

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Molekulare Ernährungsmedizin

Untersuchungen des EGF-Rezeptor-Signalwegs als molekulare Zielstruktur zur Behandlung des Magenkarzinoms

Simone Miriam Keller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. H. Daniel

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Klingenspor
2. apl. Prof. Dr. B. Luber

Die Dissertation wurde am 30.04.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.09.2014 angenommen.

Für meine Eltern

INHALTS- VERZEICHNIS

II

1 EINLEITUNG	1
1.1 Onkologie	2
1.1.1 Maligne Tumorerkrankungen	2
1.1.2 Tumorgenese	2
1.1.3 Metastasierung	4
1.2 Migration und Invasion	4
1.2.1 Migration	4
1.2.2 Invasion	6
1.3 Magenkarzinom	7
1.3.1 Epidemiologie	7
1.3.2 Ätiologie	8
1.3.2.1 Risikofaktoren	8
1.3.2.2 Genetische Prädisposition und molekulare Alterationen	9
1.3.3 Pathologie und Klassifizierung	11
1.3.4 Therapie	12
1.4 Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor	14
1.4.1 Die Familie der ErbB-Rezeptoren	14
1.4.2 Die Aktivierung des EGFR	15
1.4.3 EGFR und dessen nachgeschaltete Signalwege	17
1.4.3.1 Ras-MAPK-Signalweg	18
1.4.3.2 PI3K-PBK/AKT-Signalweg	18
1.4.3.3 PLC γ -PKC-Signalweg	18
1.4.4 Der EGFR und Tumorerkrankungen	19
1.4.4.1 EGFR Inaktivierung durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab	19
1.5 E-Cadherin	21
1.5.1 Zelladhäsionsmoleküle	21
1.5.2 Cadherine	21
1.5.2.1 Cadherin-vermittelte Zelladhäsion	22
1.5.3 E-Cadherin	22
1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit	25
2 MATERIAL UND METHODEN	27
MATERIAL	28
2.1 Zellen	28
2.1.1 Eukaryotische Zelllinien	28
2.1.2 Bakterienzellen	28
2.2 Medien und weitere Lösungen für die Zellkultur	28

2.3 Antikörper	29
2.4 Allgemeine Chemikalien und Lösungen	30
2.4.1 Größenmarker	31
2.4.2 Medikamente und Inhibitoren	31
2.4.3 Enzyme	31
2.4.4 Proteine	32
2.4.5 Plasmide	32
2.5 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen	32
2.6 Puffer und Lösungen	33
2.6.1 Puffer für Zellaufschluss	33
2.6.2 Puffer für SDS-PAGE	34
2.6.3 Puffer und Lösungen für Western Blot Analyse	34
2.6.4 Chemilumineszenz-Substrat (ECL)	36
2.6.5 Puffer und Gel-Zusammensetzung für Agarose-Gelelektrophorese	37
2.7 Verbrauchsmaterial	37
2.8 Geräte	38
2.9 Computerprogramme und Datenbanken	39
METHODEN	40
2.10 Zellbiologische Methoden	40
2.10.1 Zelllinien	40
2.10.2 Kultivieren und Passagieren	41
2.10.3 Kryo-Konservierung	42
2.10.4 Mykoplasmentest – Mykoplasmen-PCR nach TaKaRa	43
2.10.5 Transfektion	45
2.11 Molekularbiologische Methoden	46
2.11.1 Isolierung von RNA und mikroRNA aus Magenkarzinom-Zelllinien	46
2.12 Proteinchemische Methoden	48
2.12.1 Protein-Extraktion aus Magenkarzinom-Zelllinien	48
2.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.12.3 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	48
2.12.4 Transfer der Proteine auf Membranen (Western Blot)	49
2.12.5 Immunchemische Detektion der Proteine	49
2.12.6 Quantitative Auswertung der Proteinstärke	50
2.12.7 Rehybridisieren von Membranen	50
2.13 Immunchemische Methoden	51
2.13.1 Indirekte Immunfluoreszenz	51
2.14 Phänotypische Analysen	52
2.14.1 Bestimmung der Zellproliferation	52

IV

2.14.2 Motilitätsanalyse	53
2.15 Statistische Auswertungen	54
3 ERGEBNISSE	55
3.1 Morphologie der Zelllinien	56
3.2 Proteomische Analysen	58
3.2.1 Analyse der Expression und Aktivierung von EGFR	58
3.2.2 Kinetische Untersuchungen zum Einfluss von EGF auf Magenkarzinom-Zelllinien	59
3.2.3 Der Einfluss von EGF- und Cetuximab-Behandlungen auf die Expression und Aktivierung des EGFR	61
3.2.4 Kinetische Untersuchungen zum Einfluss von EGF und Cetuximab auf die Aktivität von EGFR und dessen nachgeschaltete Signalwege	64
3.2.5 Analyse der MET-Expression und Aktivierung	71
3.3 Phänotypische Untersuchungen	72
3.3.1 Cetuximab-Sensitivität der Zelllinien	72
3.3.2 Analyse des Bewegungsverhaltens von Magenkarzinom-Zelllinien nach EGF- und Cetuximab-Behandlungen	73
3.3.2.1 Der Einfluss von FKS auf das Bewegungsverhalten von MKN1 Zellen	80
3.4 Analyse potentieller Biomarker für die Cetuximab-Sensitivität	82
3.4.1 Genexpressionsanalyse	82
3.4.1.1 PTK2B Inhibition in MKN1 und Hs746T	84
3.4.2 Einfluss von E-Cadherin auf den EGFR in Magenkarzinom-Zellen	89
3.4.2.1 Hemmung oder Überexpression von E-Cadherin in Magenkarzinom-Zelllinien	89
3.4.2.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von E-Cadherin	93
3.4.2.3 Analyse proteomischer Veränderungen im EGFR-Signalweg	93
4 DISKUSSION	97
4.1 Molekulare Charakterisierung der Magenkarzinom-Zelllinien durch Proteomanalysen	99
4.1.1 Expression und Aktivierung des EGFR in den Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1	99
4.1.2 Expression und Aktivierung von Komponenten des EGFR-Signalwegs nach EGF-Stimulation	100
4.1.3 EGF und Cetuximab beeinflussen die Expression und Aktivierung des EGFR	101
4.1.3.1 Cetuximab inhibiert die EGFR-Aktivierung in MKN1 Zellen	102
4.1.4 Zusammenfassung und Konklusion 1	103
4.2 Phänotypische Analysen zur Prädiktion der Cetuximab-Sensitivität	104
4.2.1 Analyse der Cetuximab-Sensitivität der Zelllinien auf Proliferationsebene	104
4.2.2 Analyse der EGF- und/oder Cetuximab-induzierten Änderungen des Bewegungsverhaltens von Magenkarzinom-Zelllinien	105
4.2.3 Zusammenfassung und Konklusion 2	109

4.3 Korrelation des Proteoms mit dem Phänotyp	110
4.3.1 Modell für die Vorhersage des Ansprechens auf eine Cetuximab-Behandlung	110
4.3.2 Assoziation des Bewegungsverhaltens der Magenkarzinom-Zelllinien mit proteomischen Änderungen im EGFR-Signalweg	113
4.3.3 Zusammenfassung und Konklusion 3	116
4.4 Validierung potentieller Biomarker für eine Cetuximab-Therapie in Magenkarzinom-Zelllinien	118
4.4.1 Einfluss von PTK2B und FAK auf das Bewegungsverhalten von MKN1 und Hs746T Zellen	118
4.4.1.1 PTK2B und FAK inhibieren die Motilität von Cetuximab-sensitiven MKN1 Zellen	119
4.4.2 Einfluss von E-Cadherin auf intrazelluläre Vorgänge in Magenkarzinom-Zelllinien	122
4.4.2.1 Modulation der Zelllinien	122
4.4.2.2 Proteomische Veränderungen in EGFR-Signalweg durch E-Cadherin	123
4.4.2.3 Einfluss von E-Cadherin auf das Ansprechen auf Cetuximab	124
4.4.3 Zusammenfassung und Konklusion 4	125
5 SUMMARY und ZUSAMMENFASSUNG	127
5.1 Summary	128
5.2 Zusammenfassung	129
6 VERZEICHNISSE	131
6.1 LITERATURVERZEICHNIS	132
6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	149
6.3 TABELLENVERZEICHNIS	151
6.4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	152
7 ANHANG	157
8 PUBLIKATIONEN	179
8.1 Artikel	180
8.2 Poster	180
8.3 Vortrag	180
9 FÖRDERUNG	181
DANKSAGUNG	183

1 EINLEITUNG

1.1 Onkologie

1.1.1 Maligne Tumorerkrankungen

Maligne Neoplasien sind nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2011 lag der prozentuale Anteil der durch Neoplasien verursachten Todesfälle bei 26,8 %. Bösartige Neubildungen waren die bedeutendste Todesursache im mittleren Lebensalter. Im Jahr 2011 starben daran insgesamt 221 591 Personen. Bei Männern waren bösartige Tumoren der Verdauungsorgane (38 531 Verstorbene) und der Atmungsorgane (31 293 Verstorbene), bei Frauen hingegen bösartige Neoplasien der Verdauungsorgane (31 694 Verstorbene) und der Brustdrüse (17 815 Verstorbene) die häufigsten Krebsarten [1].

Die Bildung von Tumoren kann in allen Bereichen des Körpers durch unkontrolliertes Zellwachstum erfolgen. Tumoren werden nach ihrer Dignität in benigne (gutartige) und maligne (bösartige) eingeteilt. Benigne Tumoren sind gut differenziert und in der Regel durch ein langsames Wachstum charakterisiert. Sie sind von einer Bindegewebskapsel umgeben und infiltrieren nicht in Nachbarorgane. Im Gegensatz zu den malignen Tumoren weisen die meisten benignen Tumoren eine epitheliale Struktur mit intakten Zell-Zell-Adhäsionen auf. Maligne epitheliale Tumoren, auch Karzinome genannt, bestehen aus undifferenzierten Zellen. Sie zeigen ein destruktives und infiltratives Wachstum. Viele maligne Tumorzellen weisen vergrößerte Zellkerne sowie eine erhöhte Anzahl an Zellkernen pro Zelle auf. Ein äußerst wichtiges Charakteristikum von malignen Zellen ist deren Invasivität und ihre Fähigkeit zu metastasieren. Die Einteilung von benignen Tumoren erfolgt nach deren Herkunft in Adenome (Tumoren des Drüsengewebes), Fibrome (Tumoren des Bindegewebes), Lipome (Tumoren des Fettgewebes) sowie Myome (Tumoren der Muskulatur). Auch maligne Tumoren werden nach deren Herkunft in Angiosarkome (maligne Tumoren der Blutgefäße), Karzinome (maligne Tumoren epithelialer Herkunft), Leukosen (maligne Tumoren der blutbildenden Organe), Liposarkome (maligne Tumoren des Fettgewebes), Lymphome (maligne Tumoren des lymphatischen Gewebes), Myosarkome (Muskelzellsarkome) und Sarkome (maligne Tumoren des Binde- und Stützgewebes) eingeteilt [2].

1.1.2 Tumorgenese

Die Transformation einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle ist bedingt durch mehrere zeitlich aufeinander folgende Einzelereignisse. Diese Einzelereignisse reflektieren genetische Alterationen, die die progressive Transformation von normalen Zellen in maligne Derivate fördern [3-5]. Die Karzinogenese wird in drei Hauptstufen eingeteilt: die Initiation, die Latenzphase/Promotion, und die Progression.

Die Initiation erfolgt durch Mutationen in Genen, die für die Zellteilung oder den Zellzyklus wichtig sind, z.B. Tumorsuppressorgene. Diese Mutationen werden durch unterschiedliche Karzinogene wie UV-Strahlung, Viren, genetische Prädispositionen oder kanzerogene Stoffe verursacht. Während der Latenzphase bzw. Promotion wird die Zelle durch Wachstumsfaktoren zur Teilung stimuliert. Sogenannte nicht genotoxische Kanzerogene oder Hormone können Auslöser für diesen Wachstumsreiz sein, durch den die proliferierende Zelle ihre Mutationen an Tochterzellen weitergibt. Während der Progression findet durch weitere Mutationen in Tumorsuppressorgenen und verstärkte Umwandlung von Protoonkogenen in Onkogene die maligne Transformation statt. Dadurch ist die Zelle unsterblich und proliferiert stark, wodurch es zu einer Anhäufung von malignen Tumorzellen kommt. Diese entdifferenzieren sich und sind zur Invasion und folgender Metastasierung fähig [6, 7].

Die Ursachen für die Entstehung eines Tumors sind, wie oben bereits erwähnt, vielfältig, u.a. tragen Mutationen bedingt durch UV-Strahlung oder Viren ebenso wie genetische Prädispositionen und der Kontakt mit kanzerogenen Stoffen zur Tumorentstehung bei. Die im Jahre 1979 aufgestellte *second hit* Hypothese besagt, dass ein Mutationsereignis eines Tumorsuppressorgens auf einem Allel nicht zur Transformation von Zellen ausreicht, sondern solche Gene auch auf dem zweiten Allel verändert sein müssen, wodurch die Zellen ihre Heterozygotie verlieren [8].

Hanahan und Weinberg fassten im Jahre 2000 die Vielfalt von zellphysiologischen Veränderungen, die für die Progression von malignen Zellen verantwortlich sind, in Form von sechs Merkmalen zusammen. Zu diesen sechs Merkmalen von Krebs zählen die Unabhängigkeit von Wachstumsignalen, die Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, das Umgehen der Apoptose, ein unbegrenztes Teilungspotential, sowie die Fähigkeit zur Angiogenese und zur Invasion und Metastasierung [3].

Nicht alleine zellphysiologische Einflüsse haben einen Einfluss auf die Entstehung eines Karzinoms. Die Forschung der vergangenen Jahre zeigte, dass weitere bisher nicht berücksichtigte Mechanismen, wie z.B. die Tumormikroumgebung, eine große Rolle bei der Progression von Karzinomen spielen. Hanahan und Weinberg ergänzten deswegen ihre definierten Merkmale von Krebs um vier weitere Kennzeichen. Zwei dieser Faktoren tragen zur Erleichterung der Entstehung und Progression von Karzinomen bei: die Reprogrammierung des zellulären Energiemetabolismus um das Zellwachstum und die Progression zu unterstützen und die Fähigkeit einem Angriff des Immunsystems auszuweichen. Außerdem wurden zwei Merkmale ergänzt, die den Erwerb der ursprünglichen Merkmale für Krebszellen ermöglichen: Genominstabilitäten und Mutationen sowie der Entzündungsstatus von prämaligen Läsionen, wodurch das Immunsystem die Tumorprogression unterstützt [9].

1.1.3 Metastasierung

Wie schon beschrieben, ist die Progression von Karzinomen ein mehrstufiger Prozess bei dem aus Tumorzellen lokalisierter Primär-Tumoren sekundäre Metastasen gebildet werden. Metastasen sind für ca. 90 % der Todesfälle von Patienten mit soliden Tumoren verantwortlich. Um Metastasen bilden zu können, müssen die Zellen des Primärtumors u.a. dazu fähig sein, die epitheliale Zellmatrix zu transmigrieren (siehe Kapitel 1.2) [10]. Die Metastasierung erfordert mehrere Schritte: Der erste Schritt der sogenannten metastatischen Kaskade ist das Loslösen von Karzinomzellen aus einem epithelialen Verband, meist bedingt durch den Verlust von Cadherinen. Durch die Proteolyse der extrazellulären Matrix (ECM) und die verstärkte Fortbewegung maligner Zellen kommt es zur Intravasation maligner Zellen ins Blut- und Lymphsystem, der sogenannten hämatogenen bzw. lymphogenen Metastasierung. Nach der Adhäsion der malignen Zellen an das Epithel eines Metastasierungsorgans verlassen sie das Gefäßsystem (Extravasation) und invadieren in das Zielorgan, in dem sie anschließend proliferieren. Erreichen die Metastasen eine Größe von ca. 1 mm³, reicht die Versorgung mit Sauerstoff und nutritiven Substanzen nicht mehr aus. Nachfolgend wird durch Neoangiogenese die weitere Versorgung mit Nährstoffen für die Progression der Metastase sichergestellt [11, 12].

1.2 Migration und Invasion

Die Zellmigration ist Voraussetzung für viele physiologische Prozesse wie die Morphogenese, Wundheilung, Immunabwehr, ebenso wie für pathologische Prozesse [13], wie Tumorinvasion und Metastasierung. Der Bewegungsapparat von Tumorzellen unterscheidet sich von dem normaler Zellen v.a. durch die gestörte Antwort auf Stoppsignale, wie Adhärenzfaktoren. Nachdem Tumorzellen aus dem primären Zellverband gelöst werden, bleiben sie ständig in Bewegung, um sich durch effektive Migration im Körper verteilen zu können [14]. Aus diesem Grund stellt die Motilität ein äußerst interessantes Ziel für Tumortherapien dar [10, 15].

1.2.1 Migration

Die Bewegung ist ein komplexer Prozess biophysikalischer Vorgänge. Vereinfacht kann die Migration durch vier Phasen beschrieben werden: gerichtete Streckung der Membran mit Ausbildung von Lamellipodien, Stabilisierung durch Adhäsion der Zelle an die Matrix, Zytoskelett-Reorganisation und transzelluläre Kontraktion sowie das Loslösen und Hinterherziehen des Zellkörpers. Durch die Wiederholung dieser Ereignisse erfolgt die Fortbewegung der Zelle [16].

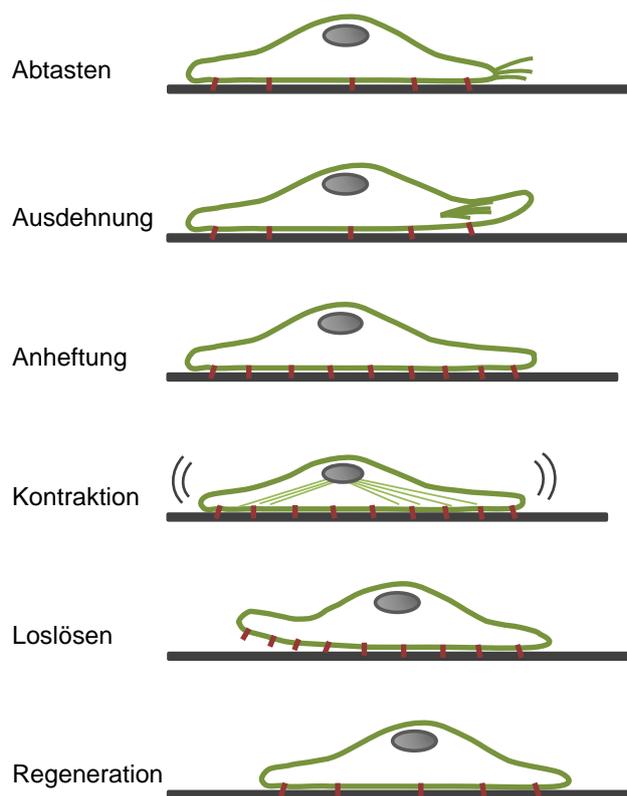


Abbildung 1: Skizzierung der Zellmigration in sechs Schritten: (1) Abtasten durch Filopodien; (2) Ausdehnen des Zellkörpers; (3) Anheftung an die Matrix; (4) durch Stressfasern ausgelöste Kontraktion des Zellkörpers; (5) Loslösen des hinteren Zellteils; (6) Regeneration der Komponenten der Adhäsion und der Signalweiterleitung. Modifiziert nach [17].

Die Beweglichkeit von Zellen wird durch intrinsische und extrinsische Faktoren bestimmt. Intrinsisch wird die Bewegung durch das Aktinzytoskelett geregelt, wohingegen extrinsische Faktoren wie Konzentrationsgradienten für die Gerichtetheit der Bewegung von Zellen verantwortlich sind. Besteht ein Konzentrationsgradient, so spricht man von Chemotaxis, ist ein Konzentrationsgleichgewicht der chemotaktisch wirksamen Substanzen vorhanden, handelt es sich um ungerichtete, zufällige chemokinetische Bewegungen [18].

Molekular wird die Motilität von Zellen durch unterschiedliche Signalwege, wie den EGFR-Signalweg, Integrine und durch Adhäsionsrezeptoren kontrolliert. Motilitätsfördernde Chemokine und Wachstumsfaktoren induzieren und erhalten die Migration durch promigratorische Signaltransduktion über Phosphatidylinositol 3' Kinase (PI3K-), RAC- und RHO-Signalwege. Die Aktivierung des EGFR-Signalwegs führt zu erhöhter Zellmotilität [10, 19, 20]. Die Integrin-unterstützte Motilität ermöglicht die Tumordinvasion; Wachstumsfaktor- und Zytokin-induzierte Motilität unterstützt sie [10].

Nicht nur die Invasion ist abhängig von der Motilität, sondern auch die Metastasierung. In Mammakarzinomen von Ratten konnte gezeigt werden, dass sich Zellen von Tumoren mit hohen Metastasierungsraten mit deutlich höherer Geschwindigkeit bewegen, also motiler sind, als solche von Tumoren mit niedrigen Metastasierungsraten [21].

Es werden drei Arten der zellulären Fortbewegung unterschieden: amöboide Migration, mesenchymale Migration und kollektive Bewegung von epithelialen Gewebeverbänden. Die amöboide Migration entspricht einem Gleiten der Zelle durch das Gewebe. Trifft die Zelle auf Hindernisse, verformt sie sich und gleitet weiter. Bei dieser Art der Migration werden kaum affine Kontakte mit ECM-Bestandteilen geknüpft. Bei der mesenchymalen Migration binden Zellen an Bestandteile des Bindegewebes. Durch die Bindung kommt es zu Spannungen, die auf das Aktinzytoskelett wirken, wodurch die Bewegung zustande kommt. Die kollektive Bewegung in epithelialen Gewebsverbänden wird von Karzinomzellen bevorzugt, da der Verband u.a. Schutz vor Apoptose bietet [22].

