigen sich Kombinationstherapien in der Literatur ebenfalls als weniger effektiv als Monotherapien mit EGFR-Inhibitoren (Baselga and Arteaga, 2005). Diese Erkenntnisse aus der aktuellen Literatur untermauern die Daten, die im Rahmen dieser Arbeit generiert werden konnten. Zum einen wurde die Ineffektivität der Kombinationstherapie, bestehend aus EGFR-Inhibition und Bestrahlung aufgezeigt, indem sich in keiner der Zelllinien ein zusätzlicher Effekt durch ionisierende Strahlung nach stattgehabter EGFR-Inhibition manifestierte. Zum anderen wurde mit Hilfe der Daten die Überlegenheit von TKI, insbesondere von Gefitinib, gegenüber Cetuximab bei HNSCC deutlich gemacht. Die Analysen dieser Arbeit weisen also ein einheitliches Ergebnis nach: Keine der drei Zelllinien, weder EGFR wt noch EGFR vIII, zeigt einen Benefit gegenüber keiner der durchgeführten Kombinationen, weder Cetuximab plus 2 Gray, noch TKI plus 2 Gray. Könnten diese Daten in klinischen Studien verifiziert werden, wäre der Ersatz von Cetuximab durch Gefitinib denkbar. Dies könnte gegebenenfalls ebenso wie in den *in vitro* Versuchen einen größeren Effekt auf das Überleben der Tumorzellen haben, als eine Cetuximabtherapie. Außerdem stellte sich Cetuximab durchwegs als äußerst unzuverlässiger Antikörper da. Ein

weiteres Gegenargument des Antikörpers Cetuximab ist dessen Nebenwirkungsprofil im Zusammenhang mit der intravenösen-Gabe. Die Toxizität des monoklonalen Antikörpers, der sich typischerweise in stark ausgeprägten Hautausschlägen äußert, zählt zu den nicht zu vernachlässigenden Nachteilen dieser Behandlung. Außerdem könnte das Problem der auftretenden Resistenzmechanismen und nachlassenden Wirksamkeit von Cetuximab durch den Ersatz mit Gefitinib eventuell gelöst werden (Schmitz, Ang et al., 2014). Weitere Vorteile einer Gefitinib-Monotherapie würden sich außerdem durch das Weglassen der Bestrahlung ergeben. Zum einen entfallen Nebenwirkungen der Bestrahlung, wie Strahlendermatitis, Diarrhoe oder Schmerzen (Cormier, Drapek et al., 2016). Zum anderen könnte das Risiko von verstärkter Metastasenbildung oder Bildung von Lokalrezidiven, das durch strahleninduzierte Migration induziert werden kann, umgangen werden (Schuettler, Piontek et al., 2015).

Auf dem Boden dieser Erkenntnisse haben sich überdies Hinweise bezüglich des Einflusses der EGFR vIII ergeben: Eine klinische Unterscheidung zwischen einem EGFR vIII oder einem EGFR wt exprimierenden Tumors sollt infrage gestellt werden, da sich bezüglich des Therapieansprechens auf die effektivste Alternative Gefitinib bei den *in vitro* Versuchen kein Unterschied herausstellte. Der Inhibitionsmechanismus von Gefitinib hemmt sowohl EGFR wt als auch EGFR vIII gleichermaßen effektiv. Auf ein Screening nach der EGFR vIII-Deletion in zirkulierender Tumor-DNA bei Krebspatienten mit dem Hintergedanken einer EGFR vIII-spezifischen Therapie, wie es bei Glioblastomen bereits propagiert wird, kann bei HNSCC damit guten Gewissens verzichtet werden (Salkeni, Zarzour et al., 2013). Darüber hinaus ergab sich auch nach Kombinationsbehandlungen kein entscheidender Unterschied zwischen den beiden Rezeptortypen.