1.2.2 Invasion

Um invadieren zu können, muss eine Subpopulation von Tumorzellen bestimmte Fähigkeiten aufweisen. Dazu gehört, die ECM zu erkennen und diese durch proteolytische Degradation zu modifizieren. Zudem müssen die Zellen aktiv durch den Matrix-Raum migrieren um schließlich an einer ektopischen, aber angrenzenden Stelle zu proliferieren [23].

Die Degradation der ECM durch Tumorzellen ist Voraussetzung für die Invasion. Es gibt zwei unterschiedliche zelluläre Mechanismen, die die Invasion und Migration durch die ECM ermöglichen: der zelluläre Katabolismus der ECM durch enzymatische Spaltung der ECM-Komponenten Kollagen, Fibronectin und Proteoglykan, sowie eine zellulär-physikalische Neuordnung und Umorientierung des Kollagens durch von Zellen ausgelöste Zugkräften [24, 25].

In einer Studie mit Magenkarzinomen wurde gezeigt, dass eine EGFR-Überexpression mit der Invasion korreliert. So wiesen 38 von 130 fortgeschrittenen invasiven Tumoren eine Überexpression von EGFR auf, wohingegen keiner der 26 nicht-invasiven Tumoren im Frühstadium eine EGFR-Überexpression aufwies [26].

1.3 Magenkarzinom

1.3.1 Epidemiologie

Das Magenkarzinom ist mit geschätzten 989.000 Neuerkrankungen im Jahr 2008 nach Lungen-, Mamma- und Kolorektalkarzinomen unabhängig vom Geschlecht die vierthäufigste Tumorerkrankung weltweit. Somit sind, bei einer Gesamtzahl an Tumorneuerkrankungen von 12,7 Millionen, 7,8 % aller Tumorneuerkrankungen Magenkarzinome (Abbildung 2). Die meisten der Magenkarzinomfälle treten in Entwicklungsländern und Ost-Asien auf. Zu den Hochrisikogebieten zählen China und Japan, Osteuropa und Gebiete in Zentral- und Südamerika. Im Gegensatz dazu sind die Inzidenzraten in Südasien, Nord- und Ostafrika, Nordamerika, Australien und Neuseeland sehr niedrig. Die altersstandardisierten Inzidenzraten sind bei Männern ungefähr doppelt so hoch wie bei Frauen [27, 28]. In Deutschland stand das Magenkarzinom im Jahre 2008 an sechster (Männer) bzw. achter (Frauen) Stelle der Krebsneuerkrankungen mit einer Gesamt-Inzidenz von ca. 16.000 Fällen. Davon traten 9.210 bei Männern und 6.660 bei Frauen auf [29].

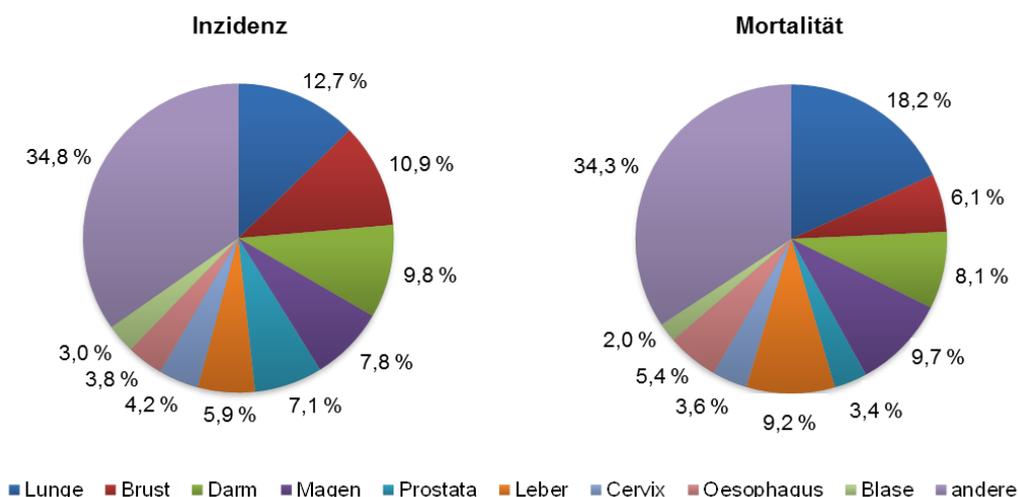


Abbildung 2: Inzidenz und Mortalitätsraten. Die Diagramme zeigen die geschätzte Prozentzahl an Krebserkrankungen sowie die geschätzte Anzahl krebserkrankter Todesfälle. Die Prozentangaben beziehen sich auf beide Geschlechter sowie alle Altersstufen weltweit. Das Magenkarzinom ist die vierthäufigste Krebserkrankung und steht an zweiter Stelle der krebserkrankten Todesursachen weltweit (Modifiziert nach GLOBOCAN 2008).

Obwohl die Inzidenz-Raten seit ungefähr 30 Jahren abnehmen, gehört das Magenkarzinom immer noch zu den häufig auftretenden tumorbedingten Todesursachen. Weltweit gesehen steht das Magenkarzinom sowohl bei Frauen als auch bei Männern mit insgesamt 738.000 Fällen an zweiter Stelle der krebserkrankten Todesursachen [27]. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt in Deutschland bei Männern 71 und bei Frauen 76 Jahre [29].

Da Magenkarzinome meist in einem späten Stadium diagnostiziert werden, sind die Überlebensraten im Vergleich zu anderen Karzinomen gering. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beim fortgeschrittenen metastasierenden Magenkarzinom liegt unter 10 % [30].

1.3.2 Ätiologie

1.3.2.1 Risikofaktoren

Es gibt verschiedene Risikofaktoren, die möglicherweise zur Entstehung eines Magenkarzinoms beitragen. Dazu gehören ernährungs-, umwelt- und krankheitsbedingte sowie hereditäre Risikofaktoren. In unterschiedlichen epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass die Ernährung einen Einfluss auf die Entstehung von Magenkarzinomen haben kann, u.a. wird der Verzehr von stark gepökelten, gesalzenen und geräucherten Lebensmitteln sowie Alkoholkonsum als mögliche Ursachen genannt [31-33]. Durch unausgewogene und ungesunde Ernährung kann es zu einer Entzündung der Magenschleimhaut, chronisch atrophischer Gastritis und schließlich zu Magengeschwüren kommen, die als Vorstufen des Magenkarzinoms diskutiert werden. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte Krankheiten wie chronisches Sodbrennen oder die gastroösophageale Refluxkrankheit das Risiko für Tumoren im gastroösophagealen Bereich erhöhen. Weitere Risikofaktoren sind u.a. Rauchen und das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [29].

H. pylori ist ein gramnegatives gebogenes Stäbchen, das den Magen besiedelt. Das Bakterium, aufgrund seiner Ähnlichkeit zu *Campylobacter* anfangs *Campylobacter pyloris* genannt, wurde in den 1980er Jahren entdeckt und mit dem Auftreten von Gastritis assoziiert [34, 35]. *H. pylori* ist verantwortlich für unterschiedliche Magenerkrankungen wie Magengeschwüre und Gastritis, auf deren Basis Adenokarzinome entstehen können. Die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) stuft *H. pylori* im Jahr 1996 als Kanzerogen der Stufe 1 ein [36]. Sechzehn Jahre später bestätigte die IARC die damalige Einteilung von *H. pylori* als Kanzerogen der Stufe 1 durch nachgewiesene Karzinogenität von chronischen Infektionen mit *H. pylori* beim distalen Magenkarzinom und indolenten (low-grade) B-Zell MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) Magenlymphom [37]. Es wurde gezeigt, dass *H. pylori* phänotypische Veränderungen induziert, die in einem schrittweisen Prozess, dem sogenannten „Correa-Modell“, von einer *H. pylori*-induzierten Gastritis bis hin zur Ausbildung eines Adenokarzinoms voranschreiten können: *H. pylori*-induzierte Gastritis, chronisch atrophische Gastritis, intestinale Metaplasie, Dysplasie und schließlich die Entwicklung von Magenkarzinomen, v.a. des invasiven Typs [38, 39]. Durch die veränderte Magensäuresekretion und einen erhöhten pH-Wert im Magen, bedingt durch Gastritis und Atrophie, kommt es zu einer Veränderung der Magenflora, wodurch sich anaerobe Bakterien im Magen ansiedeln können. Diese Bakterien produzieren aktive Reduktasen, die Nitrat aus der Nahrung in Nitrit umwandeln, welches

wiederum mit Aminen, Amiden und Harnstoff karzinogene N-Nitroseverbindungen produzieren kann [32, 40].

Mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *H. pylori* infiziert, ein Großteil davon in Entwicklungsländern. *H. pylori* siedelt sich im Magen an und heftet sich dort an das mukosale Epithel. Erfolgt keine antibakterielle Behandlung, bleibt die Infektion lebenslang bestehen [41, 42]. Die durch *H. pylori* bedingten Magenkarzinomfälle werden auf 60 - 70% aller Magenkarzinome geschätzt [43].

H. pylori besitzt einige Virulenzkomponenten, eine der wichtigsten und best untersuchten ist die Zytotoxin-assoziierte Gen-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) und deren Virulenzfaktor Zytotoxin-assoziiertes Gen A (*CagA*). *CagA* wird durch das Bakterium in die Epithelzellen des Wirts injiziert. Über Tyrosinphosphorylierungen durch Src-Kinasen des Wirts kann das Protein aktiviert werden. Phosphoryliertes *CagA* beeinflusst über Zielmoleküle des Wirts unterschiedliche zelluläre Antworten, die zur Entwicklung von Karzinomen beitragen können [41, 44, 45].

1.3.2.2 Genetische Prädisposition und molekulare Alterationen

Ungefähr 5-10 % der Magenkarzinome weisen einen hereditären familiären Hintergrund auf [38, 46, 47]. Von hereditären Magenkarzinomen sind insbesondere Familien mit Keimbahnmutationen in folgenden Genen betroffen: *STK11* (Serin-Threonin Protein-Kinase 11, Peutz-Jeghers-Syndrom) [48, 49], *TP53* (Tumorsuppressorgen 53, Li-Fraumeni-Syndrom) [48, 50] und *BRCA2* (*Breast Cancer Gene 2*) [48, 51].

Mutationen im E-Cadherin-Gen *CDH1* treten sowohl als Keimbahnmutationen als auch als somatische Mutationen beim diffusen Magenkarzinom auf [48, 52]. Keimbahnmutationen in *CDH1* wurden erstmals in einer neuseeländischen Familie, in der schon in frühen Jahren diffuse Magenkarzinome auftraten, nachgewiesen [52]. Durch diese Keimbahnmutationen kommt es zu einer autosomal dominanten Prädisposition für Magenkarzinome, die als *hereditary diffuse gastric carcinoma* (HDGC) bezeichnet wird [53, 54].

Neben *CDH1*-Mutationen sind weitere Keimbahnmutationen für die Karzinogenese im Magen verantwortlich. Keimbahnmutationen der *Mismatch Repair Gene* *hMLH1* oder *hMSH2* führen zum HNPCC- (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) Syndrom, bei dem Magenkarzinome des intestinalen Typs manifestiert sein können [47]. Personen mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP; verursacht durch Keimbahnmutation von *adenomatous polyposis coli*, *APC*) haben ebenso ein erhöhtes Risiko an Magenkarzinomen zu erkranken [49, 55].

Ungefähr 90 - 95 % aller Magenkarzinome treten sporadisch auf. Die Karzinogenese wird durch unterschiedliche molekulare Mechanismen beeinflusst. Hierzu zählen Mutationen, Amplifikationen und Überexpression typischer Gene und Proteine. Besonders häufig von Alterationen betroffen sind Onkogene, Tumorsuppressorgene, Zelladhäsionsmoleküle, Zellzyklusregulatoren, Wachstumsfaktoren

und Zytokine. Außerdem kann die genetische Instabilität und die Aktivierung des Telomerase-Gens zur Karzinogenese im Magen beitragen [32, 38, 56, 57].

Zur Entstehung des diffusen und andererseits des intestinalen Typs tragen unterschiedliche genetische Alterationen bei. Bei gut differenzierten Tumoren des intestinalen Typs fördern Mutationen in *p53* und *K-ras* die Ausbildung eines Adenoms, im weiteren Verlauf treten verstärkt *APC*-, *p53*- und *c-Met*- (Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor Onkogen) Mutationen auf, die zur Entstehung eines frühen Karzinoms beitragen. Amplifikationen von *c-erbB2* und Überexpression von EGFR wurden v.a. bei der Metastasierung beobachtet. Cadherin-Verluste, sowie Amplifikationen von *K-sam* und *c-Met* treten v.a. bei Tumoren des diffusen Typs auf [58, 59]. Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung molekularer Veränderungen des diffusen und intestinalen Magenkarzinoms geordnet nach der Reihenfolge ihres Auftretens in den einzelnen Tumorstadien.

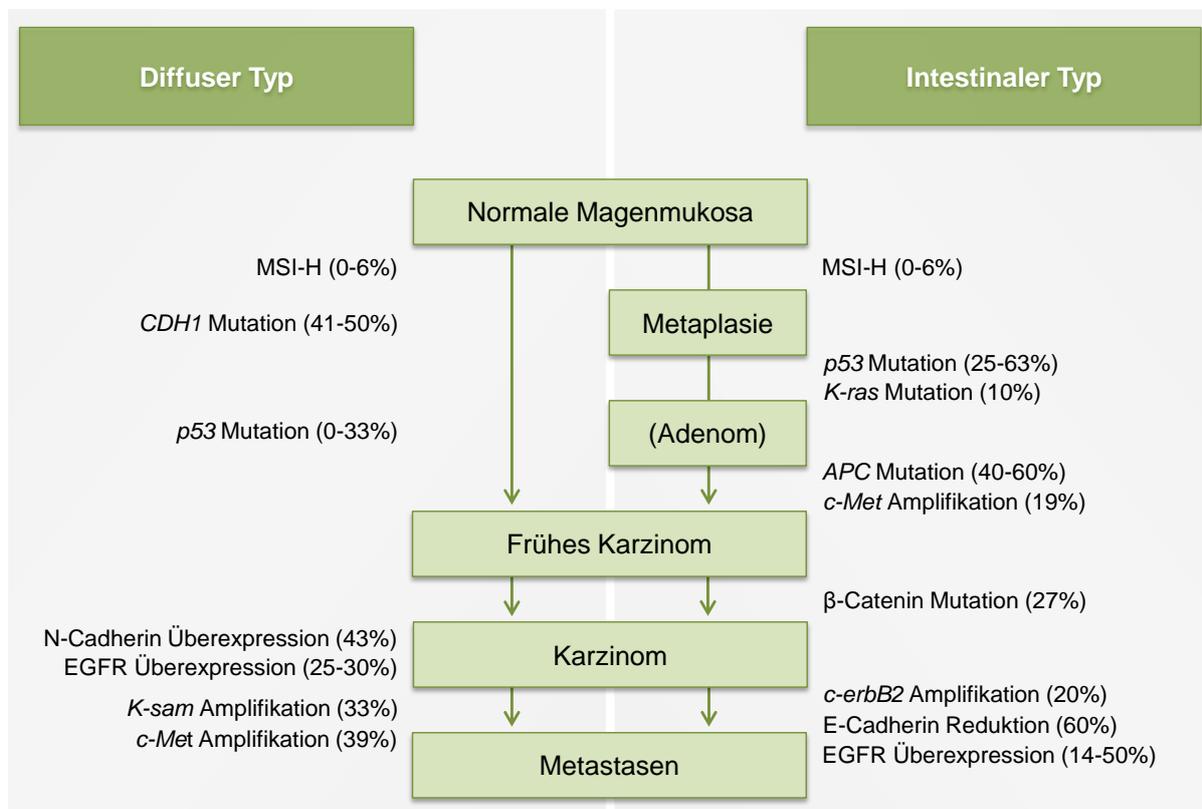


Abbildung 3: Genetische Alterationen des Magenkarzinoms. Die molekularen Änderungen unterscheiden sich in den beiden histologischen Typen des Magenkarzinoms nach Laurén. Die Veränderungen - Mutation, Amplifikation und Überexpression - sind nach ihrem Auftreten in den jeweiligen Stadien der Tumorgenese geordnet. Die angegebenen Prozentsätze stellen die Häufigkeit der jeweiligen Veränderung dar. Abkürzungen: *APC*, adenomatous polyposis coli; *c-erbB2*, v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homologue 2; *c-Met*, MET Proto-Onkogen; EGFR, epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor; *K-ras*, v-Kiras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue; *K-sam* kodiert für Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 2; MSI-H, hohe Mikrosatelliten Instabilität; *p53*, Tumorprotein *p53*. Modifiziert nach [59].

1.3.3 Pathologie und Klassifizierung

Der Magen besteht anatomisch aus fünf Abschnitten: dem Mageneingang (*Pars cardiaca*) mit dem Magenmund (*Ostium cardiacum*) am Übergang des Ösophagus, dem Magenrund (*Fundus ventriculi*), dem Magenkörper (*Corpus ventriculi*), dem Vorraum (*Antrum*) und dem Pförtner (*Pylorus*) (Abbildung 4).

Im Magen treten vor allem Adenokarzinome auf. Hauptsächlich kommen diese proximal (*cardia*) und distal (*non-cardia*) vor. Mesenchymale Tumoren, primäre Lymphome und Karzinoide treten im Magen seltener auf (Roder et al., 1998).

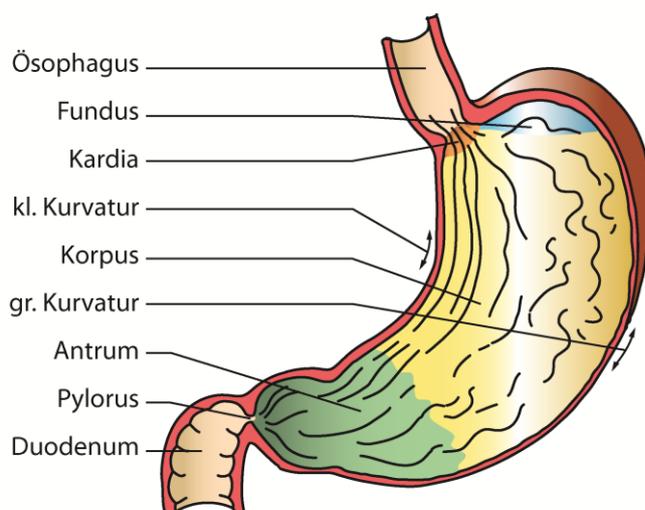


Abbildung 4: Anatomie des Magens. Der Magen befindet sich im Gastrointestinaltrakt zwischen Ösophagus und Duodenum. Er wird in fünf anatomisch und histologisch differenzierte Bereiche eingeteilt: Kardie, Fundus, Korpus, Antrum und Pylorus. Die Abbildung wurde von Dr. L. Bauer zur Verfügung gestellt. (©Lukas Bauer, 2013)

Magenkarzinome können nach makroskopischen und histologischen Aspekten eingeteilt werden. Neben der UICC- (*Union internationale contre le cancer*) Einteilung, die durch die TNM-Klassifikation definiert wird, gibt es weitere makroskopische (Borrmann-Klassifikation) und histologische Klassifikationen (Klassifikation nach Laurén, WHO- (*World Health Organization*) Klassifikation).

Die TNM-Klassifikation stuft Karzinome nach deren Fortschritt in unterschiedliche Stadien ein, dabei steht T für die Größe des Primärtumors (TX, Tis, T0-T4), N für das Vorkommen von regionalen Lymphknotenmetastasen (NX, N0-N3) und M für das Vorhandensein von Fernmetastasen (MX, M0, M1). Anhand dieser international standardisierten Einstufung eines Tumors wird oft die weitere Therapie für den Patienten bestimmt [32].

Die sogenannte Borrmann-Klassifikation bezieht sich auf makroskopisch sichtbare Eigenschaften und teilt Tumoren in vier Typen ein. Dabei sind Magentumoren vom Typ 1 polypöse und gut abgrenzbare

Tumoren, aus welchen sich Typ 2 Tumoren entwickeln können. Diese sind durch Ulzerationen und scharf begrenzte Ränder charakterisiert. Typ 3 Tumoren hingegen weisen keine gut begrenzten Ränder, aber Ulzerationen auf. Nicht ulzerierte Tumoren mit unscharfem Rand werden als Typ 4 Tumoren bezeichnet [40].

Neben dieser makroskopischen Klassifikation nach Borrmann gibt es weitere Möglichkeiten, Magentumoren histologisch einzuteilen, wie z.B. Grad der Differenzierung, Wachstumsstruktur oder auch die unterschiedliche Adhäsivität der Tumorzellen. Die WHO-Klassifikation unterteilt Karzinome nach deren Wachstumsstruktur in tubuläre, papilläre und muzinöse Adenokarzinome sowie in Siegelringzellkarzinome [32].

Eine weitere histologische Klassifikation von Magenkarzinomen ist die Klassifikation nach Laurén, bei der Tumoren nach dem Adhäsions- und Wachstumsverhalten der Tumorzellen differenziert werden. Dabei werden Magenkarzinome in Karzinome des diffusen und des intestinalen Typs eingeteilt. Außerdem wird eine Mischform der beiden Typen beschrieben. Ein Magentumor des intestinalen Typs wächst polypös innerhalb einer Drüsenstruktur, wobei die Tumorzellen einen hohen Differenzierungsgrad aufweisen. Der diffuse Typ hingegen ist ein nur schwach begrenzter Tumor, der infiltrativ in die Magenwand wächst und stark metastasiert. Die Zellen des diffusen Typs sind wenig differenziert. Patienten mit einem Magenkarzinom des intestinalen Typs haben eine bessere Prognose als diejenigen, die an einem diffusen Magenkarzinom erkrankt sind. Eine spezielle Untergruppe des diffusen Typs stellt das Siegelringzellkarzinom dar [60, 61].

1.3.4 Therapie

Die Diagnose vieler Magenkarzinomfälle wird erst bei lokal fortgeschrittener Erkrankung und damit häufig bereits vorhandener Metastasierung gestellt. Durch diese späte Diagnose liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten auch nach vollständiger Resektion bei ca. 25 % [62, 63]. Nur die komplette Resektion des Magenkarzinoms in einem frühen Stadium stellt eine Möglichkeit der kurativen Behandlung dar [64]. Bei Patienten mit Metastasen führen Chemotherapien zu einem nur mäßigen Effekt, selbst bei Kombination mit Strahlentherapie [49]. Die überwiegend eingesetzte Behandlungsform bei Magenkarzinomen ist die chirurgische Therapie, die die Resektion des Primärtumors mit zusätzlicher Kontrolle der Lymphknoten im Hinblick auf Metastasen, beinhaltet. Da ein Großteil der Magenkarzinome erst in einem späten Stadium diagnostiziert wird, sind die chirurgischen Möglichkeiten, u.a. aufgrund der Metastasierung, begrenzt. So kann bei vielen Patienten keine kurative Therapie mehr erfolgen, sondern es wird eine palliative Therapie durchgeführt [62, 65]. Um die Prognosen für Patienten mit lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen zu verbessern, wurden in den letzten Jahren viele klinische Studien mit unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Viele Studien mit neoadjuvanter Chemotherapie zeigten akzeptable Toxizitäten für die Patienten und zudem

keine erhöhten postoperativen Sterberaten. Zusätzliche positive Effekte waren die Reduktion der Tumorgröße und ein Anstieg des progressionsfreien sowie des Gesamt-Überlebens der Patienten [66-68]. Durch eine Kombinationstherapie mit den Zytostatika Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU) konnte eine signifikante Verbesserung der Überlebensraten erzielt werden [69, 70]. Diese Kombinationstherapie wird deshalb häufig bei der Behandlung von Magenkarzinomen eingesetzt und gilt als Standardtherapie, wenn auch nur 25 - 40 % der Patienten auf die Therapie ansprechen [69, 71-73].

Zusätzlich zur Therapie mit Zytostatika werden neuartige Therapieansätze, sogenannte gezielte molekulare Therapien (*molecular targeted therapies*), eingesetzt. Diese greifen an individuellen tumorassoziierten Signalwegen an [74]. Der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]), der gegen die Rezeptortyrosinkinase (RTK) ErbB2 gerichtet ist, wurde in einer Phase III Studie (ToGA-Studie) in Kombination mit Chemotherapie bei Patienten mit inoperablen lokal fortgeschrittenen, rezidivierenden und/oder metastasierenden ErbB2-positiven Magenkarzinomen eingesetzt. Patienten, die zusätzlich Trastuzumab verabreicht bekamen, wiesen ein signifikant längeres Überleben (13,8 Monate vs. 11,1 Monate) auf als Patienten, die ausschließlich mit Chemotherapie behandelt wurden [75, 76]. Trastuzumab ist seit 2010 von der Europäischen Arzneimittelagentur EMA für die Erstlinienbehandlung des metastasierten ErbB2-positiven Magenkarzinoms und des Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs für die Behandlung von fortgeschrittenen, metastasierenden Magenkarzinomen bei Patienten, die eine Proteinüberexpression oder eine Genamplifikation von ErbB2 aufweisen, zugelassen [66, 75, 77]. Ein weiterer monoklonaler Antikörper, Cetuximab (Erbix[®]), der gegen die RTK EGFR gerichtet ist, wurde in mehreren Phase II Studien als vielversprechend eingestuft; eine Phase III Studie allerdings zeigte keinen zusätzlichen Nutzen von Cetuximab mit Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie [78] (siehe auch 1.4.4.1).

1.4 Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor

1.4.1 Die Familie der ErbB-Rezeptoren

Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) ist eines von vier Mitgliedern der Familie der ErbB-Rezeptoren. Zu den ErbB-Rezeptoren gehören neben EGFR (ErbB1/Her1), auch ErbB2 (Her2), ErbB3 (Her3) und ErbB4 (Her4). Diese Rezeptoren sind Transmembranproteine mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität und zählen zu den Typ-1-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die einkettigen allosterischen Zelloberflächen-Moleküle sind strukturell sehr ähnlich und bestehen aus drei Domänen: einer extrazellulären Ligandenbindedomäne, einer hydrophoben Transmembran-Helix, die für die Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran verantwortlich ist, und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase, die unterschiedliche Autophosphorylierungsstellen besitzt. EGFR hat ein Molekulargewicht von 170 kDa. Die Sequenzidentität innerhalb der ErbB-Familie variiert zwischen 37 % für EGFR und ErbB3 und 49 % für EGFR und ErbB2 [79]. Eine Aktivierung der ErbB-Rezeptoren erfolgt durch die Bindung von Liganden, einer darauffolgenden Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren und der anschließenden Autophosphorylierung der Tyrosinketten der zytoplasmatischen Domäne. Liganden, die für die Aktivierung verantwortlich sind, werden autokrin oder parakrin sezerniert.

EGFR und ErbB4 sind funktionelle Rezeptoren, wohingegen ErbB2 und ErbB3 nicht für sich alleine stehend funktionell sind, da ErbB2 keine Liganden binden kann und ErbB3 eine inaktive Tyrosinkinase-Domäne besitzt. Dadurch sind diese Rezeptoren für die Aktivierung auf Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie angewiesen [80]. Durch die aktivierte Konformation von ErbB2, die kristallographisch der Konformation eines ligandengebundenen Rezeptors ähnelt, ist ErbB2 zur Dimerisierung fähig [81].

Die Liganden der ErbB-Familie können in drei Gruppen eingeteilt werden: Der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*; EGF), der transformierende Wachstumsfaktor- α (*transforming growth factor- α* ; TGF- α) und Amphiregulin (AREG) binden spezifisch an EGFR. Die zweite Gruppe bindet sowohl an EGFR als auch an ErbB4. Dazu gehören Betacellulin (BTC), Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor (*heparin-binding EGF-like growth factor*; HB-EGF) und Epiregulin (EREG). Die Neureguline (NRGs) bilden die dritte Gruppe, die in zwei Untergruppen gegliedert werden kann: NRG1 und NRG2 binden an ErbB3 und ErbB4, NRG3 und NRG4 binden nur an ErbB4. Keiner der bekannten Liganden bindet an ErbB2 [82, 83]. Epigen, das eine deutlich geringere Affinität als die anderen Liganden aufweist, bindet an EGFR, ErbB3 und ErbB4 in der Anwesenheit von ErbB2 [84]. EGFR geht bevorzugt eine Homodimerisierung mit EGFR sowie Heterodimerisierungen mit ErbB2 und ErbB3, jedoch selten mit ErbB4, ein [85].

In nicht-karzinogenen Fibroblasten reicht die Expression von EGFR von 40.000 bis 100.000 Rezeptoren pro Zelle [86]. In vielen Tumoren wird EGFR hingegen stark überexprimiert [87].

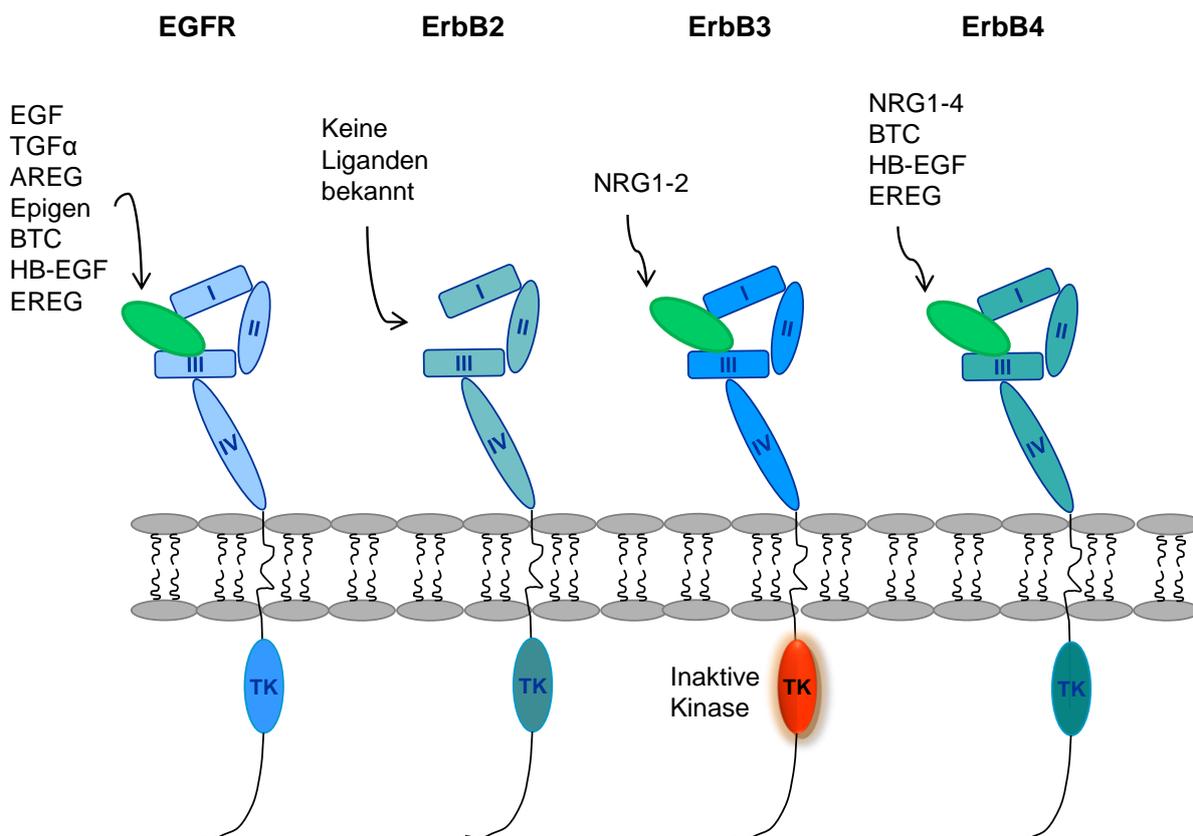


Abbildung 5: Die Mitglieder der ErbB-Familie und deren Liganden. EGFR und ErbB4 sind vollständig funktionelle Rezeptoren. Für ErbB2 wurden bisher noch keine Liganden identifiziert und ErbB3 weist eine inaktive Kinase auf [88, 89].

1.4.2 Die Aktivierung des EGFR

Die extrazelluläre Domäne besteht aus vier Subdomänen (I, II, III, IV), von denen die Domänen I und III für die Ligandenbindung verantwortlich sind [90-92]. Durch die Ligandenbindung erfolgt eine strukturelle Veränderung der Subdomäne II, in der durch eine Dimerisierungsschleife die Rezeptordimerisierung ermöglicht wird. Bei Ligandenabwesenheit verweilt der Rezeptor durch intramolekulare Interaktionen der Subdomänen II und IV im nicht gestreckten Status und kann somit nicht dimerisieren [79, 93, 94].

Die Dimerisierung von Rezeptoren führt durch Autophosphorylierungen zur Aktivierung der Tyrosinkinasen in der intrazellulären Domäne [79, 85].

Phosphoryliertes Tyrosin dient als Bindestelle für mehrere Adaptor- und Signalmoleküle, die über Phosphotyrosinbindedomänen (*phosphotyrosine binding domains*; PTBs) und SH2-Domänen (*Src-homology 2 domains*) zur Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen führen [82, 85, 89]. Es sind 20 Phosphotyrosinenden als spezifische Bindestellen für mehr als 100 mit dem EGFR interagierende Proteine identifiziert, die jeweils spezifische Signalwege regulieren [95].

Die effektive Menge an Rezeptoren auf der Membranoberfläche wird durch die intrazelluläre Produktion, den Umsatz von Rezeptoren an der Membranoberfläche und die Kompartimentierung von Rezeptoren innerhalb der Membran reguliert. Sind keine Liganden vorhanden, so wird die Anzahl unstimulierter Rezeptoren durch Produktion und fortlaufendes Recycling der Rezeptoren reguliert. Nach Stimulation der Rezeptoren führt die ligandenabhängige Internalisierung der Rezeptoren entweder zur Wiederverwertung oder zum Abbau. Dieser Schritt hängt von der Art des Rezeptors, der Ligandenkonzentration und/oder der engmaschigen räumlichen Kontrolle durch Rezeptoren und Endozytose-Mechanismen ab [96].

Nach Aktivierung durch Ligandenbindung wird EGFR fünf- bis zehnfach schneller internalisiert und degradiert als in inaktivem Zustand. Die Geschwindigkeit der Internalisierung von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 dagegen ist unabhängig von einer Ligandenbindung [97-99].

Die Reduktion des Signals wird in erster Linie durch die transkriptionsunabhängige Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes über Clathrin-umhüllte Einstülpungen der Zellmembran erreicht [96, 98, 100].

Durch unterschiedliche Signalwege wird der Rezeptor entweder recycelt und zurück an die Zellmembran transportiert oder durch Ubiquitinierung für die lysosomale Degradation markiert.

Andere Mechanismen zur Reduktion des ligandeninduzierten EGFR-Signals sind Dephosphorylierung, Ligandenabbau oder Kinaseninhibierung [98].

Über die Abspaltung der Ektodomäne, das sogenannte *ectodomain shedding*, bei der die Liganden proteolytisch von der Membran gespalten werden, erfolgt die Freisetzung löslicher Liganden. Die Liganden können dann auf autokrine, parakrine oder juxtakrine Weise auf die Zellen wirken [90, 101]. Neben den löslichen Liganden ist auch ein juxtakriner Mechanismus bekannt, bei dem membranständige Liganden die Rezeptoren von Nachbarzellen aktivieren können [90, 102]. Unterschiedliche biochemische Eigenschaften der Liganden, wie Rezeptoraffinität und Rezeptorbindungsspezifität, wirken sich auf die Signalstärke und die Dauer des Signals aus. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Liganden-Rezeptor-Interaktion ist die pH-Sensibilität [103]. EGF induziert die Degradierung des EGFR, wohingegen AREG, EREG und TGF- α das Recycling des Rezeptors induzieren [104, 105].

Neben der ligandenabhängigen Aktivierung der ErbB-Rezeptoren sind auch ligandenunabhängige Aktivierungen möglich. Beispielsweise kann eine konstitutive Aktivierung der Rezeptoren durch Mutationen oder strukturelle Veränderungen, wie sie oft bei malignen Tumoren vorkommen, vorliegen [106, 107]. Außerdem ist bekannt, dass eine Überexpression des Urokinase-Typ Plasminogen-aktivierenden Rezeptors (uPAR) über eine Interaktion mit $\alpha 5\beta 1$ -Integrin den EGFR aktiviert [108].

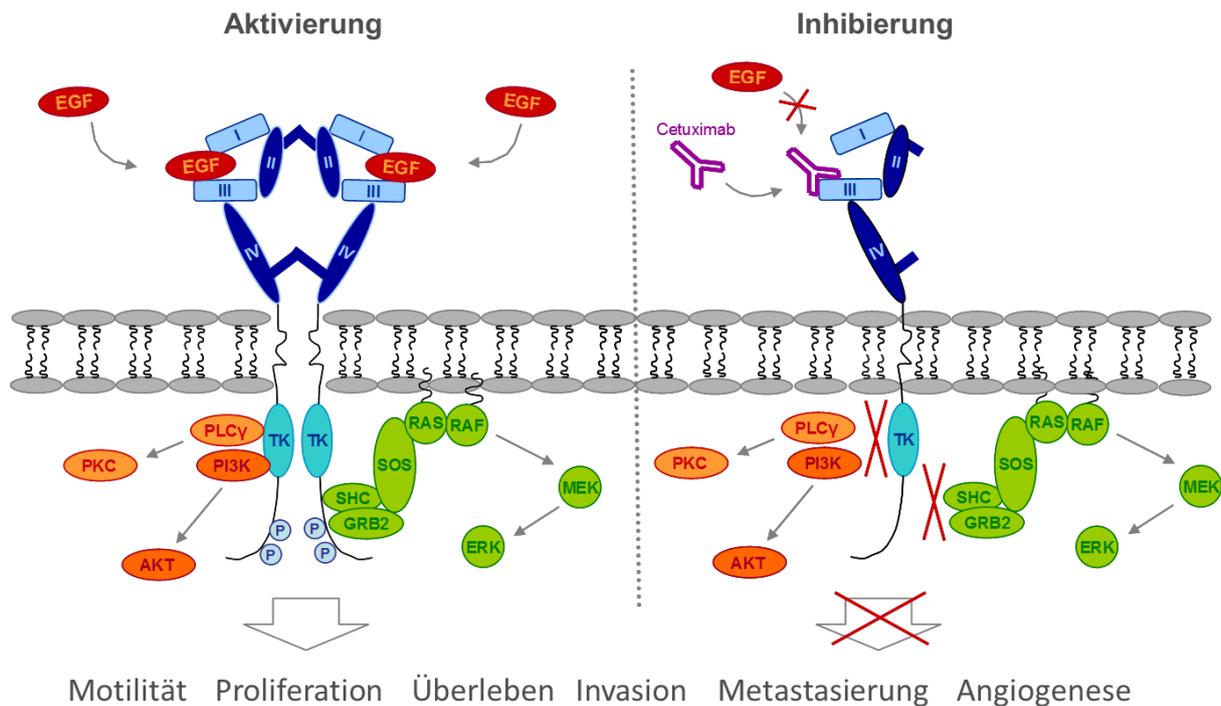


Abbildung 6: Aktivierung und Inhibierung des EGFR. EGFR ist ein Transmembranprotein, das aus drei Domänen besteht: einer extrazellulären Domäne, einer Transmembran-Domäne sowie einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Die extrazelluläre Domäne besteht aus vier Subdomänen, von denen die Subdomänen I und III für die Ligandenbindung verantwortlich sind. Die Bindung von Liganden, wie EGF, führt anschließend zur Rezeptor-Dimerisierung, Autophosphorylierung und somit zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, die u.a. in die Motilität und Proliferation der Zellen involviert sind. Der monoklonale Antikörper Cetuximab bindet an die Subdomäne III der extrazellulären Domäne und besetzt dadurch die Ligandenbindestelle. Dadurch werden die Dimerisierung und die nachfolgende Autophosphorylierung gehemmt. Modifiziert nach [89, 109].

1.4.3 EGFR und dessen nachgeschaltete Signalwege

Durch EGFR wird eine Vielzahl von nachgeschalteten Signalwegen reguliert. Die Induktion dieser nachgeschalteten Signalwege hängt von den Liganden, den Dimerisierungspartnern und den Signalmolekülen, die an die unterschiedlichen Autophosphorylierungsstellen der zytosomatischen Domäne des EGFR binden, ab. Durch die Vielzahl der Signalwege werden verschiedene biologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose reguliert [82, 85, 110].

Die drei best untersuchten nachgeschalteten Signalwege der ErbB-Rezeptoren sind der Ras-MAPK- (*Ras-mitogen-activated protein kinase*) Signalweg, der PI3K-PKB/AKT- (Phosphatidylinositol 3' Kinase - Protein Kinase B) Signalweg sowie der PLC γ -PKC- (Phosphoinositid-Phospholipase C γ - Protein Kinase C) Signalweg.

1.4.3.1 Ras-MAPK-Signalweg

Die Aktivierung des Ras-MAPK-Signalweges kann durch alle ErbB-Liganden und -Rezeptoren erfolgen. Diese erfolgt entweder direkt über SH2-vermittelte Rekrutierung des Wachstumsfaktor-gebundenen Proteins 2 (*growth factor receptor-bound protein 2*; GRB2) oder indirekt über die PTB-vermittelte Bindung des SHC- (*Src homology and collagen protein*) Adaptors. Der GRB2-assoziierte Guanin-Nukleotid Austauschfaktor Sos (*Son of Sevenless*) aktiviert anschließend Ras über den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) mit Guanosintriophosphat (GTP). Aktiviertes Ras bindet dann an die Raf Kinase, wodurch diese aktiviert wird und ihrerseits eine Kinasen-Kaskade aktiviert. Die Phosphorylierung und dadurch bedingte Aktivierung von Serinresten von MEK1/2 (MAPKK) und Tyrosin- und Threoninresten von Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*; MAPK) führt schließlich zur Aktivierung verschiedener Zytoplasma- und Zytoskelett-Proteine, wie die MAPK-aktivierten Proteinkinasen und die ribosomale p70-S6 Kinase, sowie zur Translokation von MAPK in den Nukleus, wodurch eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren aktiviert wird [111-113].