7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass der EGFR vIII *in vitro* keinen Einfluss auf das Therapieansprechen hatte. In diesem Zusammenhang stellte sich Gefitinib zur Behandlung von HNSCC als eine effektive Alternative dar und zeigt das Potenzial Cetuximab in der aktuellen Standardtherapie zu ersetzen. Analysen zur Proliferation, klonogenem Überleben, Migration und Proteinexpression untermauern die These einer effektiven *in vitro* Monotherapie bei HNSCC mittels Gefitinib. Darüberhinaus präsentierte sich die zusätzliche Bestrahlungstherapie ohne Vorteile gegenüber der Monotherapie. Bezüglich der Probleme, die bei der Bekämpfung von HNSCC im Zusammenhang mit der tumorspezifischen Mutation EGFR vIII aktuell diskutiert werden, gibt diese Arbeit Anlass dafür, TKI als vielversprechende Therapeutika weiterführend zu untersuchen. Hierfür sind anknüpfende Studien, die dieses Therapiemodell in der Klinik untersuchen, notwendig. Wie eingangs erwähnt, spielt der EGFR und gegebenenfalls auch der EGFR vIII in anderen Tumorentitäten ebenfalls eine Rolle in der Entstehung von Tumoren, sodass nicht nur HNSCC-Patienten, sondern auch Patienten aus anderen Fachgebieten von diesen Ergebnissen profitieren könnten.

Die Frage nach der Prävalenz des EGFR vIII in HNSCC ist noch nicht abschließend geklärt. Thema der aktuellen Forschung ist der sichere klinische Nachweis von EGFR vIII in HNSCC. Geht man von der Expression dieser Mutation in HNSCC weiterhin aus, wäre es interessant, ob die Prävalenz dieser tumorspezifischen Mutation vermehrt in high-grade-Tumoren oder hohen TNM-Stadien vertreten ist und analog die EGFR vIII-Expression als weiteres Klassifikationskriterium in das Tumorigradung bzw -staging miteinbezogen werden kann. Bislang konnte in der Literatur nur eine Studie die Korrelation zwischen der Expression des EGFR vIII und der T-Klassifikation und dem Tumorstadium statistisch nachweisen (Chang, Tsai et al., 2013). Die bereits bekannten Eigenschaften des EGFR vIII, nämlich die reduzierte Überlebenszeit, erhöhtes Metastasierungs- und Rezidivrisiko und

schlechtes Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie, geben weiterhin Grund zu dieser Annahme (Tang, Gong et al., 2000; Chung, Zhang et al., 2011).

8 Zusammenfassung

Das Thema der Promotion beschäftigte sich mit der Frage nach der Relevanz des Vorliegens der EGFR VIII Variante, als häufigste Extrazellulärmutation des EGF-Rezeptors, in Bezug auf das Therapieansprechen bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches. Hierfür wurden HNSCC-Zelllinien mit einem EGFR VIII-Plasmid transfiziert und im Anschluss das Proliferations- und Migrationsverhalten der Zellen nach Strahlen- und Inhibitionsbehandlungen im Vergleich zu EGFR-Wildtypzellen analysiert. Die Inhibition erfolgte zum einen mit dem bereits in der Klinik verwendeten Antikörper Cetuximab, zum anderen mit den Tyrosinkinaseinhibitoren AG1478 und Gefitinib - als mögliche Alternativen für zukünftige Therapiestandards. Außerdem wurden die Zelllinien mit einer therapeutischen Dosis von 2 Gray bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte als Einzel- und in Kombinationstherapie mit den oben genannten Inhibitoren. Zuletzt wurden die Effekte der Behandlungen auf Proteinebene mit Hilfe von Western Blots analysiert.

Es fand sich, dass *in vitro* die EGFR VIII Variante keinen Einfluss auf das Zellüberleben hatte. Zudem zeigte sich bei Kombinationsbehandlungen kein zusätzlicher Effekt im Vergleich zu Einzelbehandlungen mit Tyrosinkinaseinhibitoren. Außerdem stellte sich die Einzelbehandlung *in vitro* mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib als die vielversprechendste Behandlungsoption heraus. Die Untersuchung der Zellmigration bestätigte eine strahleninduzierte Migration, die aber durch ein kombiniertes Behandlungskonzept eingedämmt werden kann.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte die Rolle des EGFR VIII in HNSCC mit Hilfe alternativer Behandlungsmethoden neu beleuchtet werden.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypothetisches Modell der Tumorentstehung von Kopf-Hals-Tumoren; modifiziert nach Perez-Ordoñez et al., 2006	30
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des ErbB-Rezeptors; modifiziert nach Warren und Landgraf, 2006	36
Abbildung 3: Signalwege des EGFR; modifiziert nach Dutta et al., 2007	39
Abbildung 4: Aufbau des humanen EGFR und des EGFR vIII; modifiziert nach Pedersen, 2001	41
Abbildung 5: Prinzip der annealing sites für die Primer der EGFR vIII Sequenz, modifiziert nach Yoshimoto et al., 2008.....	50
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Proteintransfers (Semidry Blot)	71
Abbildung 7: Amplifikationskurve, Schmelzkurve und Schmelzpeak der Zelllinie Cal27 wt, Cal27 vIII und des vIII Plasmidvektors.....	78
Abbildung 8: Proliferationskinetiken der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5	80
Abbildung 9: Einfluss der Bestrahlung auf das klonogene Überleben der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5.....	83
Abbildung 10: Einfluss von AG1478 auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5.....	85
Abbildung 11: Einfluss von Gefitinib auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5.....	86
Abbildung 12: Einfluss von Cetuximab auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5.....	87
Abbildung 13: Einfluss der Einzelbehandlungen und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das Proliferationsverhalten der Cal27-Zelllinien	89