1.4.3.2 PI3K-PBK/AKT-Signalweg

Die ErbB-Rezeptoren aktivieren PI3K, wodurch die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphats (PIP3) induziert wird. PIP3 wiederum aktiviert AKT, welches sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Funktionen hat. Die ErbB-Rezeptoren stimulieren den PI3K-Signalweg auf unterschiedliche Weisen. So binden EGFR und ErbB2 indirekt an p85, die regulatorische Untereinheit von PI3K, wohingegen ErbB3 und ErbB4 direkte Bindestellen besitzen [111, 114]. AKT fördert das Zellüberleben und blockiert die Apoptose, unter anderem durch die Hemmung des proapoptotischen BAD (BCL2 Antagonist des Zelltodes), der Procaspase 9 und der Transkriptionsfaktoren *Forkhead-Box*-Proteine (FOXO) [111, 115]

1.4.3.3 PLC γ -PKC-Signalweg

PLC γ kann über SH2-vermittelte Bindung an aktivierte EGFR- und ErbB2-Rezeptoren an die Membran rekrutiert werden. PLC γ hydrolysiert Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphat in die Sekundärtransporter Diacylglycerol (DAG) und Inositol Trisphosphat (IP3). Eine IP3-Bindung an Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums führt zur Calciumfreisetzung und somit zu erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration, wodurch unterschiedliche Calcium-abhängige Enzyme aktiviert werden. DAG dient als Cofaktor für die PKC, die ihrerseits zur Zellzyklus-Progression, zur Transformation, Differenzierung und Apoptose führt [111, 116].

1.4.4 Der EGFR und Tumorerkrankungen

Ziel der onkologischen Forschung ist es, u.a. die Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen zu hemmen, aber die Funktion normaler Zellen zu erhalten. Um dies zu erreichen, ist es notwendig die Signalwege, die für die Tumorentstehung von Bedeutung sind, zu analysieren [87].

Der EGFR ist in unterschiedliche Signalwege involviert. Darunter befinden sich die Regulation von Zellproliferation, Motilität, Apoptose, Invasion und Angiogenese [89, 117]. Eine Überexpression oder Amplifikation des EGFR wird häufig in Karzinomen nachgewiesen [118]. Eine hohe EGFR-Expression in Patienten ist häufig mit fortgeschrittenem Tumorstadium, kürzerem Überleben, Resistenz gegenüber Standardtherapien wie hormoneller Therapie, Chemotherapie oder Bestrahlung, und teilweise mit schlechter Prognose assoziiert [119-121].

Eine verstärkte EGFR-Expression kann neben Überexpression und Amplifikationen auch durch erhöhte Ligandenproduktion, Heterodimerisierung und Interaktion mit heterologen Rezeptorsystemen, eine fehlerhafte EGFR-Herunterregulierung oder durch EGFR-Mutationen verursacht werden [89]. Eine Interaktion kann mit unterschiedlichen Rezeptoren und Signalwegen erfolgen, hierzu zählen u.a. die WNT/ β -Catenin-, Notch-, TNF α /IKK/NF- κ B- Signalwege [122] sowie Integrine, E-Cadherin [89] und der hepatozelluläre Wachstumsfaktorrezeptor (c-MET) [123, 124].

Es gibt hauptsächlich zwei Vorgehensweisen, den EGFR-Signalweg im Patienten zu hemmen: einerseits werden monoklonale Antikörper (mAK) eingesetzt, die an der extrazellulären Domäne des EGFR mit den Liganden um die Bindedomäne kompetitieren, andererseits gibt es *small-molecule* EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), die intrazellulär mit Adenosintriphosphat (ATP) um die Bindung an den Rezeptor kompetitieren und dadurch die Autophosphorylierung und die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege blockieren. Monoklonale Antikörper gegen den EGFR sind Cetuximab/Erbitux[®] (siehe auch Kapitel 1.5) und Panitumumab/Vectibix[®], TKI sind Gefitinib/Iressa[®], Erlotinib/Tarceva[®] und Lapatinib/Tyverb[®] [117, 119, 125].

1.4.4.1 EGFR Inaktivierung durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab

Cetuximab/Erbitux[®] ist ein rekombinanter chimärer (Mensch/Maus) monoklonaler Antikörper, der spezifisch an die extrazelluläre Domäne des humanen EGFR bindet, wodurch die Bindung der Liganden inhibiert wird. Es kann somit keine Phosphorylierung und Induktion nachgeschalteter Signalwege erfolgen. Der 152 kDa große Antikörper besteht aus vier Polypeptidketten, je zwei identischen schweren und leichten Ketten, die durch kovalente und nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden [126, 127].

Die spezifische Bindung an die extrazelluläre Domäne des EGFR erfolgt sowohl bei Tumorzellen als auch normalen Zellen [126]. Die Bindung von Cetuximab an EGFR weist eine 50fach höhere Affinität auf als die von EGF an den Rezeptor [109]. Cetuximab bindet an die Subdomäne III der extrazellulären Domäne, wodurch die Bindestellen (Subdomänen I und III) für die natürlichen

Liganden blockiert werden. Zusätzlich blockiert Cetuximab sterisch die Konformationsänderung des geschlossenen EGFR-Monomers in die gestreckte, zur Dimerisierung kompetente Form [109].

Cetuximab ist in Kombination mit Chemotherapeutika seit 2003 für die Behandlung von metastasierenden Kolonkarzinomen sowie seit 2006 für die Behandlung von Kopf- und Halstumoren von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Die *European Medicines Agency* (EMA) hat in den Jahren 2004 und 2008 Cetuximab für diese Indikationen ebenfalls zugelassen. In der Europäischen Union ist die Zulassung auf Kolonkarzinompatienten, die nicht auf eine Irinotecan-haltige Chemotherapie angesprochen haben und die zusätzlich ein *K-ras* Wildtyp (WT)-Gen aufweisen, beschränkt. Im Dezember 2013 erweiterte die EMA die Indikation von Erbitux[®] auf die Behandlung von Patienten mit metastasiertem Kolorektalkarzinom vom *RAS*-WT [128]. Cetuximab wird in der Klinik nach einer anfänglichen Einmaldosis von 400 mg/m² Körperoberfläche einmal pro Woche mit einer Konzentration von 250 mg/m² verabreicht [126, 129].

Mehrere klinische Phase II Studien wiesen auf ein Ansprechen von Magenkarzinompatienten auf Cetuximab hin. In diesen Studien wurde Cetuximab in Kombination mit unterschiedlichen Chemotherapeutika verabreicht. Die Gesamt-Ansprechraten bei Patienten mit Kombinationstherapien lagen um 41 - 65 % höher als bei Patienten mit alleiniger Chemotherapiebehandlung. Die Toxizität der Chemotherapien wurde durch die Zugabe von Cetuximab nicht beeinflusst [130-135].

In einer internationalen Phase III Studie (EXPAND, *Erbitux[®] in combination with Xeloda and cisplatin in advanced esophago-gastric cancer*) wurden 904 Patienten in 164 Zentren von 2008 bis 2010 mit einer Kombinationstherapie bestehend aus Capecitabin (Xeloda[®]), Cisplatin und Cetuximab behandelt. In diesem Studienkollektiv konnte kein zusätzlicher Nutzen durch die additive Gabe von Cetuximab im Vergleich zu einer Behandlung mit Chemotherapie alleine in der Erstlinientherapie bei fortgeschrittenen Magenkarzinomen detektiert werden [78].

1.5 E-Cadherin

1.5.1 Zelladhäsionsmoleküle

Veränderungen in der Zell-Zell- sowie der Zell-Matrix-Adhäsion von Tumorzellen sind wichtig für die Progression von Tumoren. Neben der Vermittlung intrazellulärer Wechselwirkungen sowie von Zell-Matrix-Interaktionen, können Zelladhäsionsmoleküle die Progression von Tumoren auch direkt über die Signaltransduktion modulieren [136].

Zelladhäsionsmoleküle werden in vier Hauptgruppen eingeteilt: Cadherine, Immunglobulin-ähnliche Proteine, Integrine und Selektine. Sie bestimmen die Interaktion zwischen Zellen und unterstützen dadurch die interzelluläre Kommunikation sowie die mechanische Stabilität durch die Ausbildung von *adherens junctions*, *tight junctions*, *gap junctions* sowie Desmosomen [137-139].

1.5.2 Cadherine

Bei der embryonalen Morphogenese, der Organisation des Zytoskeletts, der Migration und der Gewebe-Integrität übernehmen Cadherine wichtige strukturelle Aufgaben und beeinflussen ebenso die Zellmotilität, die Proliferation und die Genexpression über die Regulation von Signalwegen wie den EGFR-Signalweg [140].

Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige Zelladhäsionsmoleküle und umfassen eine Superfamilie mit über 350 Mitgliedern [141]. Die Cadherin-Superfamilie ist definiert durch die charakteristischen 110 Aminosäuren umfassenden Domänen in der Ektodomäne des Proteins und deren Sensitivität gegenüber Calcium [142]. Die Homologie und Anzahl dieser extrazellulären Cadherin (EC) Domänen bestimmt die Unterteilung der Cadherin-Superfamilie in Subfamilien [143]. Die Subfamilien lassen sich einteilen in die klassischen Cadherine, die die wichtigsten Mediatoren der Calcium-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion darstellen, die nicht-klassischen Cadherine, die desmosomale Cadherine beinhalten, sowie eine große Subfamilie von Protocadherinen [136].

Klassische Cadherine sind Glykoproteine mit einer N-terminalen extrazellulären Domäne (Ektodomäne), einer *Singlepass*-Transmembrandomäne und einer C-terminalen intrazellulären Domäne. Sie werden in fünf Mitglieder unterteilt: E- (epitheliale), N- (neurale), P- (plazentale), VE- (vaskulär endotheliale) und R- (retinale) Cadherine. E-Cadherin ist das best untersuchte Cadherin und gilt als Prototyp der klassischen Cadherine. Calcium ist essentiell für die Adhäsionsfunktion der Cadherine, schützt vor dem Abbau des Proteins durch Proteasen [144, 145] und ist nötig für die Faltung und Stabilität der extrazellulären Domäne [146].

1.5.2.1 Cadherin-vermittelte Zelladhäsion

Cadherine sind homophile Zelladhäsionsmoleküle, d.h. die extrazellulären Domänen von gleichen Cadherintypen interagieren. Die Peptidsequenz Histidin-Alanin-Valin (HAV) innerhalb der N-terminalen extrazellulären Domäne ist für die adhäsive Bindung an ein identisches Cadherin-Monomer verantwortlich. Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Monomere in der Plasmamembran Dimere und Oligomere bilden [147], der genaue Mechanismus der Interaktion wird jedoch noch kontrovers diskutiert. In einzelnen Fällen wurden auch heterotype Bindungen zwischen Cadherinen beobachtet [148]. Cadherine bilden nach der Dimerisierung eine Zipper-artige Struktur, die eine starke Adhäsion zwischen den Zellen unterstützt (Abbildung 7). Cadherine sind mit vielen intrazellulären Molekülen, die die intrazelluläre Signalweiterleitung fördern und die Organisation des Aktinzytoskeletts modulieren, verknüpft [149].

1.5.3 E-Cadherin

Wie bereits erwähnt, ist der Prototyp der klassischen Cadherine das E-Cadherin mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Es wurde erstmals in den frühen 1980er Jahren durch verschiedene Autoren in unterschiedlichen Spezies beschrieben [150-154].

E-Cadherin ist neben α -, β - und γ -Catenin ein Hauptbestandteil der *adherens junctions*. α -, β - und γ -Catenine fungieren als Gerüstproteine für E-Cadherin, wodurch dessen C-terminaler Teil der zytoplasmatischen Domäne mit dem Aktinfilament Netzwerk interagiert. E-Cadherin bindet an β -Catenin oder γ -Catenin, welche über α -Catenin mit dem Aktinzytoskelett verbunden werden [155, 156]. Zusätzlich bindet p120-Catenin an die Juxtamembran-Region von E-Cadherin und stabilisiert die Zell-Zell-Adhäsion [157].

1.5.3.1 E-Cadherin-Signaling

Neben der Funktion der Zell-Zell-Adhäsion kann E-Cadherin auch die Signaltransduktion unterschiedlicher Signalwege modulieren [149]. E-Cadherin interagiert mit RTKs, u.a. mit EGFR [158], dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (VEGFR2), dem Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor (FGFR) und MET und ist in der Lage, deren Aktivität und Lokalisation zu beeinflussen. Außerdem kann E-Cadherin die Signalweiterleitung durch Interaktion mit intrazellulären Signalkaskadepartnern, wie Kinasen oder Phosphatasen und durch Interaktion mit Adaptorproteinen beeinflussen [149, 159, 160].

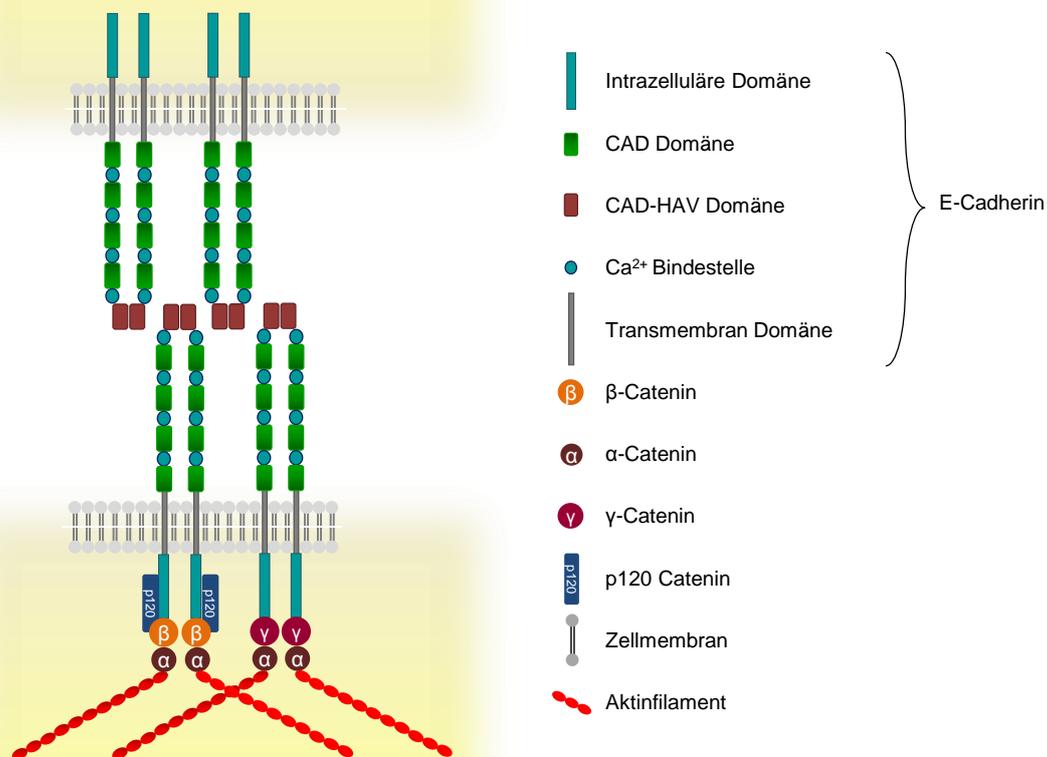


Abbildung 7: E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion. E-Cadherin-Moleküle interagieren durch ein Reißverschlussprinzip. Das Histidin-Alanin-Valin (HAV) Motiv interagiert dabei mit einem E-Cadherin Molekül einer benachbarten Zelle. Der zytoplasmatische Kern Komplex (CCC), der aus α -Catenin, β -Catenin, γ -Catenin und p120 Catenin besteht, verbindet E-Cadherin-Homodimere mit dem Aktinzytoskelett. Modifiziert nach [136].

1.5.3.2 Einfluss von E-Cadherin auf den EGFR-Signalweg

Die Interaktion von RTKs mit E-Cadherin ist bidirektional. So können verschiedene RTKs die E-Cadherin-abhängige Adhäsion inhibieren, andererseits kann E-Cadherin auch die Aktivierung von RTKs wie EGFR und MET durch Reduktion der Rezeptorbeweglichkeit oder der Liganden-Bindungsaffinität hemmen [159, 161].

Das Zusammenspiel von EGFR und E-Cadherin erfolgt über die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin und ist unabhängig von β -Catenin und p120-Catenin [159, 161], obwohl β -Catenin die Interaktion von E-Cadherin und dem EGFR vermitteln kann [158].

Wie bereits erwähnt, wirkt sich die Interaktion von EGFR und E-Cadherin bidirektional auf die nachfolgenden Signalwege aus. Einerseits wurde gezeigt, dass E-Cadherin über EGFR die MAPK aktivieren kann [162], die PI3K-abhängige Aktivierung von AKT bewirkt [163] und über intra-

zelluläre Phosphorylierungen im Adhäsionskomplex den EGFR und dadurch die Signalweiterleitung über MAPK aktivieren kann [164]. Andererseits kann E-Cadherin die Bindung von EGF an den EGFR und damit die Aktivierung des EGFR inhibieren [159]. Außerdem kann der Adhäsionskomplex durch die Aktivierung des EGFR zerstört werden, was zur Endozytose von E-Cadherin führt [165].

1.5.3.3 Die Rolle von E-Cadherin in der Tumorgenese

In verschiedenen Tumorarten, wie dem Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), dem Kolonkarzinom oder dem Urothelkarzinom, wurde gezeigt, dass die Expression von E-Cadherin für das Ansprechen auf die antiproliferative Wirkung von Cetuximab nötig ist [166-169]. In Magenkarzinom-Zelllinien wurden Mutationen im E-Cadherin-Gen *CDH1* mit der Resistenz gegenüber Cetuximab assoziiert [170]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass E-Cadherin bei der Transition vom Adenom zum Karzinom eine bedeutende Rolle spielt [171].

Die Auflösung der Zell-Zell-Adhäsion durch die Zerstörung des Cadherin-Catenin-Komplexes oder der Verlust der E-Cadherin-Funktion können über die Induktion einer epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) zur Metastasierung von Tumorzellen führen [165]. Der Verlust oder die Herunterregulation von E-Cadherin wird oft mit Tumorinvasion und Metastasierung assoziiert [171-176], weswegen E-Cadherin als Tumor- und Invasions-suppressor beschrieben wurde [172, 173].

1.5.3.4 E-Cadherin Mutationen beim Magenkarzinom

Somatische E-Cadherin-Mutationen werden als die am häufigsten auftretenden Mutationen in diffusen Magenkarzinomen gesehen. Es wurde gezeigt, dass Mutationen in *CDH1* in ca. 50 % der diffusen Magenkarzinome vorkommen. Diese inaktivierenden Mutationen liegen vor allem in sogenannten *Hotspot*-Regionen, im Fall des *CDH1* auf den Exons 8-10 und verursachen u.a. *in-frame* Deletionen [176-178]. Die meisten Mutationen betreffen die Calciumbindestellen auf der extrazellulären Domäne und führen im Zellkulturmodell zu reduzierter Adhäsion und verstärkter zellulärer Motilität [177, 179-182], ebenso wie zu verminderter tumorsuppressiver Funktion [183].

Wie bereits erwähnt, wurde der funktionelle Verlust von *CDH1* mit einer Prädisposition für das diffuse Magenkarzinom assoziiert [52]. Inaktivierende Keimbahnmutationen in *CDH1* charakterisieren das hereditäre diffuse Magenkarzinom [54].

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

EGFR ist ein zentraler Regulator der Zellproliferation und Zellmigration und stellt aufgrund seiner tumorspezifischen Überexpression beim Magenkarzinom eine ideale Zielstruktur für eine selektive Tumorintervention dar. Inhibitoren des EGFR sind bereits für die Behandlung von Tumorpatienten zugelassen. Bisher fehlen jedoch weitgehend verlässliche Parameter, die das Ansprechen der Patienten auf die Therapie vorhersagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des EGFR-Signalwegs für Tumorzellmigration und Tumorthherapie im Zellkultursystem analysiert. Es sollte das therapeutische Ansprechen auf Cetuximab, einen gegen den EGFR-gerichteten monoklonalen Antikörper, untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte ein Panel von fünf Magenkarzinom-Zelllinien umfassend hinsichtlich der Expression und Aktivierung von Signalkomponenten des EGFR-Signalwegs charakterisiert werden, um die Wirkung des therapeutischen Antikörpers zu beurteilen. Neben der Sensitivitätsbestimmung auf Proliferationsebene wurde das therapeutische Ansprechen auf phänotypischer Ebene auch über Motilitätsanalysen untersucht. Mittels Genexpressionsanalyse, die durch einen Verbundpartner durchgeführt wurde, wurden therapierelevante Gene identifiziert, deren Expression in weiteren Projekten gehemmt werden kann, um deren Rolle bei der Regulation der Zellbeweglichkeit und bei der Tumorthherapie zu validieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten unterschiedliche Biomarker untersucht werden, die das Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie in Magenkarzinom-Zelllinien, vorhersagen könnten.

Es sollten Moleküle, die mit dem EGFR-Signalweg assoziiert sind auf ihre Tauglichkeit als Biomarker analysiert werden. Außerdem sollten in dieser Arbeit weitere potentielle Biomarker analysiert werden, die zur Vorhersage der Cetuximab-Sensitivität von Magenkarzinom-Zelllinien beitragen sollen. Hierbei sollte einerseits auf die in dem Projekt durchgeführten Genexpressionsanalysen zurückgegriffen werden. Andererseits sollte das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, ein durch Literatur und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe präselektierter potentieller Biomarker der Cetuximab-Sensitivität, untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL

2.1 Zellen

2.1.1 Eukaryotische Zelllinien

AGS, #89090402	ECACC (<i>European Collection of Cell Cultures</i>)/ Sigma-Aldrich, Steinheim
AZ521, TKG 0185	Cell Bank, Riken BioResource Center, Koyadai, Japan
HGC-27, RCB 0500	Cell Bank, Riken BioResource Center Koyadai, Japan
Hs746T, HTB-135™	ATCC (<i>American Type Culture Collection</i>)/ LGC Standards GmbH, Wesel
KATOIII, #86093004	ECACC /Sigma-Aldrich, Steinheim
LMSU, RCB 1062	Cell Bank, Riken BioResource Center Koyadai, Japan
MKN1, RCB 1003	Cell Bank, Riken BioResource Center Koyadai, Japan
MKN28	Dr. V. Wacheck, Institut für klinische Pharmakologie, Medizinische Universität Wien, 04/2007
MKN45	Prof. M. Ebert, II. Medizinische Abteilung, Klinikum rechts der Isar, München

2.1.2 Bakterienzellen

One Shot® TOP10 E. coli Zellen	Life Technologies GmbH, Darmstadt
--------------------------------	-----------------------------------

2.2 Medien und weitere Lösungen für die Zellkultur

DMEM + GlutaMAX™-I, # 31966	Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid), steril	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's PBS (1x) mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , # H15-002	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , # H15-001	PAA, Pasching, Österreich
Fötales Kälber Serum (FKS; Sera Plus)	PAN Biotech, Aidenbach
L-Glutamin (200 mM)	Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt
MEM, # M4655	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Nutrient Mixture F-10 HAM</i> , # N6908	Sigma-Aldrich, Steinheim
OptiMEM (#31985)	Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt

Penicillin/Streptomycin (Penicillin 5.000 IU/ml, Streptomycin 5.000 µg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640, # 21875	Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypsin-EDTA (1x), # 11-004	PAA, Pasching, Österreich
Versen	Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.3 Antikörper

Akt Antibody, # 9272	Cell Signaling/New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.
Anti-Rabbit Antibody, HRP-linked IgG (H&L), # 7074	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
ECL™ Peroxidase labeled anti-mouse, # NA931	GE Healthcare/VWR, Ismaning
FAK, # 610088	BD Biosciences, Heidelberg
Human IgG1 Kappa-LE/AF, Isotyp IgG1, #SBA-0151K-14	Southern Biotech/Biozol, Eching
MET Antibody, # 3127	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Monoclonal Anti-α-Tubulin Clone DM1A, # T-9026	Sigma-Aldrich, Steinheim
Monoclonal Anti-β-Actin antibody, # A1978	Sigma-Aldrich, Steinheim
p44/42 MAP Kinase Antibody, # 9102	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Phospho-Akt (S473) Antibody, # 9271S	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Phospho-p44/42 MAP Kinase (T202/Y204) Antibody, # 9101S	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Phospho-Pyk2 (Y402) Antibody, # 3291	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Phospho-MET (Y1234/1235) XP™ (D26)	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Rabbit mAb, # 3077	
Purified Mouse Anti-E-Cadherin, # 610182	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Mouse anti-FAK (pY397) MAb, # 611723	BD Biosciences, Heidelberg
Pyk2 Antibody, # 3292	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Rabbit pAb Anti-EGF Receptor pY ¹⁰⁶⁸ phosphospecific antibody, # 44788G	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.4 Allgemeine Chemikalien und Lösungen

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (40 %)	BioRad, München
Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blau R-250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
p-Cumarsäure, # C9008	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure p.a., 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol p.a., 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Amresco, Solon, Ohio, USA
Glycerol, 99 % (v/v)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin, 87 %	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin p.a., 99 %	Merck KGaA, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-Hydroxy-Zimtsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat-Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Luminol, # A8511	Sigma-Aldrich, Steinheim
LB (Lennox L) Agar	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka Biochemika, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Fluka Biochemika, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt
20 % Natriumdodecylsulfat (SDS) Lösung	AppliChem, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyrophosphatdecahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde, München
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	BioRad, München
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	USB Europa, Staufen
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
TWEEN® 20	Merck KGaA, Darmstadt
Wasser (H ₂ O) p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt

2.4.1 Größenmarker

Proteinmarker <i>Precision Plus Protein™ Standards Dual Color</i>	BioRad, München
Proteinmarker <i>peqGOLD Protein-Marker V</i>	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
DNA Marker HAE III	Fermentas, St. Leon-Rot

2.4.2 Medikamente und Inhibitoren

5-Fluorouracil	medac, über Apotheke des MRI, München
Cetuximab, Erbitux [®] ™	Merck KGaA, über Apotheke des MRI, München
Cisplatin Teva [®]	Teva, über Apotheke des MRI, München
PF431396	Pfizer über Sigma-Aldrich, Steinheim

2.4.3 Enzyme

AmpliTaq Gold [®]	Applied Biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Restriktionsenzyme XhoI und NheI-HF	NEB, Frankfurt a.M.

2.4.4 Proteine

Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagen Typ I, #354236	BD Biosciences, Heidelberg
Fibronektin, #F1141	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.4.5 Plasmide

<i>wt</i> -EcadEGFP	Margit Fuchs [180]
Leerplasmid	Margit Fuchs [180]

2.5 Kommerzielle Analysysteme und vorgefertigte Lösungen

<i>mirVana</i> TM <i>miRNA Isolation Kit</i> , # AM1560	Ambion, Darmstadt
zusätzlich benötigt:	
Phenol/Chloroform, # AM9720	Ambion, Darmstadt
Ethanol (100%)	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Baseline-ZERO</i> TM <i>DNase</i> , # DB0711K	EPICENTRE [®] , Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen für RNA Analysen	Molecular BioProducts ART [®]
RiboLock #EO0382	Fermentas, St. Leon-Rot
Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit, #RPN2135	GE Healthcare/VWR, Ismaning
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, #RPN2132	GE Healthcare/VWR, Ismaning
CASYton [®]	Innovatis, Reutlingen
Cell Proliferation Kit II (XTT), #11465015001	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteaseinhibitor Tabletten Complete Mini	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
Protein-Standard II (1,48 mg BSA/ml)	BioRad, München
T-Per [®] Proteinextraktionspuffer	ThermoScientific, Schwerte
Vectashield [®] Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
WST-1 Cell Proliferation Kit, #11644807001	Roche Diagnostics, Mannheim
FlexiTube Gene Solution siRNA, ID: 999	Qiagen, Hilden
AllStars Cell Death Control siRNA, #1027298	Qiagen, Hilden

Negativkontroll-siRNA, #1027280	Qiagen, Hilden
Taq PCR Kit, #E5000S	NEB, Frankfurt a.M.
peqGOLD XChange Plasmid Midi Kit	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Puffer 4	NEB, Frankfurt a.M.
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lipofectamine 2000 [®] , #11668	Life Technologies GmbH, Darmstadt
ChemMate™ Peroxidase-Blocking Solution, # S 2023	DAKO, Hamburg
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, #RPN2132	GE Healthcare/VWR, Ismaning
Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit, #RPN2135	GE Healthcare/VWR, Ismaning
Restore™ Western Blot Stripping Buffer, # 21059	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SYPRO-Ruby Protein Blot Stain, #S-11791	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.6 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben wurden die Puffer bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

2.6.1 Puffer für Zellaufschluss

<u>10x L-CAM Puffer</u>	149 mM NaCl
	47 mM KCl
	7 mM MgSO ₄
	12 mM CaCl ₂
	10 mM Hepes pH 7,4
<u>1x L-CAM Puffer</u>	10 % (v/v) 10x L-CAM Puffer
	1 % (v/v) Triton X-100
	2 mM PMSF
	2 mM Na ₃ VO ₄
	19,05 µg/ml Aprotinin
	20 µg/ml Leupeptin
	10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ x 10H ₂ O
	10 mM NaF

1x L-CAM Puffer wurde vor jedem Gebrauch frisch hergestellt und bis zum Einsatz auf Eis gelagert.

10x TBS 500 mM Tris
1,5 M NaCl
→ pH 7,3

1x TBS-T 100 ml 10x TBS
1 ml TWEEN®20
ad 1000 ml H₂O

Blockpuffer 5 % Milchpulver in 1x TBS-T gelöst

Tabelle 1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen (7,5 % AA, 10,0 % AA, 12,5 % AA).
Verwendete Abkürzungen: AA/Bis: Acrylamid/Bisacrylamid; APS: Ammoniumperoxidsulfat; SDS: Natrium-dodecylsulfat; TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

	Sammelgel	Trenngel 7,5 % AA	Trenngel 10,0 % AA	Trenngel 12,5 % AA
H₂O	3,05 ml	8,3 ml	7,35 ml	6,4 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	1,25 ml	-	-	-
1 M Tris, pH 8,8	-	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
40 % AA/Bis	630 µl	2,8 ml	3,75 ml	4,7 ml
20 % SDS	25 µl	75 µl	75 µl	75 µl
10 % APS	40 µl	90 µl	90 µl	90 µl
TEMED	4 µl	9 µl	9 µl	9 µl

Tabelle 2: Antikörper, die in Western Blot Analysen verwendet wurden. Außerdem sind die Hersteller, Bestellnummer, deren Molekulargewicht, die eingesetzte Verdünnung, und die entsprechenden Sekundärantikörper gelistet. (CS: Cell Signaling, BD: Becton, Dickinson and Company)

Primär-AK	Molekular- gewicht (kDa)	Verdünnung	In	Sekundär-AK
α-Tubulin Sigma, # T 9026	50	1:10000	5% Milch-TBS-T	Maus
AKT CS, # 9272	60	1:2000	5% BSA-TBS-T	Kanninchen
pAKT (Ser 473) CS, # 9271	60	1:2000	5% BSA-TBS-T	Kanninchen
β-Aktin Sigma, # A1978	42	1:5000	5% Milch-TBS-T	Maus
E-Cadherin BD, # 610182	120	1:5000	5% Milch-TBS-T	Maus
EGFR CS, # 2232	175	1:1000	5% Milch-TBS-T	Kanninchen
pEGFR Y1068	185	1:2000	5% Milch-TBS-T	Kanninchen

Invitrogen, # 44788G				
FAK	125	1:1000	5% Milch-TBS-T	Maus
BD, # 610088	116			
pFAK	125	1:1000	5% Milch-TBS-T	Maus
BD, # 611723	116			
MAPK	44	1:2000	5% Milch-TBS-T	Kanninchen
CS, # 9102	42			
pMAPK	44	1:2000	5% Milch-TBS-T	Kanninchen
CS, # 9101	42			
MET	170 (proMET)	1:1000	5% BSA-TBS-T	Maus
CS, # 3127	145			
pMET	145	1:1000	5% BSA-TBS-T	Kanninchen
CS, # 3077				
Pyk2	116	1:2000	5% Milch-TBS-T	Kanninchen
CS, # 3292				
pPyk2	116	1:2000	5% Milch-TBS-T	Kanninchen
CS, 3291				
Anti-Rabbit Antibody, HRP- linked IgG (H&L)	--	1:2000	TBS-T	--
CS, #7 074				
ECL™ Peroxidase labeled anti-mouse	--	1:10000	5% Milch-TBS-T	--
BD, # NA931				

2.6.4 Chemilumineszenz-Substrat (ECL)

Lösung 1:

- 2,5 mM Luminol
- 400 µM Cumarinsäure
- 100 mM Tris-HCl pH 8,6
- in H₂O

Lösung 2:

- 0,15 % (v/v) H₂O₂
- 100 mM Tris-HCl pH 8,6
- in H₂O

Bei 4 °C lagern, direkt vor Gebrauch Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 mischen

2.6.5 Puffer und Gel-Zusammensetzung für Agarose-Gelelektrophorese

<u>10x TBE Puffer</u>	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
<u>1x TBE Puffer</u>	100 ml 10x TBE Puffer 10 Tropfen Ethidiumbromid ad 1000 ml H ₂ O
<u>1,5 %iges Agarosegel</u>	1,5 g Agarose 100 ml 1x TBE Puffer 0,1 µg/ml Ethidiumbromid

2.7 Verbrauchsmaterial

Amersham Hybond-P PVDF Membrane	GE Healthcare
Plastik für Zellkultur	Biochrom, Berlin
Biocoat™ Matrigel™ Invasion Chamber, #354480	BD Biosciences
Biocoat® Cell Culture Inserts, #354578	BD Biosciences
Alphanumerical Black-on-White 96-Well	IBS Integra, Fernwald
Einmal-Filterhalter Minisart®	Sartorius Stedim, Göttingen
Glasboden Zellkultur Schalen, #P35G-0-14-C	MatTek Corporation, Ashland, USA
CASY Cups	Roche Diagnostics, Mannheim
Röntgenfilme: Amersham Hyperfilm™ECL	GE Healthcare/VWR, Ismaning
Röntgenfilme: Fuji Super RX	Hartenstein, Würzburg
Nitrozellulose Membran BA85, 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Cryovial PK/100 Cryocaps	Roth, Karlsruhe
Deckgläser	ThermoScientific, Schwerte
Küvetten	Hartenstein, Würzburg
Objektträger	ThermoScientific, Schwerte
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago/USA
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 0,2 ml)	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen	Fisher Scientific, Schwerte
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym, Oldendorf
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Skalpellklingen	Sapphire, Pocasset, USA
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellschaber	Biochrom, Berlin
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht und BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Orange Scientific/NeoLab, Heidelberg

2.8 Geräte

Spektrophotometer NanoDrop ND1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Eismaschine	Scotsman Ice, Vernon Hills, USA
Entwicklermaschine SRx-101A	Konica Minolta, Langenhagen
Expert Plus Photometer	Asys, Eugendorf, Österreich
Gelelektrophoresekammer Mini Sub Cell	BioRad, München
Kippschüttler 3D Rocking Plattform	Stuard Scientific, Oregon, USA
Kühltruhe Ultra Low Freezer	Sanyo, München
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laborwaage	Sartorius-Stedim, Göttingen
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz, Wetzlar
Mikroskopiesysteme:	
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer A1 mit Quecksilberdampflampe HBO100 sowie Kamera AxioCam HRm	Zeiss AG, Jena
Axiovert Laser Scanning Microscope LSM 510 mit PNF 20x/0.4 PH2 Linsen und Helium-Neon Laser (543 nm)	Zeiss AG, Jena
Mini PROTEAN [®] 3 Cell System	BioRad, München
Mini Trans-Blot Cell System	BioRad, München
PCR-Gerät Primus 96Plus	MWG-Biotech, Ebersberg
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Jena
Photosystem Eagle Eye II	Stratagene, La Jolla, USA
pH-Meter (pH 211)	HANNA Instruments, Woonsocket, USA
Pipetten Eppendorf Research (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipette Pipetman (20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA

Pipetus-akku Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Spannungsquelle Power Pac 300	BioRad, München
Sterilwerkbank Hera Safe Zellkulturhaube	Kendro, Hanau
UV-Spektrometer Ultraspec 200	Amersham, Braunschweig
UV/Vis Spektrophotometer DU [®] 530	Beckman, Fullerton, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellinkubator Heracell 240i	ThermoScientific, Wesel
Zellzählgerät Casy1 TT	Schärfe Systems, Reutlingen
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.9 Computerprogramme und Datenbanken

AxioVision Rel. 4.8	Zeiss AG, Jena
Adobe Photoshop	Adobe Systems, San Jose, USA
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San Jose, USA
CMCT-0.2	SCCH, Hagenberg, Österreich
COSMIC Datenbank	The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, England
EndNote X4	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
IBM SPSS Statistics 21.0	SPSS Inc., Chicago, USA
ImageJ 14.2q	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
LSM Image Browser 4.2.0.102	Zeiss AG, Jena
Scion Image Software	Scion Corporation, Frederick, USA

METHODEN

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit acht Magenkarzinom-Zelllinien gearbeitet: AGS, AZ521, Hs746T, KATOIII, LMSU, MKN1, MKN28 und MKN45. Die Zellen wurden von unterschiedlichen Zellbanken bezogen oder von den unter 2.1.1 genannten Instituten erhalten. Diese Magenkarzinom-Zelllinien wurden im Institut durch die Bestätigung Zelllinien-spezifischer Genmutationen durch direkte Sequenzanalysen oder durch *short tandem repeat profiling* mittels *Cell ID™ System* von Promega validiert [170, 185].

Die Zelllinien wurden entsprechend ihres Motilitätsverhaltens oder der E-Cadherin-Positivität in zwei Gruppen eingeteilt und in unterschiedlichen Projekten eingesetzt: Die erste Gruppe bestand aus den Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Diese Zelllinien wurden in Bezug auf ihre Motilität und den durch Behandlung induzierten molekularen Änderungen analysiert. Die zweite Gruppe von Zelllinien - MKN28, MKN45 und KATOIII - exprimiert E-Cadherin und ist somit für die Untersuchung des Einflusses von E-Cadherin auf molekulare Therapien mit Cetuximab geeignet.

Die Zelllinie AGS wurde aus einem diffusen Adenokarzinom des Magens einer 54-jährigen Kaukasierin isoliert. Die Patientin hatte vor der Entnahme keinerlei Therapie erhalten [186]. Die AGS Zelllinie hat eine *KRAS*-Mutation in Exon 2 (c.35G>A, p.G12D), eine Mutation in *PIK3CA* (c.1357G>A, p.E453K) sowie eine *CDHI*-Mutation in Exon 12 (c.1733_1734insC; p.G579fs*9) [187].

AZ521 Zellen sind als epithelartige Zellen, aus dem Magenkarzinom eines japanischen Patienten stammend, beschrieben [188]. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Zelllinie ursprünglich aus einem Duodenumkarzinom stammt. AZ521 Zellen weisen dasselbe DNA-Profil wie die Duodenumkarzinom-Zelllinie HuTu80 auf und scheint eine von HuTu80 stammende Sublinie zu sein [189].

Hs746T Zellen wurden aus einer Metastase im Bein eines 74-jährigen Kaukasiers, der an einem Magenkarzinom litt, im Jahre 1973 isoliert und kultiviert. Die Histologie des Primärtumors ist unbekannt [190].

Die LMSU Zelllinie stammt aus einer Lymphknotenmetastase einer 27-jährigen Japanerin, die an einem Magenkarzinom erkrankt war [191]. Für diese Zelllinie ist bisher kaum Literatur verfügbar.

MKN1 Zellen wurden aus einer Lymphknotenmetastase eines 74-jährigen Japaners isoliert, der an einem adenosquamösen Karzinom des Magens litt. Sie gelten aufgrund ihres Ursprungs als schlecht differenzierte Zellen [192]. Diese Zelllinie hat Mutationen in *FBXW7* (c.1393C>T, p.R465C), *PIK3CA* (c.1633G>A, p.E545K) und *TP53* (c.428T>C, p.V143A) [187].

KATOIII Zellen wurden aus einem Pleuraerguss eines 55-jährigen männlichen Patienten mit diffusem Siegelringzell-Karzinom entnommen und kultiviert [190, 193, 194].

Die Zelllinie MKN28 stammt aus einer Lymphknoten-Metastase einer 70-jährigen Patientin, die an einem moderat differenzierten tubulären Adenokarzinom des intestinalen Typs erkrankt war [192]. Die MKN28 Zelllinie weist eine *TP53*-Mutation in Exon 7 (c.751A>C; p.I251L) auf. Bisher wurden keine Mutationen in *CDH1* beschrieben, weswegen in dieser Arbeit davon ausgegangen wird, dass MKN28 Zellen ein funktionelles WT E-Cadherin exprimieren.

MKN45 Zellen wurden aus einer Lebermetastase einer 62-jährigen Frau mit einem schwach differenzierten Adenokarzinom des Magens, klassifiziert als diffuser Typ, entnommen [192, 195]. Die Zelllinie MKN45 weist eine Mutation von *CDH1* in Exon 6 auf (c.821_832del12, p.G274_P277del), während KATOIII Zellen eine Mutation von *CDH1* in Exon 7 (c.1008G>A, p.E336E) zeigen [187, 196].

2.10.2 Kultivieren und Passagieren

Die Zellen wurden in geeigneten Zellkulturmedien bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert und abhängig von der Konfluenz alle drei bis vier Tage passagiert. Alle Medien und Lösungen, die in der Zellkultur verwendet wurden, wurden auf 37 °C erwärmt. Für das Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Hierbei komplexiert der Chelatkomplexbildner EDTA zweiwertige Ionen, u.a. Mg²⁺ und Ca²⁺, die für die Zelladhäsion durch Membranproteine wichtig sind. Durch die proteolytische Wirkung von Trypsin werden Zelladhäsionsmoleküle angegriffen. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde zur Subkultivierung oder Zellzahlbestimmung für weitere Versuche verwendet. Die Zellzahl wurde mithilfe des Zellzählers *Casy1* (Schärfe System) oder einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Um morphologische und genetische Veränderungen der Zellen zu vermeiden, wurden die Zellen maximal 25-fach passagiert. Anschließend wurden kryokonservierte Zellen einer niedrigen Passagenzahl aufgetaut und in Kultur genommen.

AGS, MKN1, MKN28, MKN45 und KATOIII Zellen wurden in RPMI-Medium, AZ521 Zellen in MEM-Medium, Hs746T Zellen in DMEM-Medium und LMSU Zellen in Ham F10-Medium kultiviert (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete Zellkultur-Medien und deren Zusammensetzung

<i>Medium</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Zelllinien</i>
DMEM	<i>DMEM + GlutaMAX™-I</i> [+] 4,5 g/L D-Glucose [+] Pyruvate + 10 % FKS + 0,5 % Penicillin/Streptomycin	Hs746T
MEM	<i>MEM</i> + 10 % FKS + 0,5 % Penicillin/Streptomycin	AZ521
HAM F-10	<i>Nutrient Mixture F-10 HAM</i> + 10 % FKS + 0,5 % Penicillin/Streptomycin	LMSU
RPMI	<i>RPMI 1640 [+] L-Glutamine</i> + 2 mM Glutamin + 10 % FKS + 0,5 % Penicillin/Streptomycin	AGS KATOIII MKN1 MKN28 MKN45

2.10.3 Kryo-Konservierung

Da bei Zellen, die lange in Kultur gehalten werden, die Möglichkeit von genetischen und morphologischen Veränderungen besteht, wurden Aliquots der Zelllinien bei niedriger Passagenzahl in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. In kryokonservierten Zellen ist der Metabolismus gehemmt, wodurch das Altern der Zellen verhindert wird. Durch das Hinzufügen von DMSO werden Gefrierschäden an den Zellen während der Kryokonservierung verhindert.