Abbildung 14: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das Proliferationsverhalten der HN-Zelllinien.. 91

Abbildung 15: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das Proliferationsverhalten der UD-SCC-5-Zelllinien 93

Abbildung 16: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das klonogene Überleben der Cal27-Zelllinien 96

Abbildung 17: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von Ag1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das klonogene Überleben der HN-Zelllinien.... 97

Abbildung 18: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf das klonogene Überleben der UD-SCC-5-Zelllinien..... 99

Abbildung 19: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von AG1478, Gefitinib, Cetuximab und 2 Gray auf die Migration der Cal27-Zelllinien nach 5 Stunden 101

Abbildung 20: Western Blot Analysen der Einzelbehandlungen mit Tubulinladekontrollen; Größe der Proteine EGFR 170 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pERK1/2 42/44kDa 104

Abbildung 21: Western Blot Analysen der Kombinationsbehandlungen mit Tubulinladekontrollen; Größe der Proteine EGFR 170 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pERK1/2 42/44kDa 105

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: pT-Klassifikation der UICC (Wittekind und Meyer, 2010)	19
Tabelle 2: pN-Klassifikation der UICC (Wittekind und Meyer, 2010).....	20
Tabelle 3: pM-Klassifikation der UICC (Wittekind und Meyer, 2010)	20
Tabelle 4: Histopathologisches Grading der UICC (Wittekind and Meyer, 2010).....	21
Tabelle 5: R-Klassifikation der UICC (Wittekind and Meyer, 2010).....	21
Tabelle 6: T-Klassifikation der Lippe und Mundhöhle der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)	22
Tabelle 7: T-Klassifikation Oropharynx der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)	23
Tabelle 8: T-Klassifikation des Larynx (Supraglottis, Glottis, Subglottis) der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)	26
Tabelle 9: Stadieneinteilung/TNM-Klassifikation der UICC (Wittekind and Meyer, 2010)	27
Tabelle 10: Verwendete HNSCC Zelllinien (Lin, Grandis et al., 2007).....	46
Tabelle 11: Kulturmedien und Zusätze	47
Tabelle 12: Primärantikörper	48
Tabelle 13: Zusammenfassung der Konzentrationskinetiken.....	48
Tabelle 14: Verwendete Inhibitoren und Antikörper	49
Tabelle 15: Plasmid	49
Tabelle 16: Primer	49
Tabelle 17: Kits.....	51
Tabelle 18: Reagenzien.....	53

Tabelle 19: Gemischte Reagenzien, Enzyme, Puffer, Gele	55
Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien	56
Tabelle 21: Geräte	58
Tabelle 22: Computerprogramme	59
Tabelle 23: RNA-Mix	64
Tabelle 24: RT-Mix	64
Tabelle 25: Master-Mix	65
Tabelle 26: PCR-Programm	66
Tabelle 27: Kalibrationskurve für Bradford-Assay	68
Tabelle 28: Zusammensetzung des Running Gels.....	69
Tabelle 29: Zusammensetzung des Stacking Gels	69
Tabelle 30: Definition der Signifikanzniveaus	76
Tabelle 31: Zusammenfassung der C(t)-Werte der Amplifikation des vIII-Plasmidvektors	78
Tabelle 32: Zusammenfassung der C(t)-Werte der Amplifikation der Zelllinie Cal27 wt und Cal27 vIII.....	78
Tabelle 33: Zusammenfassung der Schmelztemperatur des vIII-Plasmidvektors.....	79
Tabelle 34: Zusammenfassung der Schmelztemperaturen der Zelllinie Cal27wt und Cal27 vIII	79
Tabelle 35: Zusammenfassung der IC ₅₀ -Dosen nach Bestrahlung der Zelllinien Cal27, HN und UD-SCC-5.....	81
Tabelle 36: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das Proliferationsverhalten von Cal27 wt und Cal27 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von Cal27 wt und Cal27 vIII.	90