Nachdem die Zellen von der Zellkulturplatte abgelöst wurden, wurde die Zellsuspension auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. In Kryoröhrchen wurden je 100 µl Medium (20 % FKS) und 100 µl DMSO vorgelegt und schließlich 1 ml der Zellsuspension hinzugegeben. Die Kryoröhrchen wurden sofort auf Eis und anschließend über Nacht (ÜN) auf -20 °C gestellt. Ab dem folgenden Tag wurden die Zellen in Flüssigstickstoff (-196 °C) gelagert.

Um Zellen frisch in Kultur zu nehmen, wurden kryokonservierte Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit vorgewärmtem Medium in ein Reagenzgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend 3 min bei 300 g sedimentiert. Der Überstand, in dem sich das zellschädigende DMSO befindet, wurde abgesaugt, das Zellsediment in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche zur Kultivierung überführt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreicht hatten, wurde untersucht, ob diese frei von Mykoplasmen sind (siehe 2.10.4).

2.10.4 Mykoplasmentest – Mykoplasmen-PCR nach TaKaRa

Mykoplasmen sind Prokaryoten mit einer Größe von ca. 0,1 - 2,0 µm. Sie passen sich optimal an ihren Wirt an. Dadurch ist die Gefahr groß, dass sie über lange Zeit unbeachtet in Zellkulturen leben. Sie können dabei in den Zellmetabolismus eingreifen oder zelluläre Signalweiterleitungen stören, wodurch experimentelle Messungen beeinflusst werden können. Aus diesen Gründen ist es wichtig, in Zellkulturen von Anfang an die Abwesenheit von Mykoplasmen zu bestätigen.

Hierzu wurde eine *nested*-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach dem Protokoll von TaKaRa [197] durchgeführt.

Es wurden 100 µl Zellkulturüberstand abgenommen und 5 min bei 95 °C erhitzt. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde die Probe 5 s bei 13 000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurde 1 µl in der PCR eingesetzt.

Für die PCR wurde das *Taq PCR Kit* von NEB verwendet. Die Reagenzien-Zusammensetzung für die PCR ist Tabelle 4 zu entnehmen. Neben den Proben wurden auch jeweils Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Mastermix für die Mykoplasmen-PCR

<i>Reagenz (aus Taq PCR Kit, NEB)</i>	<i>Menge in µl pro Reaktion</i>	<i>Endkonzentration in PCR</i>
10x Buffer	5,0	10 mM Tris-HCl (pH 8,3) 50 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂
dNTP Mix	1,0	200 µM
Primer Mix I bzw. II	2,0	0,8 µM
Taq Polymerase	0,5	1,25 Units
Probe	1,0	
Aqua dest.	40,5	

Tabelle 5: Programme für die Amplifizierung möglicher Mykoplasmen

<i>Myko-PCR1</i>			<i>Myko-PCR2</i>		
4 min	94 °C	35 Zyklen	4 min	94 °C	30 Zyklen
30 s	94 °C		30 s	94 °C	
2 min	55 °C		2 min	55 °C	
1 min	72 °C		1 min	72 °C	
7 min	72 °C		7 min	72 °C	
oo	10 °C		oo	10 °C	

Für den zweiten PCR-Lauf wurde als Probe 1 µl des PCR-Produktes des ersten PCR-Laufes verwendet und der Primer-Mix II (siehe Tabelle 5) eingesetzt. Außerdem wurde eine weitere Negativkontrolle

mitgeführt. Das für die zweite PCR verwendete Programm ist dem des ersten Laufes äquivalent, allerdings wurden nur 30 Zyklen durchgeführt.

Um eventuelle mykoplasmatistische DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurden die PCR-Produkte der zweiten PCR mit Auftragspuffer gemischt, auf ein Agarosegel aufgetragen und bei 120 V für 30 min gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als DNA-Größenstandard wurde der *Quick-Load 2-Log DNA Ladder* verwendet. Die Detektion erfolgte unter ultraviolettem (UV) Licht.

In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die Mykoplasmenstämme und deren Produktlängen, die mithilfe der verwendeten Primer nachgewiesen werden können, aufgelistet.

Tabelle 6: Sequenzen der Primer für den Nachweis von Mykoplasmen [197]

<i>Primerbezeichnung</i>	<i>Sequenz 5' → 3'</i>	<i>Anteile für Primer-Mix</i>
		<i>Primer-Mix 1</i>
Myco-Fw1	ACA CCA TGG GAG CTG GTA AT	2 Teile
Myco-Fw1t	ACA CCA TGG GAG TTG GTA AT	2 Teile
Myco-Rev1	CTT CAT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT	1 Teil
Myco-Rev1tt	CTT CTT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT	1 Teil
Myco-Rev1cat	CCT CAT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT	1 Teil
Myco-Rev1ac	CTT CAT CGA CTT CCA GAC CCA AGG CAT	1 Teil
		<i>Primer-Mix2</i>
Myco-Fw2	GTT CTT TGA AAA CTG AAT	1 Teil
Myco-Fw2a	ATT CTT TGA AAA CTG AAT	1 Teil
Myco-Fw2cc	GCT CTT TCA AAA CTG AAT	1 Teil
Myco-Rev2	GCA TCC ACC AAA AAC TCT	1 Teil
Myco-Rev2ca	GCA TCC ACC ACA AAC TCT	1 Teil
Myco-Rev2at	GCA TCC ACC AAA TAC TCT	1 Teil

Tabelle 7: Produktlänge der durch die PCR nachweisbaren Mykoplasmenstämme

<i>Mykoplasmenstamm</i>	<i>Produktlänge der nested PCR (bp)</i>
<i>M. hyopneumoniae</i>	237
<i>M. neurolyticum</i>	196
<i>M. fermentans</i>	195
<i>M. hyorhinis</i>	211
<i>M. orale</i>	179
<i>M. arthritidis</i>	157
<i>M. salivarium</i>	151
<i>M. hominis</i>	147, 148
<i>M. arginini</i>	145

2.10.5 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode, mit der u.a. DNA in die Zelle transferiert werden kann. Es gibt unterschiedliche Transfektionsmethoden, in diesem Projekt wurden siRNA (*small-inhibiting* RNA) sowie ein DNA-Plasmid in Verbindung mit kationischen Liposomen in die Zellen eingeschleust. Zellen können sowohl transient als auch stabil transfiziert werden. In stabil transfizierten Zellen wird die DNA ins Genom integriert. Die Etablierung einer stabilen Zelllinie nimmt gewöhnlich mehrere Monate in Anspruch. Transient transfizierte Konstrukte werden hingegen nach wenigen Tagen in der Zelle katabolisiert.

In dieser Arbeit wurde die Expression von E-Cadherin in MKN28 Zellen transient mit siRNA Konstrukten gehemmt, um den Effekt von E-Cadherin zu untersuchen. KATOIII und MKN45 Zellen wurden transient mit einem WT-kodierenden Plasmid (*wt-EcadEGFP*) [180] transfiziert. Die verwendete siRNA gegen E-Cadherin *FlexiTube GeneSolution siRNA* wurde über Qiagen bezogen, das Plasmid *wt-EcadEGFP* sowie das zur Transfektionskontrolle verwendete Leerplasmid wurde von Margit Fuchs [180] konstruiert.

Für die Transfektion wurden die Zellen (Zellzahl abhängig von Zelllinien und Schalen-Größe, siehe Tabelle 8) ausgelegt, nach 24 h wurde das Medium abgenommen und Medium ohne Antibiotika zugefügt, da Antibiotika einen negativen Einfluss auf die Transfektion haben können.

Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000[®] nach Herstellerangaben verwendet. Das Transfektionsreagenz und die Oligomere (DNA bzw. siRNA) wurden jeweils in OptiMEM verdünnt, anschließend gemischt, 20 min bei RT inkubiert und schließlich die Oligomer-Transfektionsreagenz-Komplexe auf die Zellen gegeben. 6 h nach der Transfektion wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen abhängig vom Experiment stimuliert.

Um den Einfluss der bei der Transfektion verwendeten Substanzen zu überprüfen, wurden bei den Versuchen jeweils unterschiedliche Negativ-Kontrollen mitgeführt: Medium, Opti-MEM[®], Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000[®] sowie eine Negativkontroll-siRNA bzw. ein Leerplasmid. In Vorversuchen wurden die optimalen Transfektionsbedingungen etabliert und die Transfektionseffizienz der Zellen bestimmt. Dazu wurde die Positivkontrolle *AllStars Cell Death Control siRNA* verwendet. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mittels Proliferationstest bestimmt.

Tabelle 8: Transfektionsbedingungen der Zelllinien MKN28, MKN45 und KATOIII. Die Angaben beziehen sich auf eine Vertiefung einer 6-Well-Platte mit einer Wachstumsfläche von 900 mm².

<i>Zelllinie</i>	<i>Zellzahl</i>	<i>Konzentration des Transfektans</i>	<i>Transfektionsdauer</i>	<i>Transfiziertes Konstrukt</i>
MKN28	1,0 x 10 ⁵ Zellen	70 pmol	96 h	siRNA gegen E-Cadherin
MKN45	1,3 x 10 ⁵ Zellen	6 µg	48 h	<i>wt-EcadEGFP</i>
KATOIII	1,3 x 10 ⁵ Zellen	6 µg	24 h	<i>wt-EcadEGFP</i>

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Isolierung von RNA und mikroRNA aus Magenkarzinom-Zelllinien

Zur Gewinnung von Informationen über Änderungen auf Transkriptionsebene der Zelllinien AGS, Hs746T, LMSU und MKN1 durch EGF- und/oder Cetuximab-Behandlungen, wurden Gesamt-RNA und mikroRNA (miRNA) isoliert. Anschließend wurde die Genexpression der isolierten RNA/miRNA Proben mittels SuperSAGE Analyse (siehe 3.4.1) durch unseren Kooperationspartner GenXPro GmbH untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte durch drei unserer Kooperationspartner: GenXPro GmbH, Biomax Informatics AG und Viscovery Software GmbH.

Es gibt hauptsächlich zwei unterschiedliche Methoden um RNA aus biologischen Proben zu isolieren: die chemische Extraktion (organische Extraktion) und die Immobilisation auf Glas (Festphasen-Extraktion). Nach Angaben des Herstellers kombiniert das *mirVana™ Isolation Kit* von Ambion (#AM1560) die Vorteile beider Methoden, und somit eignet es sich sowohl zur Isolation von Gesamt-RNA als auch miRNA. In dieser Arbeit wurde für die Isolation von miRNA und RNA das *mirVana™ Isolation Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

Für die Isolation der RNA/miRNA wurden 3×10^6 Zellen in Vollmedium (FKS-haltiges Medium) in beschichteten 150 mm Zellkulturschalen ausgelegt. Die Beschichtung war für AGS, Hs746T und MKN1 Zellen: 100 µg/ml Kollagen und für AZ521 und LMSU Zellen: 10 µg/ml Fibronectin. Zwei Stunden nach der Zellaussaat wurden die Zellen folgendermaßen behandelt: unbehandelt, 5 ng/ml EGF, 5 ng/ml EGF und 1 µg/ml Cetuximab oder 1 µg/ml Cetuximab. Die Stimulation bzw. Inhibition erfolgte für jede Behandlungsbedingung für je 1, 3 und 5 min, sowie für 4 h. Anschließend wurden die Zellkulturplatten auf Eis gestellt und zweimal mit PBS gewaschen, um Medienrückstände zu beseitigen. Die Zellen wurden mit 600 µl *Lysis/Binding Buffer* mithilfe eines Schabers von der Platte gelöst und lysiert. Die Zellsuspension (900 µl) wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Lyse kräftig gevortext. Anschließend wurden 90 µl *miRNA Homogenate Additive* zugeben, gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe des Lysepuffers und des *miRNA Homogenate Additive* wurden die Proben denaturiert, die RNA stabilisiert und RNasen inaktiviert.

Für die Extraktion wurden 900 µl Phenol:Chloroform auf die Lysatsuspension gegeben, 60 s gevortext und anschließend 5 min mit 10 000 g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dadurch wurden die meisten übrigen Zellbestandteile, auch DNA, entfernt. Die wässrige Phase wurde mit 1/3 vol Ethanol (100 %) gemischt, auf Säulchen gegeben und 15 s bei 10 000 g zentrifugiert. Die Zugabe von 1/3 vol Ethanol bewirkte, dass die großen RNAs auf dem Glasfaser-Filter immobilisiert wurden, während sich die kleinen RNAs im Filtrat sammelten. Um die kleinen RNAs aus dem Filtrat zu isolieren, wurde dieses mit 2/3 vol Ethanol (100 %) gemischt und auf frische Säulchen gegeben. Bei erneutem Zentrifugieren wurden nun die kleinen RNAs in den Glasfaser-Filtern immobilisiert. Mit den Säulchen der RNA und der miRNA wurde nun parallel weitergearbeitet. Es folgten drei Waschschrte, für den ersten wurden 700 µl

miRNA Wash Solution 1, für den zweiten und dritten je 500 µl *Wash Solution 2/3* auf die Säulchen gegeben und jeweils 15 s bei 10 000 g zentrifugiert. Um den kompletten Waschpuffer zu entfernen, wurden die Säulen nochmals ohne weitere Zugabe zentrifugiert (1 min, 10 000 g, RT), bevor schließlich die RNA und miRNA mit je 100 µl auf 95 °C vorgewärmter Elutionslösung mit geringer Ionenkonzentration eluiert wurde (Zentrifugation für 30 s bei 10 000 g). Die Filtrate, die die RNA und miRNA enthielten, wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Eventuelle DNA-Rückstände und verbleibende RNase-Aktivität in den Proben wurden durch einen DNase-Verdau und einen RNase-Inhibitor beseitigt. Die RNA- und miRNA-Filtrate wurden mit dem RNase-Inhibitor *RiboLock* und mit *Baseline-Zero DNase* nach Herstellerangaben behandelt. Es wurden pro 100 µl RNA- bzw. miRNA- Suspension 2,5 µl *Ribolock*, 11,8 µl 10x *DNase-Zero-Buffer* und 5,9 µl *DNase Zero* zugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch 11,8 µl 10x *Baseline DNase-Zero-Stop-Solution* wurde die DNase bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Die Reinheit der RNA wurde durch GenXPro GmbH untersucht und bestätigt.

2.12 Proteinchemische Methoden

2.12.1 Protein-Extraktion aus Magenkarzinom-Zelllinien

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus Magenkarzinom-Zelllinien wurden $5,0 \times 10^5$ - $1,2 \times 10^6$ Zellen in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Nach 4 bis 6 h wurde das Medium erneuert und die Zellen ÜN im Brutschrank inkubiert. Sollten die Zellen vor der Stimulation gehungert werden, wurden sie 6 h nach der Aussaat zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Hungermedium (Medium ohne FKS) ÜN inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gegebenenfalls stimuliert und anschließend lysiert.

Die Lyse erfolgte auf Eis. Die Zellen wurden zweifach mit kaltem PBS gewaschen und mit 80 - 150 µl L-CAM Lysepuffer versetzt. Mithilfe eines Zellschabers wurden die lysierten Zellen abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach kräftigem Vortexen und zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer bei 12 000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur folgenden Proteinanalyse und Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80 °C gelagert.

2.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde nach Bradford [198] durchgeführt. Diese spektroskopische Methode basiert auf dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250, dessen maximale Absorption sich durch die Bindung von Proteinen von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Dieser Übergang kann photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentrationen mithilfe einer Standardkurve (Standardkonzentration 1,48 mg BSA/ml) ermittelt werden.

Das Bradford-Reagenz *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* wurde 1:5 mit Wasser verdünnt. Die Standardkurve wurde mit einem Protein Standard von BioRad hergestellt. Die Proben wurden mit dem verdünnten Bradford-Reagenz 1:200 verdünnt und die Absorption bei 595 nm mithilfe eines UV/VIS Spektrophotometers gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate-Proben wurden anhand der Standardkurve ermittelt.

2.12.3 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Proteine können anhand ihres molekularen Gewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. SDS bindet an Proteine, wobei die gebundene Menge an SDS proportional zu der Größe des Proteins ist. Durch das stark negativ geladene SDS ist eine Auftrennung bezogen auf die Proteingröße in einem elektrischen Feld ohne Störung durch die Ladung der Aminosäuren möglich.

Die Proben wurden mit Ladepuffer (Laemmli-puffer) verdünnt, gut gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert.

Es wurden 1,5 mm starke Acrylamid (AA)-Gele verwendet, die aus Sammel- und Trenngel bestehen. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE in der *Mini Trans-Blot Cell System* Kammer von BioRad mit 1x SDS-Laufpuffer bei 110 V für 75 min aufgetrennt. Als Proteinmarker wurden *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* von BioRad sowie *peqGOLD Protein Marker V* von PeqLab verwendet.

2.12.4 Transfer der Proteine auf Membranen (Western Blot)

Die Proteine wurden im Nassblot-Verfahren von einem Gel auf PVDF- oder Nitrozellulose-Membranen übertragen. Der Aufbau des Blots erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die verwendeten Filterpapiere, Filze und die Nitrozellulose-Membranen wurden zuvor in 1x Blot-Puffer äquilibriert, PVDF-Membranen wurden in Methanol aktiviert.

2.12.5 Immunchemische Detektion der Proteine

Für die Detektion gesuchter Proteine werden spezifische Antikörper verwendet. Nach der Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet, wird die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Dieser bindet an den Primärantikörper. Das zugegebene Substrat wird durch eine Chemilumineszenz-Reaktion durch die Peroxidase umgesetzt und die daraus resultierende Lumineszenz kann mithilfe von Röntgenfilmen detektiert werden.

Unspezifische Bindestellen der Membran wurden mit Blockpuffer geblockt. Nach 2 h wurde der überschüssige Blockpuffer mit TBS-T abgewaschen (3 x 10 min) und die Membran mit Primärantikörper (verwendete Antikörper und deren eingesetzte Verdünnungen siehe Tabelle 2) ÜN bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die überschüssigen Primärantikörper mit TBS-T von der Membran abgewaschen und diese mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern für 60 min bei RT inkubiert. Nichtgebundene Sekundärantikörper wurden vor der chemilumineszenten Detektion mit TBS-T abgewaschen.

Die Membran wurde anschließend mit einem Chemilumineszenzsubstrat (ECL-Lösung) wenige Sekunden inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mit Röntgenfilmen, die mit Hilfe der Entwicklermaschine SRx-101A entwickelt wurden.

2.12.6 Quantitative Auswertung der Proteinstärke

Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mithilfe der Programme *Scion Image* und *Image J*. Bei jedem Versuch wurde zusätzlich ein *house-keeping*-Protein (α -Tubulin, β -Aktin oder GAPDH) mitgeführt. Diese Ladekontrollen wurden zur Normalisierung der Daten verwendet. Für die Auswertung darf die Schwärze der Banden nicht im gesättigten Bereich sein, um eine Auswertung im linearen Bereich zu gewährleisten.

2.12.7 Rehybridisieren von Membranen

Membranen wurden teilweise zweifach für die Detektion von Proteinen verwendet. Dafür wurden sie in TBS-T gewaschen (3 x 10 min) und 15 min in *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* inkubiert, der die Bindung des Primärantikörpers an das Protein löst. Nach wiederholtem Waschen in TBS-T wurden die Membranen entwickelt, um zu überprüfen, ob eventuelle Rückstände auf der Membran vorhanden sind. War die Hybridisierung erfolgreich, wurde die ECL-Lösung in TBS-T abgewaschen und erneut die immunchemische Detektion von Proteinen durchgeführt.

2.13 Immunochemische Methoden

2.13.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Lokalisation von Proteinen in Zellen, wurde eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Im Gegensatz zur direkten Immunfluoreszenz, bei der fluorochromierte Primärantikörper verwendet werden, werden bei der hier eingesetzten indirekten Immunfluoreszenz Kombinationen aus Primär- und fluorochrommarkiertem Sekundärantikörper eingesetzt. Da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können, resultiert bei der indirekten Immunfluoreszenz ein verstärktes Signal, wodurch auch geringe Mengen an Proteinen detektiert werden können. In dieser Arbeit wurden Antikörper, die mit Fluorescein-Isothiocyant (FITC) gekoppelt waren, eingesetzt. Dieses Fluorochrom absorbiert Licht im UV-Bereich mit einem Absorptionsmaximum von 492 nm und einem Emissionsmaximum von 520 nm und zeigt eine gelb-grüne Färbung. Für die Zellkernfärbung wurde der Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet, dieser interkaliert bevorzugt mit Adenin-Thymin (AT)-reichen Regionen der kleinen Furche. DAPI fluoresziert im sichtbaren Bereich nach Anregung mit UV-Licht mit blauer Farbe (Absorptionsmaximum: 492 nm, Emissionsmaximum: 461 nm).

Es wurden 8×10^4 - 1×10^5 Zellen/Well auf ein steriles Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgelegt. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen zweifach mit PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) bei RT für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol pro Well fixiert und permeabilisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen dreimal je 5 min mit PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen, bevor sie schließlich mit dem Primärantikörper (α -E-Cadherin 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)) bei 4 °C ÜN inkubiert wurden. Um einem Austrocknen entgegen zu wirken, wurde die Antikörperlösung mit Parafilm bedeckt. Als Negativkontrolle wurde PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) verwendet.