Tabelle 37: Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das Proliferationsverhalten von HN wt und HN vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von HN wt und HN vIII.....	92
Tabelle 38: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das klonogene Überleben von UD-SCC-5 wt und UD-SCC-5 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von UD-SCC-5 wt und UD-SCC-5 vIII.....	94
Tabelle 39: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das klonogene Überleben von Cal27 wt und Cal27 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von Cal27 wt und Cal27 vIII.	97
Tabelle 40: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf das klonogene Überleben von HN wt und HN vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von HN wt und HN vIII.....	98
Tabelle 41: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen von Gefitinib auf das klonogene Überleben der UD-SCC-5 wt und UD-SCC-5 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von UD-SCC5 wt und UD-SCC-5-vIII.....	99
Tabelle 42: Errechnete p-Werte nach dem Einfluss der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf die Migration von Cal27 wt und Cal27 vIII. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert von Cal27 wt und Cal27 vIII.....	102
Tabelle 43: Effekt der Bestrahlung auf die Proteinexpression der Zelllinien; ∅ unbestrahlt, ++ stark exprimiert, + mäßig exprimiert, - schwach exprimiert;	104
Tabelle 44: Effekt der TKI- und Antikörper-Inhibition auf die Proteinexpression der Zelllinien; ∅ unbestrahlt, ++ stark exprimiert, + mäßig exprimiert, - schwach exprimiert;.....	105
Tabelle 45: Effekt der Kombinationsbehandlungen auf die Proteinexpression der Zelllinien; ∅ unbestrahlt, ++ stark exprimiert, + mäßig exprimiert, - schwach exprimiert;.....	106

9.3 Literaturverzeichnis

- ALROY, I. & YARDEN, Y. 1997. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters*, 410, 83-86.
- BASELGA, J. & ARTEAGA, C. L. 2005. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol*, 23, 2445-59.
- BATRA, S. K., CASTELINO-PRABHU, S., WIKSTRAND, C. J., ZHU, X., HUMPHREY, P. A., FRIEDMAN, H. S. & BIGNER, D. D. 1995. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ*, 6, 1251-9.
- BECK-MANNAGETTA, J., BURIAN, M., VIZENZ, K., KOPP, M. & ROSENLECHNER, S. 2011. Kopf-Hals-Malignome. Manual der Chirurgischen Krebstherapie. *Österreichische Gesellschaft für Chirurgische Onkologie*.
- BLUME-JENSEN, P. & HUNTER, T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411, 355-65.
- BÖCKER, W., DENK, H., HEITZ, P. U. & MOCH, H. 2008. *Pathologie*, München, Jena, Elsevier Urban & Fischer.
- BOSE, P., BROCKTON, N. T. & DORT, J. C. 2013. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int J Cancer*, 133, 2013-23.
- CALIFANO, J., VAN DER RIET, P., WESTRA, W., NAWROZ, H., CLAYMAN, G., PIANTADOSI, S., CORIO, R., LEE, D., GREENBERG, B., KOCH, W. & SIDRANSKY, D. 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, 56, 2488-92.
- CARRASCO-GARCIA, E., SACEDA, M., GRASSO, S., ROCAMORA-REVERTE, L., CONDE, M., GOMEZ-MARTINEZ, A., GARCIA-MORALES, P., FERRAGUT, J. A. & MARTINEZ-LACACI, I. 2011. Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res*, 317, 1476-89.