Am folgenden Tag wurden die überschüssigen Primärantikörper durch zweifaches Waschen (à 5 min) mit PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) entfernt. Anschließend wurde der FITC-gekoppelte Sekundär-Antikörper (7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)) und DAPI (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)) für die Kernfärbung zugegeben und bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach 60 min wurde der restliche Farbstoff und Sekundär-Antikörper durch zweimaliges Waschen à 5 min mit dest. H_2O entfernt. Um den mechanischen Druck auf die Zellen zu minimieren und das Fluoreszenzsignal zu konservieren, wurde zwischen Objektträger und Deckgläschen *Vectashield Mounting Medium* gegeben. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf mit Vectashield benetzte Objektträger gelegt und mit handelsüblichem Nagellack fixiert. Abschließend wurden die Proben im Dunkeln bei RT getrocknet und bei -20 °C gelagert. Die Dokumentation erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer A1 von Zeiss AG, die Bildanalyse mit der Software *AxioVision Rel.4.8*.

2.14 Phänotypische Analysen

2.14.1 Bestimmung der Zellproliferation

Zur Bestimmung der Zellproliferation und Viabilität der Zelllinien nach Cetuximab-Behandlung wurde die *Cell Proliferation Kit II (XTT)* Analyse durchgeführt. Die Sensitivität der Zellen gegenüber Cetuximab wurde vor und nach Behandlung mit verschiedenen Cetuximab-Konzentrationen bestimmt. Der XTT-Zellproliferationstest basiert auf der Metabolisierung eines Tetrazoliums Salzes (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid Salz) in einen Formazanfarbstoff. Diese Metabolisierung erfolgt durch mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen. Formazane sind wasserlöslich und die Intensitäten der Farbumschläge können mit einem ELISA-Reader quantitativ bestimmt werden. Die Menge des Farbstoffes korreliert positiv mit der Anzahl vitaler Zellen.

Die Zellen (AGS: 800 Zellen/Well; Hs746T, LMSU: 2000 Zellen/Well; AZ521, MKN1: 3000 Zellen/Well) wurden in 96-Well-Platten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. In die äußeren Vertiefungen der 96-Well-Platten wurde PBS als Verdunstungsschutz zugegeben. Nach 24 h wurde eine Kontrollplatte (unbehandelte Zellen und Medienkontrolle zum Behandlungszeitpunkt 0) nach Herstellerangaben gemessen. Für die Messung wurden beim XTT-Test pro Well auf 100 µl Gesamtvolumen 50 µl einer XTT:ECR (Elektronenkupplerreagenz)-Mischung (50:1) zugegeben und nach 2 h die spektrophotometrische Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm (XTT) und einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm im ELISA-Reader gemessen.

Für die Behandlung der Zellen wurde nach 24 h Cetuximab in die weiteren Platten in den entsprechenden Konzentrationen gegeben. Für Cetuximab-Sensitivitätsversuche wurden, neben einer unbehandelten Kontrolle, 0,1; 1; 10; 100; 200 µg/ml Cetuximab für 48 h bzw. 24 h auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden weitere 24 bzw. 48 h kultiviert bevor, wie zuvor beschrieben, XTT-ECR zugegeben und nach entsprechender Inkubationszeit die Absorptionsintensität gemessen wurde.

Um die Spezifität der gemessenen Effekte zu bestätigen, wurden Wachstumskontrollen (8,48 mg/ml NaCl; 1,88 mg/ml Na₂HPO₄*7H₂O; 0,41 mg/ml NaH₂PO₄*H₂O) und Isotypkontroll-Antikörper (IgG1κ Isotyp) eingesetzt. Außerdem wurden unbehandelte Zellen und Medienkontrollen mitgeführt um Proliferationseffekte zu bestimmen.

2.14.2 Motilitätsanalyse

Für die Bestimmung der Motilität und des Migrationsverhaltens der Magenkarzinom-Zelllinien wurden Zeitraffer-Mikroskopien durchgeführt. Anhand dieser wurde der Anteil motiler Zellen und die Geschwindigkeit der Zellen nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung bestimmt.

Für das *Life-Cell-Imaging* wurden unbeschichtete 35 mm Glasboden-Kulturgefäße mit 100 µg/ml Kollagen Typ I für 30 min bei 37 °C (für AGS, Hs746T, MKN1 Zellen) oder mit 10 µg/ml Fibronectin für 90 min bei RT (für LMSU und AZ521 Zellen) beschichtet. Abhängig von der Zelllinie wurden die Zellen in Konzentrationen von 1,7 - 3,0 x 10⁵ Zellen pro beschichteter Schale in 10 % FKS-haltigem Medium ausgesät. Eine Stunde nach der Aussaat wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 5 ng/ml EGF und/oder Cetuximab (0,05; 0,1; 1,0; 50,0 µg/ml) stimuliert. Die weitere Kultivierung erfolgte in einer Mikroskop-gekoppelten Inkubationskammer bei 5 % CO₂ und 37 °C. 2 h nach der Aussaat wurden die Filmaufnahmen gestartet. Es wurden über 7 h alle 3 min Phasenkontrast-Bilder aufgenommen. Dazu wurden folgende zwei Mikroskope verwendet: *Axiovert laser scanning* Mikroskop LSM 510 (Zeiss AG) mit PNF Linsen 20x/0.4 PH2 sowie ein *Axio Observer AI* Mikroskop mit 10x/0.3 Ph1 Linse.

Die Auswertung der Motilität und Geschwindigkeit der Zellen erfolgte manuell mit der Software *LSM Image Browser* von Zeiss AG.

Zellen, die den Bereich, den sie bei Start des Films mit dem Zellkörper ausfüllten, während der Filmdauer von 7 h komplett verließen, wurden als motil definiert. Zur Bestimmung der Motilität wurde jeder einzelne Zellumriss zum Start-Zeitpunkt manuell eingezeichnet (Abbildung 8 B).

Die Geschwindigkeit einer Zelle wurde definiert als Quotient der Strecke, die eine einzelne Zelle während der Filmdauer in µm zurücklegt, und der Dauer des Films. Für die Strecke wurde der Weg, den jede einzelne Zelle zurücklegt, manuell eingezeichnet (Abbildung 8 A).

Die Filme inklusive der Auswertungen zu Motilität und Strecke wurden unserem Kooperationspartner SCCH in Hagenberg zur Verfügung gestellt, um weitere Parameter zu analysieren.

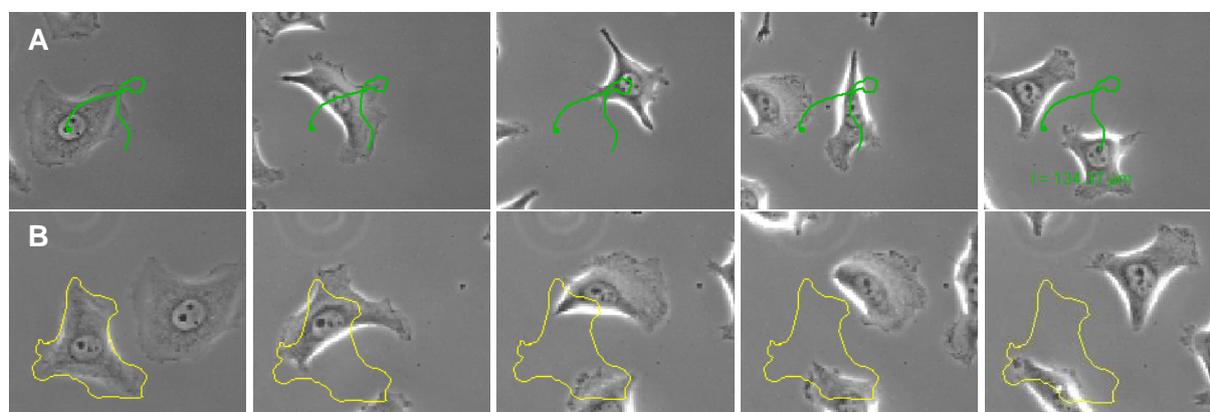


Abbildung 8: Bestimmung der Parameter, die das Migrationsverhalten beschreiben. A) Geschwindigkeit (Quotient aus Strecke und Zeit). **B) Motilität** (Zellen, die das ursprüngliche durch die Zelle ausgefüllte Gebiet während der Filmdauer von 7 h komplett verlassen).

2.15 Statistische Auswertungen

Wenn nicht anders angegeben, wurde für statistische Auswertungen *IBM SPSS Statistics 21* verwendet. Nach Absprache mit Dr. Alexander Hapfelmeier (Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie, TU München) wurden in der vorliegenden Arbeit folgende statistische Tests verwendet:

Der Einstichproben t-Test wurde verwendet, wenn eine Variable gegen einen festen Wert getestet wurde. Dies war der Fall, wenn unbehandelte Proben auf 100 % gesetzt wurden, um interexperimentelle Schwankungen zu minimieren. Alle Werte, die auf die unbehandelte Probe bezogen wurden, wurden durch den Einfachstichproben t-Test getestet.

Der Zweistichproben t-Test mit unabhängigen Variablen (Welch t-Test) wurde verwendet, wenn zwei Variablen gegeneinander, im sogenannten paarweisen Vergleich, getestet wurden. Dieser Test ist nur möglich, wenn Datensätze mit Standardabweichungen (SD) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen vorhanden sind.

Die Ergebnisse der durchschnittlichen Geschwindigkeit, bestimmt über Zeitraffer-Mikroskopie Analysen wurden als Boxplots mit 25 % und 75 % Perzentilen, Minimum, Maximum und Median dargestellt. Die entsprechenden p-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U Test berechnet, da der Datensatz keine Normalverteilung aufwies.

Signifikante Unterschiede bei der Motilitätsanalyse wurden mithilfe des Chi-Quadrat Tests bzw. des exakten Tests nach Fisher bestimmt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Morphologie der Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit acht Magenkarzinom-Zelllinien gearbeitet. Die Morphologie der untersuchten Magenkarzinom-Zelllinien unterschied sich stark zwischen den einzelnen Zelllinien.

AGS Zellen sind epitheliale, adhärent wachsende Zellen, die Kolonien mit nur schwacher Abgrenzung bilden. Die Form dieser polygonalen Zellen ist leicht kantig. AZ521 Zellen haben epitheliale Eigenschaften und wachsen adhärent. Sie wachsen als mehrzipfelige Zellen und bilden kaum Kolonien. Die Zelllinie Hs746T wächst adhärent. Die mehrzipfeligen und spindelförmigen Zellen weisen unregelmäßige Zellformen auf und wachsen einzeln, kaum in Kolonien. KATOIII Zellen wachsen sphärisch und weisen ein heterogenes Wachstum auf: ca. 70 % der Zellen wachsen adhärent und ca. 30 % in Suspension. Die kugeligen Zellen bilden lockere Kolonien. Ebenfalls ein adhärentes Wachstum weisen die epithelartigen LMSU Zellen auf. Diese Zellen wachsen einzeln, ohne dichten Zellverband und haben zylindrisch-spindelförmige Zellformen. MKN1 Zellen wachsen epithelial-adhärent. Die mehrzipfeligen Zellen bilden lockere und kaum begrenzte Kolonien. Die epithelialartige und adhärent wachsende Zelllinie MKN28 weist ein pflastersteinartiges Wachstum auf und bildet eng gepackte, stark abgegrenzte Kolonien. Epitheliale MKN45 Zellen wachsen ebenfalls adhärent in kugelförmigen und spindelförmigen Zellformen. Sie bilden lockere traubenartige Kolonien.

Das in dieser Arbeit verwendete Panel an Zelllinien weist ein epitheliales und adhärentes Wachstum auf, ein Teil der Zellen wächst anteilig in Suspension. Aufnahmen aller acht Zelllinien mit ihren unterschiedlichen Erscheinungsbildern sind in Abbildung 9 gezeigt.

Die acht Magenkarzinom-Zelllinien wurden in zwei Subgruppen eingeteilt. Im ersten Projekt wurden AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 Zellen untersucht. Diese Zellen sind auf Matrix-beschichteten Glasbodenschälchen kultivierbar und wurden in Bezug auf ihre Motilität und die durch Behandlung induzierten molekularen Änderungen analysiert. Die Magenkarzinom-Zelllinien MKN28, MKN45 und KATOIII exprimieren E-Cadherin und wurden aus diesem Grund im zweiten Teil der Arbeit für die Untersuchung des Einflusses von E-Cadherin auf molekulare Therapien mit Cetuximab verwendet.

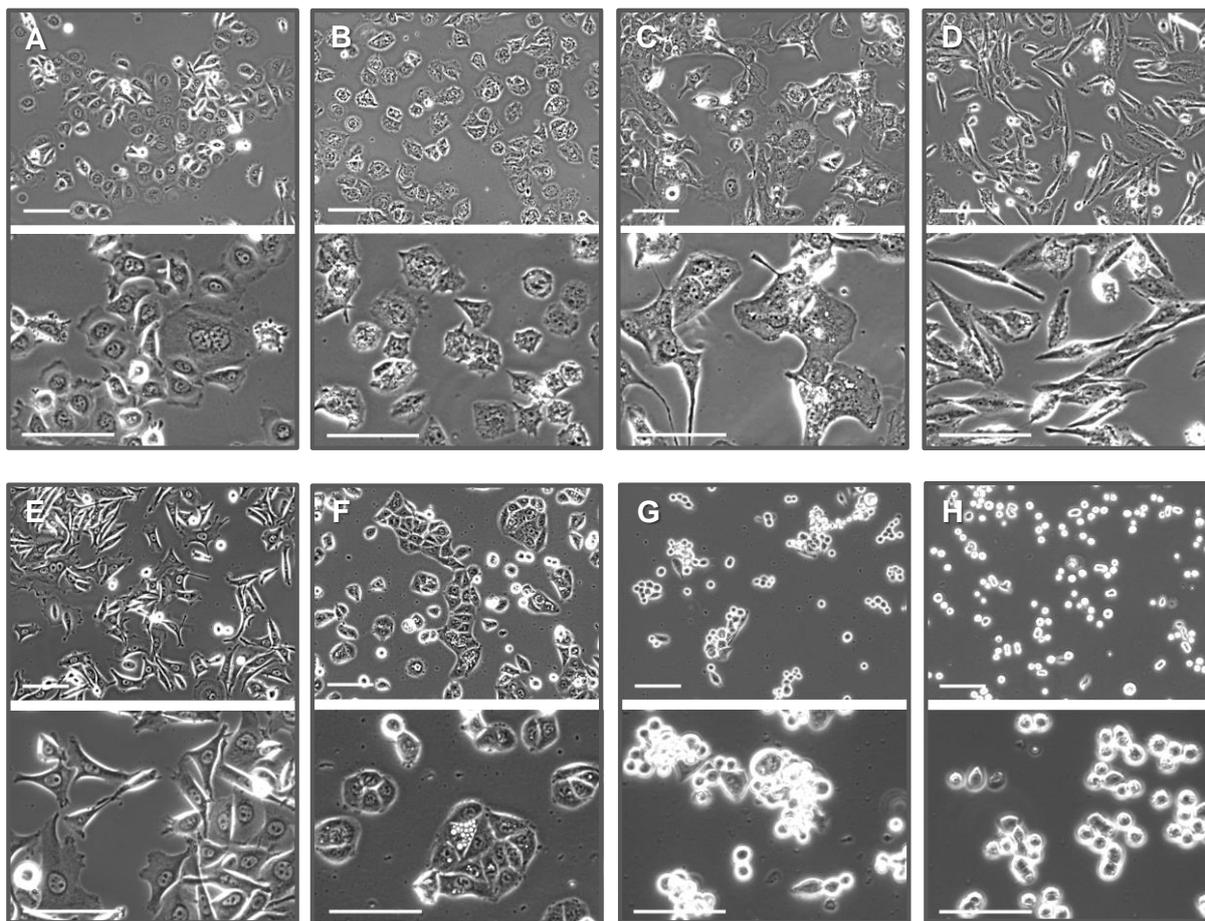


Abbildung 9: Morphologie der Magenkarzinom-Zelllinien A) AGS, B) AZ521, C) Hs746T, D) LMSU, E) MKN1, F) MKN28, G) MKN45, H) KATOIII. Abgebildet sind Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen (Axio Observer A1, 10x (oberes Bild) und 20x (unteres Bild) Objektiv) der Zellen unter Standard-Kultivierungsbedingungen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

3.2 Proteomische Analysen

3.2.1 Analyse der Expression und Aktivierung von EGFR

Eine Ligandenbindung an den EGFR resultiert in dessen Dimerisierung, Stimulation der Tyrosinkinaseaktivität und schließlich in der Aktivierung nachgeschalteter Signalwegs-Kaskaden. Die Expression und Aktivierung des EGFR wurden in den fünf Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 durch Western Blot Analysen bestimmt und quantitativ ausgewertet.

Die Analyse der EGFR-Expressionslevel in Medium mit FKS zeigte, dass in allen Zelllinien in unbehandeltem Zustand EGFR exprimiert wird, jedoch in unterschiedlichen Stärken. MKN1 Zellen zeigten die stärkste Expression des EGFR, gefolgt von LMSU und Hs746T, sowie von AGS und AZ521 Zellen mit nur geringer EGFR-Expression (Abbildung 10; Signifikanzwerte im Anhang in Tabellen S1 und S2).

Das Aktivierungslevel des EGFR wurde über die Western Blot-basierte Analyse der Phosphorylierung an Tyrosin 1068 (Y1068) bestimmt. Die deutlich stärkste Phosphorylierung an Y1068 wies die Zelllinie Hs746T auf, darauf folgten MKN1 und AZ521 Zellen mit ungefähr gleich starker Expression des pEGFR (Y1068) sowie AGS und LMSU Zellen. Die Aktivierung des EGFR in den untersuchten Zelllinien variierte stark und korrelierte nicht mit der Expression des EGFR.

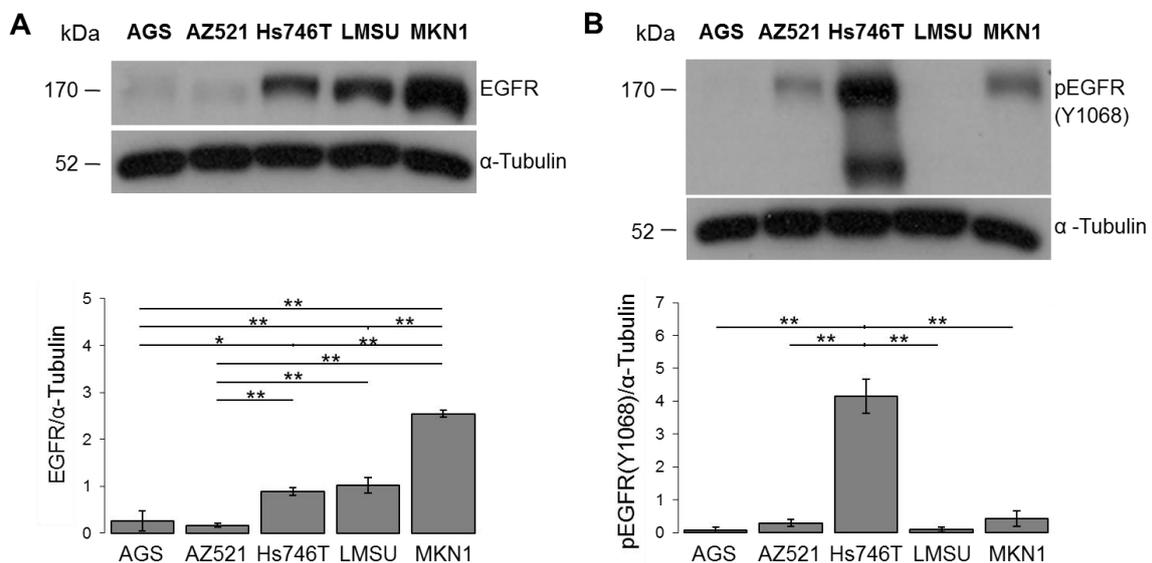


Abbildung 10: EGFR-Expression und -Aktivierung in Magenkarzinom-Zelllinien. Die (A) Expressionslevel sowie die (B) Aktivierungslevel, gemessen über die Expression von phosphoryliertem EGFR (Y1068), wurden mittels Western Blot Analysen in Gesamtprotein-Lysaten der Magenkarzinom-Zelllinien bestimmt. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin verwendet. Die Expressionslevel wurden mithilfe densitometrischer Analysen berechnet und in Relation zu α -Tubulin gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) \pm SD dreier unabhängiger Experimente, sowie die p-Werte (Welch t-Test; * = p-Wert \leq 0,050; ** = p-Wert \leq 0,010). Es ist jeweils ein repräsentativer Blot gezeigt. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels Welch t-Test werden im Anhang in den Tabellen S1 (A) und S2 (B) aufgeführt.

3.2.2 Kinetische Untersuchungen zum Einfluss von EGF auf

Magenkarzinom-Zelllinien

Mittels Western Blot Analyse wurde der Einfluss des EGFR Liganden EGF auf die Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 untersucht. Die Zellen wurden 16 h gehungert und anschließend für kinetische Untersuchungen 1 - 60 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die EGF-Bindung an den EGFR führt zur Aktivierung des Rezeptors und nachgeschalteter Signalwegs-Komponenten wie z.B. MAPK und AKT. Die Aktivierung von EGFR, MAPK und AKT wurde in den fünf Magenkarzinom-Zelllinien auf Proteomebene bestimmt und quantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 grafisch dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Zellen sind Tabelle S3 (Anhang) zu entnehmen.

Die Aktivierung des EGFR wurde über Western Blot-basierte Analyse der Phosphorylierung an Y1068 bestimmt. In allen Zelllinien wurde eine deutliche Erhöhung des pEGFR Levels nach Stimulation mit EGF detektiert. Die Aktivierung des EGFR erreichte nach 60 min bei allen Zelllinien ungefähr das Ausgangsniveau. Es wurde gezeigt, dass EGF den EGFR in allen untersuchten Zelllinien transient aktiviert.