- CHAACHOUAY, H.; OHNESEIT, P.; TOULANY, M.; KEHLBACH, R.; MULTHOFF, G.; RODEMANN, H. P. 2011. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol* 99 (2011) : 287-292.
- CHANG, K. Y., TSAI, S. Y., CHEN, S. H., TSOU, H. H., YEN, C. J., LIU, K. J., FANG, H. L., WU, H. C., CHUANG, B. F., CHOU, S. W., TANG, C. K., LIU, S. Y., LU, P. J., YEN, C. Y. & CHANG, J. Y. 2013. Dissecting the EGFR-PI3K-AKT pathway in oral cancer highlights the role of the EGFR variant III and its clinical relevance. *J Biomed Sci*, 20, 43.
- CHU, C. T., EVERISS, K. D., WIKSTRAND, C. J., BATRA, S. K., KUNG, H. J. & BIGNER, D. D. 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), 855-61.
- CHUNG, C. H., ZHANG, Q., HAMMOND, E. M., TROTTI, A. M., 3RD, WANG, H., SPENCER, S., ZHANG, H. Z., COOPER, J., JORDAN, R., ROTMAN, M. H. & ANG, K. K. 2011. Integrating epidermal growth factor receptor assay with clinical parameters improves risk classification for relapse and survival in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81, 331-8.
- 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, 1555-62.
- CORMIER, A. C., DRAPEK, L., FAHEY, J., ROWEN, B., BURNS-BRITTON, B., LAVADINHO-LEMONS, M. & HULTMAN, T. 2016. When the Patient Seeks Cure: Challenging Chemotherapy and Radiation Side Effects Requiring Creative Solutions. *Clin J Oncol Nurs*, 20, 117-20.
- DUTTA, P. R. & MAITY, A. 2007. Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett*, 254, 165-77.
- ECHARRI, M. J., LOPEZ-MARTIN, A. & HITT, R. 2016. Targeted Therapy in Locally Advanced and Recurrent/Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (LA-R/M HNSCC). *Cancers (Basel)*, 8.
- FENG, F. Y., LOPEZ, C. A., NORMOLLE, D. P., VARAMBALLY, S., LI, X., CHUN, P. Y., DAVIS, M. A., LAWRENCE, T. S. & NYATI, M. K. 2007. Effect of epidermal growth factor receptor inhibitor class in the treatment of head and neck cancer with concurrent radiochemotherapy in vivo. *Clin Cancer Res*, 13, 2512-8.

- FERGUSON, K. M., BERGER, M. B., MENDROLA, J. M., CHO, H. S., LEAHY, D. J. & LEMMON, M. A. 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell*, 11, 507-17.
- GAN, H. K., CVRLJEVIC, A. N. & JOHNS, T. G. 2013. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J*, 280, 5350-70.
- GAN, H. K., KAYE, A. H. & LUWOR, R. B. 2009. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci*, 16, 748-54.
- GATZEMEIER, U., PLUZANSKA, A., SZCZESNA, A., KAUKEL, E., ROUBEC, J., DE ROSA, F., MILANOWSKI, J., KARNICKA-MLODKOWSKI, H., PESEK, M., SERWATOWSKI, P., RAMLAU, R., JANASKOVA, T., VANSTEENKISTE, J., STRAUZ, J., MANIKHAS, G. M. & VON PAWEL, J. 2007. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol*, 25, 1545-52.
- GE, H., GONG, X. & TANG, C. K. 2002. Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis. *Int J Cancer*, 98, 357-61.
- GELLRICH, N.-C., GUTWALD, R., WINTERER, J., K. HENNE, K., DIGEL, W., MAIER, W., SCHIPPER, J. & HENS, H. 2004. Kopf-Hals-Tumoren; Empfehlung zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Tumorzentrum Freiburg*, 1.Auflage.
- GOERNER, M., SEIWERT, T. Y. & SUDHOFF, H. 2010. Molecular targeted therapies in head and neck cancer--an update of recent developments. *Head Neck Oncol*, 2, 8.
- GREGOIRE, V., LEFEBVRE, J. L., LICITRA, L., FELIP, E. & GROUP, E.-E.-E. G. W. 2010. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 21 Suppl 5, v184-6.
- GSCHWIND, A., FISCHER, O. M. & ULLRICH, A. 2004. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4, 361-70.

- GURTNER, K., DEUSE, Y., BUTOF, R., SCHAAL, K., EICHELER, W., OERTEL, R., GRENNAN, R., THAMES, H., YAROMINA, A., BAUMANN, M. & KRAUSE, M. 2011. Diverse effects of combined radiotherapy and EGFR inhibition with antibodies or TK inhibitors on local tumour control and correlation with EGFR gene expression. *Radiother Oncol*, 99, 323-30.
- HUNTER, K. D., PARKINSON, E. K. & HARRISON, P. R. 2005. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 127-35.
- IHRLER, S. & WEILER, C. 2009. Tumorentitäten und pathohistologische Grundlagen. In: "Manuale Kopf-Hals-Malignome". *Tumorzentrum München*.
- JONKMAN, J. E., CATHCART, J. A., XU, F., BARTOLINI, M. E., AMON, J. E., STEVENS, K. M. & COLARUSSO, P. 2014. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr*, 8, 440-51.
- JORISSEN, R. N., EPA, V. C., TREUTLEIN, H. R., GARRETT, T. P., WARD, C. W. & BURGESS, A. W. 2000. Characterization of a comparative model of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *Protein Sci*, 9, 310-24.
- KATZ, D., ITO, E., LAU, K. S., MOCANU, J. D., BASTIANUTTO, C., SCHIMMER, A. D. & LIU, F. F. 2008. Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates: novel applications to combination therapies and high-throughput screening. *Biotechniques*, 44, ix-xiv.
- KRAUSE, M., GURTNER, K., DEUSE, Y. & BAUMANN, M. 2009. Heterogeneity of tumour response to combined radiotherapy and EGFR inhibitors: differences between antibodies and TK inhibitors. *Int J Radiat Biol*, 85, 943-54.
- LEHNERDT, G., HOFFMANN, T. K., MATTHEIS, S., BRANDAU, S., ZEIDLER, R. & LANG, S. 2010. [Diagnostic and prognostic biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma]. *HNO*, 58, 713-23; quiz 724-5.
- LEWIN, F., NORELL, S. E., JOHANSSON, H., GUSTAVSSON, P., WENNERBERG, J., BIORKLUND, A. & RUTQVIST, L. E. 1998. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer*, 82, 1367-75.
- LI, L., CHAKRABORTY, S., YANG, C. R., HATANPAA, K. J., CIPHER, D. J., PULIYAPPADAMBA, V. T., REHMAN, A., JIWANI, A. J., MICKEY, B., MADDEN, C., RAISANEN, J., BURMA, S., SAHA, D., WANG, Z., PINGLE, S. C., KESARI, S., BOOTHMAN, D. A. & HABIB, A. A. 2014. An EGFR wild type-

- EGFRvIII-HB-EGF feed-forward loop regulates the activation of EGFRvIII. *Oncogene*, 33, 4253-64.
- LIN, C. J., GRANDIS, J. R., CAREY, T. E., GOLLIN, S. M., WHITESIDE, T. L., KOCH, W. M., FERRIS, R. L. & LAI, S. Y. 2007. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*, 29, 163-88.
- LUMLEY, M., BURGESS, R., BILLINGHAM, L., MCDONALD, D. & MILLIGAN, D. 1997. Colony counting is a major source of variation in CFU-GM results between centres. *British Journal of Haematology*, 97, 481-484.
- MANDIC, R., RODGARKIA-DARA, C. J., ZHU, L., FOLZ, B. J., BETTE, M., WEIHE, E., NEUBAUER, A. & WERNER, J. A. 2006. Treatment of HNSCC cell lines with the EGFR-specific inhibitor cetuximab (Erbix) results in paradox phosphorylation of tyrosine 1173 in the receptor. *FEBS Lett*, 580, 4793-800.
- MARKOVIC, A. & CHUNG, C. H. 2012. Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 12, 1149-59.
- MELCHERS, L. J., CLAUSEN, M. J., MASTIK, M. F., SLAGTER-MENKEMA, L., LANGENDIJK, J. A., VAN DER LAAN, B. F., VAN DER WAL, J. E., VAN DER VEGT, B., ROODENBURG, J. L. & SCHUURING, E. 2014. Head and neck squamous cell carcinomas do not express EGFRvIII. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 90, 454-62.
- MOLLI, P. R., ADAM, L. & KUMAR, R. 2008. Therapeutic IMC-C225 antibody inhibits breast cancer cell invasiveness via Vav2-dependent activation of RhoA GTPase. *Clin Cancer Res*, 14, 6161-70.
- MOSCATELLO, D. K., HOLGADO-MADRUGA, M., GODWIN, A. K., RAMIREZ, G., GUNN, G., ZOLTICK, P. W., BIEGEL, J. A., HAYES, R. L. & WONG, A. J. 1995. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res*, 55, 5536-9.
- NAGANE, M., COUFAL, F., LIN, H., BOGLER, O., CAVENEE, W. K. & HUANG, H. J. 1996. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res*, 56, 5079-86.

- NISHIKAWA, R., JI, X. D., HARMON, R. C., LAZAR, C. S., GILL, G. N., CAVENEE, W. K. & HUANG, H. J. 1994. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7727-31.
- OGISO, H., ISHITANI, R., NUREKI, O., FUKAI, S., YAMANAKA, M., KIM, J. H., SAITO, K., SAKAMOTO, A., INOUE, M., SHIROUZU, M. & YOKOYAMA, S. 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110, 775-87.
- PEDERSEN, M. W., MELTORN, M., DAMSTRUP, L. & POULSEN, H. S. 2001. The type III epidermal growth factor receptor mutation. *Annals of Oncology*, 12, 745-760.
- PEREZ-ORDONEZ, B., BEAUCHEMIN, M. & JORDAN, R. C. 2006. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol*, 59, 445-53.
- PICKHARD, A., PIONTEK, G., SEIDL, C., KOPPING, S., BLECHERT, B., MISSLBECK, M., BROCKHOFF, G., BRUCHERTSEIFER, F., MORGENSTERN, A. & ESSLER, M. 2014. (2)(1)(3)Bi-anti-EGFR radioimmunoconjugates and X-ray irradiation trigger different cell death pathways in squamous cell carcinoma cells. *Nucl Med Biol*, 41, 68-76.
- PICKHARD, A., SIEGL, M., BAUMANN, A., HUHN, M., WIRTH, M., REITER, R., RUDELIUS, M., PIONTEK, G. & BROCKHOFF, G. 2014. The response of head and neck squamous cell carcinoma to cetuximab treatment depends on Aurora kinase A polymorphism. *Oncotarget*, 5, 5428-38.
- POUGET-SCHORS, D., ZIMMERMANN, F. & MAST, G. 2009. Therapieentscheidung und multimodale Therapiekonzepte, Lebensqualität. In: "Manual Kopf-Hals-Malignome". *Tumorzentrum München*.
- POWELL, K., KWEE, E., NUTTER, B., HERDERICK, E., PAUL, P., THUT, D., BOEHM, C. & MUSCHLER, G. 2016. Variability in subjective review of umbilical cord blood colony forming unit assay. *Cytometry B Clin Cytom*.
- RASSOW, J., HAUER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. 2008. Zelluläre Kommunikation. In: DEUTZMANN, R. (ed.) *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Thieme Verlag
- REITER, M., HARRÉUS, U., MATTHIAS, C. & HÖLZEL, D. 2009. Epidemiologie. Manual Kopf-Hals-Malignome. *Tumorzentrum München*.

- RIESE, D. I. & STERN, D. F. 1998. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays*, 20.
- RÖPER, B. & HÖLZEL, D. 2009. Prognostische Parameter. Manuale Kopf-Hals-Malignome. *Tumorzentrum München*.
- SAKI, M., TOULANY, M. & RODEMANN, H. P. 2013. Acquired resistance to cetuximab is associated with the overexpression of Ras family members and the loss of radiosensitization in head and neck cancer cells. *Radiother Oncol*, 108, 473-8.
- SALKENI, M. A., ZARZOUR, A., ANSAY, T. Y., MCPHERSON, C. M., WARNICK, R. E., RIXE, O. & BAHASSI EL, M. 2013. Detection of EGFRvIII mutant DNA in the peripheral blood of brain tumor patients. *J Neurooncol*, 115, 27-35.
- SCHIEFLER, C., PIONTEK, G., DOESCHER, J., SCHUETTLER, D., MISSLBECK, M., RUDELIUS, M., HAUG, A., REITER, R., BROCKHOFF, G. & PICKHARD, A. 2014. Inhibition of SphK1 reduces radiation-induced migration and enhances sensitivity to cetuximab treatment by affecting the EGFR / SphK1 crosstalk. *Oncotarget*, 5, 9877-88.
- SCHMITZ, S., ANG, K. K., VERMORKEN, J., HADDAD, R., SUAREZ, C., WOLF, G. T., HAMOIR, M. & MACHIELS, J. P. 2014. Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: current knowledge and future directions. *Cancer Treat Rev*, 40, 390-404.
- SCHUETTLER, D., PIONTEK, G., WIRTH, M., HALLER, B., REITER, R., BROCKHOFF, G. & PICKHARD, A. 2015. Selective inhibition of EGFR downstream signaling reverses the irradiation-enhanced migration of HNSCC cells. *Am J Cancer Res*, 5, 2660-72.
- SCHULER, K., WINTER, W., BETZ, C. S. & LEUNIG, A. 2009. Tumorresektion. In: "Manual Kopf-Hals-Malignome". *Tumorzentrum München*.
- SEIWERT, T. Y. & COHEN, E. E. 2005. State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer*, 92, 1341-8.
- SOK, J. C., COPPELLI, F. M., THOMAS, S. M., LANGO, M. N., XI, S., HUNT, J. L., FREILINO, M. L., GRANER, M. W., WIKSTRAND, C. J., BIGNER, D. D., GOODING, W. E., FURNARI, F. B. & GRANDIS, J. R. 2006. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res*, 12, 5064-73.

- STRUVE, N., RIEDEL, M., SCHULTE, A., RIECKMANN, T., GROB, T. J., GAL, A., ROTHKAMM, K., LAMSZUS, K., PETERSEN, C., DIKOMEY, E. & KRIEGS, M. 2015. EGFRvIII does not affect radiosensitivity with or without gefitinib treatment in glioblastoma cells. *Oncotarget*, 6, 33867-77.
- SUGAWA, N., YAMAMOTO, K., UEDA, S., MORITA, N., KITA, M., NISHINO, H., FUSHIKI, S. & OKABE, T. 1998. Function of aberrant EGFR in malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol*, 15, 53-7.
- TANG, C. K., GONG, X. Q., MOSCATELLO, D. K., WONG, A. J. & LIPPMAN, M. E. 2000. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res*, 60, 3081-7.
- USHIRO, H. & COHEN, S. 1980. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem*, 255, 8363-5.
- WARREN, C. M. & LANDGRAF, R. 2006. Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal*, 18, 923-33.
- WITTEKIND, C. & MEYER, H.-J. 2010. *TNM Klassifikation maligner Tumoren UICC*. 7. Auflage.
- YAMAZAKI, H., OHBA, Y., TAMAOKI, N. & SHIBUYA, M. 1990. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res*, 81, 773-9.
- YOSHIMOTO, K., DANG, J., ZHU, S., NATHANSON, D., HUANG, T., DUMONT, R., SELIGSON, D. B., YONG, W. H., XIONG, Z., RAO, N., WINTHER, H., CHAKRAVARTI, A., BIGNER, D. D., MELLINGHOFF, I. K., HORVATH, S., CAVENEE, W. K., CLOUGHESY, T. F. & MISCHEL, P. S. 2008. Development of a real-time RT-PCR assay for detecting EGFRvIII in glioblastoma samples. *Clin Cancer Res*, 14, 488-93.
- ZHANG, Z., STIEGLER, A. L., BOGGON, T. J., KOBAYASHI, S. & HALMOS, B. 2010. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget*, 1, 497-514.

10 Danksagung

Herrn Professor Henning Bier danke ich für die vielfältige Unterstützung und die Möglichkeit diese Arbeit unter hervorragenden Bedingungen in der von ihm geführten Hals-Nasen-Ohren-Klinik am Universitätsklinikum rechts der Isar durchführen zu können.

Frau Privatdozentin Anja Pickhard gilt großer Dank für die Vergabe dieses sehr interessanten Themas, für jede erdenkliche und äußerst wertvolle Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr intensiv, professionell und immer freundlich und geduldig begleitet. Ihr außerordentliches Engagement hat zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen.

Herrn Guido Piontek gilt mein besonderer Dank für die professionelle Einführung in sämtliche Methoden dieser Arbeit. Tatkräftig hat er geholfen, jedes aufkommende Problem, egal welcher Art, zu lösen. Seine wegweisenden, kreativen Ideen und die anregenden Diskussionen mit ihm haben wesentlich das Ergebnis dieser Arbeit geprägt.

Herrn Professor Dr. med. Michael Molls, dem ehemaligen Direktor der Klinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie sowie seiner Nachfolgerin Frau Professor Dr. med. Stephanie Combs möchte ich mich des Weiteren für die freundliche Bereitstellung und Benutzung des Tier- und Zellbestrahlungsgerätes bedanken.

Herrn Michael Siegl gilt ebenfalls mein Dank, für die geduldige Betreuung und Beratung während der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Alexander Baumann und Herrn Dominik Schüttler danke ich herzlich für ihre enge Freundschaft und den wertvollen Beistand über die vielen Jahre. Die Zusammenarbeit war eine große Hilfe.

Bei meinen lieben Eltern möchte ich mich für die äußerst liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung in jeder erdenklichen Art und Weise von Herzen bedanken. Ohne Ihre fortwährende Hilfe wären der Abschluss meines Medizinstudiums und die Fertigstellung dieser Dissertation niemals möglich gewesen.