In allen Zelllinien kam es zu einer Aktivierung der MAPK. Diese wurde über Phosphorylierungen an den Aminosäuren Threonin 202 und Tyrosin 204 (T202/Y204) detektiert. Durch EGF stieg die Aktivierung der MAPK verglichen zur unstimulierten Probe leicht an. Dabei zeigte sich bei fast allen Zelllinien, dass die MAPK-Aktivierung, im Vergleich zur Aktivierung von EGFR, zeitversetzt und in geringerem Ausmaß erfolgte. Bei den meisten Zelllinien war das Ausgangs- und Endniveau identisch. MKN1 Zellen jedoch zeigten ein deutlich erhöhtes pMAPK-Niveau nach einer 60-minütigen Stimulation mit EGF im Vergleich zum unbehandelten Zustand.

Die Analyse der Phosphorylierung von AKT an Serin 473 (S473) wurde als Maß für die AKT-Aktivierung verwendet. Alle untersuchten Zelllinien reagierten auf EGF mit einer Aktivierung von AKT, die bereits in den ersten Minuten der EGF-Stimulation einsetzt. Das Ausgangsniveau wird nicht in allen Fällen innerhalb einer 60-minütigen Stimulation mit EGF erreicht.

Zusammengefasst zeigte sich, dass in allen untersuchten serumdeprivierten Zelllinien eine transiente Aktivierung des EGFR durch EGF erfolgte. Die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwegsmoleküle MAPK und AKT setzte zeitverzögert zur EGFR-Aktivierung ein.

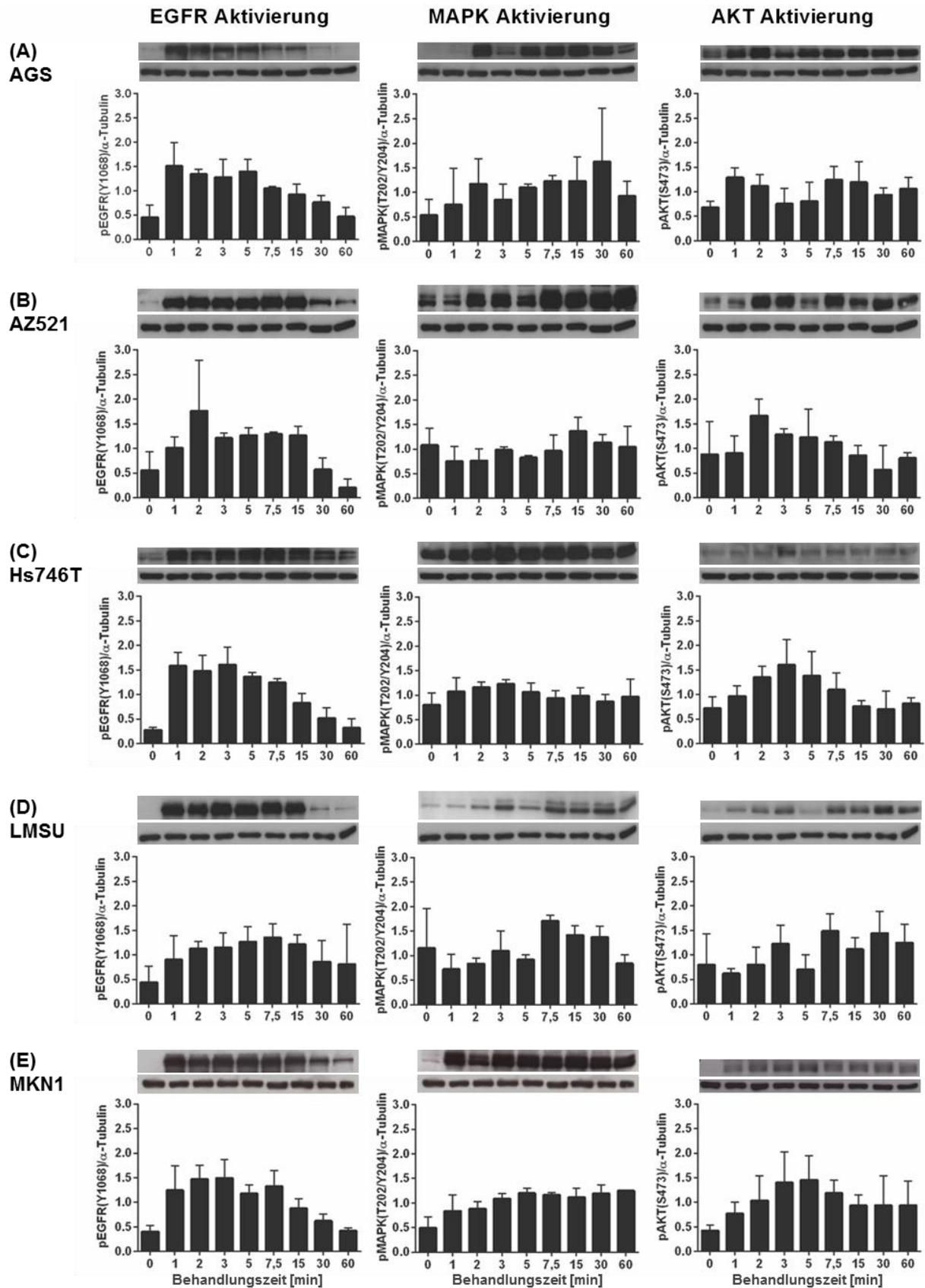


Abbildung 11: Kinetische Aktivierung von EGFR, MAPK und AKT durch EGF in den Magenkarzinom-Zelllinien (A) AGS, (B) AZ521, (C) Hs746T, (D) LMSU und (E) MKN1. Die Zellen wurden vor der Stimulation mit 100 ng/ml EGF 16 h gehungert. Die Aktivierungen wurden mittels Western Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern (pEGFR (Y1068), pMAPK (T202/Y204), pAKT (S473)) bestimmt. Die

Aktivierungslevel wurden durch densitometrische Analysen bestimmt und auf die Expressionsstärke des Referenzproteins α -Tubulin normalisiert. Es sind MW und SD aus je drei unabhängigen Experimenten dargestellt, sowie je ein repräsentativer Blot des analysierten Proteins (oben) sowie des Referenzproteins (unten; α -Tubulin, 55 kDa). Dabei sind in der linken Spalte die EGFR-Aktivierung (170 kDa), in der mittleren Spalte die MAPK-Aktivierung (42/44 kDa) und in der rechten Spalte die Aktivierung von AKT (60 kDa) abgebildet. Statistisch signifikante Werte sind im Anhang Tabelle S3 zu entnehmen.

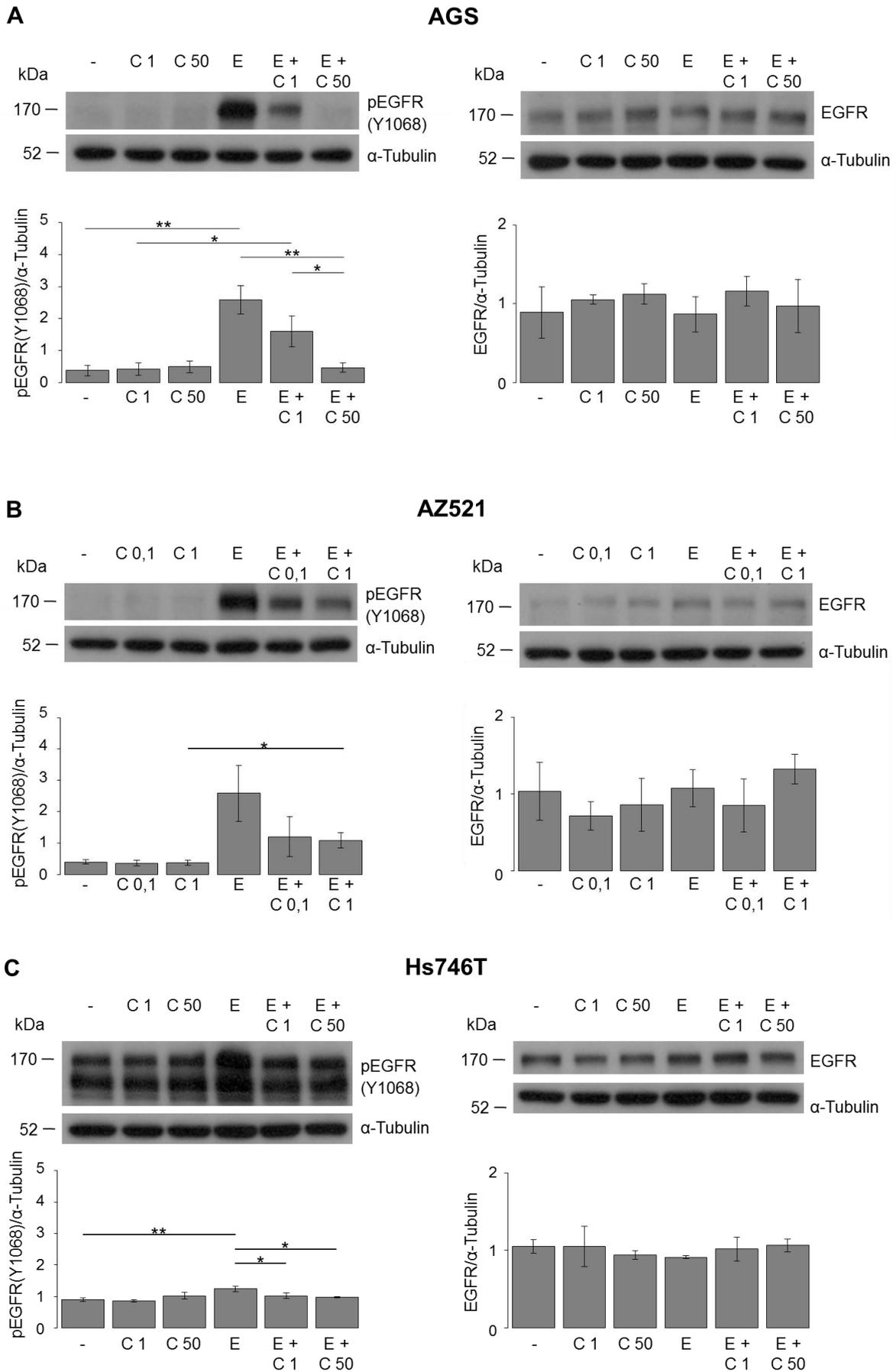
3.2.3 Der Einfluss von EGF- und Cetuximab-Behandlungen auf die Expression und Aktivierung des EGFR

Die Wirkungen von EGF und dem EGFR-Inhibitor Cetuximab auf die Expression und Aktivierung des EGFR wurden über Western Blot Analysen bestimmt. Um die Tumorsituation in den Zellkultur-experimenten besser abzubilden, wurden die Zellen in diesem Ansatz nicht serumdepriviert. Außerdem wurde die EGF-Konzentration reduziert um im Bereich der physiologischen Konzentration [199, 200] zu sein: Statt 100 ng/ml EGF, wie im vorherigen Versuch, wurden 5 ng/ml EGF zur Stimulation der Zellen verwendet.

Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Cetuximab-Konzentrationen pro Zelllinie eingesetzt: Zelllinien, die in der Proliferation (siehe Kapitel 3.2.1) stark auf Cetuximab reagierten (AZ521, MKN1) wurden mit 0,1 und 1 μ g/ml Cetuximab behandelt, Zelllinien, die Cetuximab-resistent waren (AGS, Hs746T, LMSU) wurden mit 1 und 50 μ g/ml Cetuximab behandelt. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, reagierten die Zellen innerhalb weniger Minuten auf die EGF-Stimulation. Für diesen folgenden Ansatz wurde eine Behandlungszeit von 3 min gewählt.

Über die Detektion von phosphoryliertem EGFR (Y1068) wurde gezeigt, dass EGF in AGS, AZ521, LMSU und MKN1 Zellen EGFR aktivierte und dass diese EGF-induzierte Aktivierung des EGFR durch Cetuximab konzentrationsabhängig gehemmt werden konnte (Abbildung 12A, B, D, E). Im Gegensatz dazu wiesen Hs746T Zellen eine Cetuximab-Resistenz in Bezug auf die Aktivierung des EGFR (Y1068) auf (Abbildung 12C). Die EGFR-Expression blieb unabhängig von EGF bzw. Cetuximab in fast allen untersuchten Zelllinien ungefähr konstant. Die Signifikanzlevel sind in Tabelle S4 (Anhang) zusammengefasst.

Zusätzlich zu den in Abbildung 12 gezeigten Versuchen, in denen die Zellen vor und während der Stimulation in FKS-haltigem Medium kultiviert wurden, wurde auch der Einfluss von EGF- und Cetuximab-Behandlungen auf die Expression und Aktivierung des EGFR in serumdeprivierten Zellen analysiert (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden serumdeprivierte Zellen mit einer höheren EGF-Konzentration (30 ng/ml) und mit denselben Cetuximab-Konzentrationen wie Zellen, die in FKS-haltigem Medium kultiviert und stimuliert wurden, behandelt. Serumdeprivierte AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 Zellen wiesen - wie Zellen, die in FKS-haltigem Medium kultiviert wurden - eine EGF- und Cetuximab-Sensitivität in Bezug auf die Aktivierung des EGFR auf. Die Expression war in allen Zellen unabhängig von den Behandlungen auf demselben Niveau.



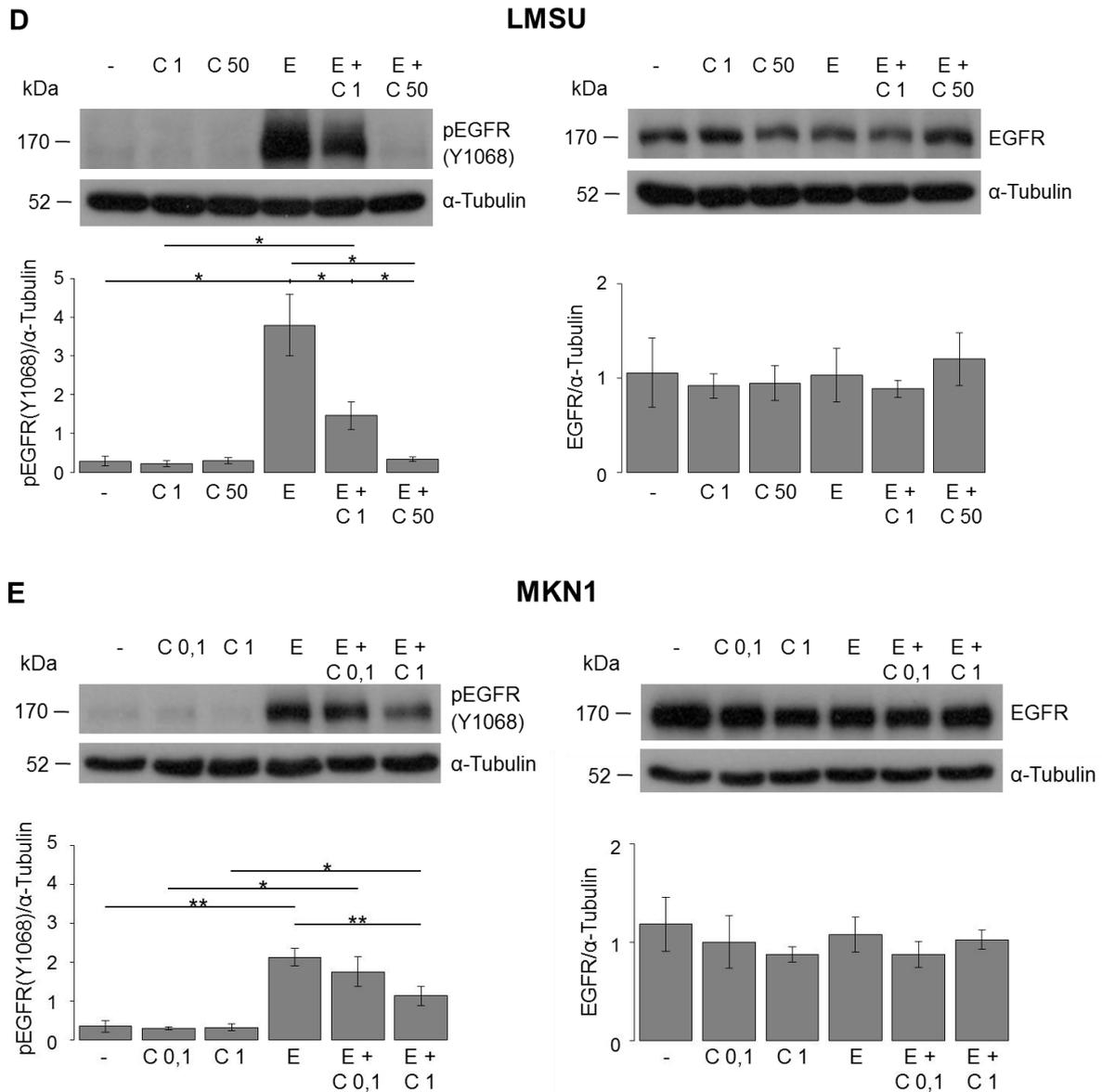


Abbildung 12: Einfluss von EGF und Cetuximab auf die EGFR-Aktivierung und -Expression in den Magenkarzinom-Zelllinien (A) AGS, (B) AZ521, (C) Hs746T, (D) LMSU, (E) MKN1. Die Level von aktiviertem und gesamtem EGFR wurden nach dreiminütiger Behandlung der Zellen mit EGF und/oder Cetuximab via Western Blot Analysen mit einem pEGFR spezifischen Antikörper (Y1068) und einem Gesamt-EGFR Antikörper bestimmt. Die Zellen wurden in Medium mit FKS kultiviert. Die Expressionslevel von EGFR und pEGFR (Y1068) wurden durch densitometrische Analysen bestimmt und auf die Gesamtprotein-konzentration, die über das Haushaltsprotein α -Tubulin bestimmt wurde, normalisiert. Es sind MW und SD aus je drei unabhängigen Experimenten, sowie statistisch signifikante Werte mit Signifikanzlevel von * = p-Wert \leq 0,050 und ** = p-Wert \leq 0,010 (Welch t-Test) dargestellt. Es sind nur relevante Signifikanzen eingetragen, d.h. Signifikanzen, die durch den paarweisen Vergleich von vergleichbaren Behandlungen ermittelt wurden. Abkürzungen: C 0,1: 0,01 μ g/ml Cetuximab; C 1: 1 μ g/ml Cetuximab; C 50: 50 μ g/ml Cetuximab; E: 5 ng/ml EGF; E + C 0,1: 5 ng/ml EGF und 0,1 μ g/ml Cetuximab; E + C 1: 5 ng/ml EGF und 1 μ g/ml Cetuximab; E + C 50: 5 ng/ml EGF und 50 μ g/ml Cetuximab; pEGFR: phosphorylierter EGFR (Y1068). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels Welch t-Test sind im Anhang in Tabelle S4 gelistet.

3.2.4 Kinetische Untersuchungen zum Einfluss von EGF und Cetuximab auf die Aktivität von EGFR und dessen nachgeschaltete Signalwege

Während im Kapitel 3.2.3 die Aktivierung und Expression des EGFR bei einer dreiminütigen Behandlung von EGF und/oder Cetuximab untersucht wurde, sollte anschließend der zeitliche Verlauf der Aktivierung des EGFR sowie zweier nachgeschalteter Moleküle, MAPK und AKT, untersucht werden. Dazu wurden Western Blot Analysen mit einer Cetuximab-sensitiven Zelllinie, MKN1, und einer Cetuximab-resistenten Zelllinie, Hs746T, durchgeführt. Die Phosphorylierungslevel von EGFR, MAPK und AKT wurden nach Behandlungszeiten von 1 min, 3 min, 15 min und 4 h bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte über den Welch t-Test.

Bei MKN1 Zellen wurden vier unterschiedliche Cetuximab-Konzentrationen (0,05, 0,1, 1, 10 µg/ml) verwendet, jeweils mit bzw. ohne zusätzliches EGF (5 ng/ml), sowie eine unbehandelte Kontrolle und eine Probe, die ausschließlich mit EGF stimuliert wurde. Wurden die Zellen vor der Behandlung serumdepriviert, so wurden 30 ng/ml EGF zur Stimulation eingesetzt.

Die Phosphorylierung von EGFR in der Cetuximab-sensitiven Zelllinie MKN1 stieg nach Stimulation mit EGF im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich an (Abbildung 13A; Tabelle S5 im Anhang). In MKN1 Zellen, die vor EGF-Stimulation gehungert wurden, war der Anstieg noch stärker ausgeprägt (Abbildung 14; Tabelle S6 im Anhang).

Durch Cetuximab wurde die EGF-induzierte EGFR-Aktivierung in MKN1 Zellen reduziert. Eine Cetuximab-Konzentration von lediglich 0,05 µg/ml kombiniert mit 5 ng/ml EGF war zwar zu gering um zu einer Reduktion der EGFR-Aktivität im Vergleich zur EGF-Monobehandlung zu führen. Höhere Cetuximab-Konzentrationen (1 µg/ml und 10 µg/ml) allerdings führten unter zusätzlicher EGF-Behandlung zu einem teils hochsignifikanten Rückgang der EGFR-Aktivierung nach 3 min und 15 min. Eine einminütige sowie eine vierstündige Behandlung mit 1 µg/ml und 10 µg/ml Cetuximab und EGF führten - bezogen auf EGF-behandelte MKN1 Zellen - zu einer Reduktion der EGFR-Aktivierung.

MKN1 Zellen, die mit Cetuximab, aber ohne zusätzliches EGF, behandelt wurden, zeigten im direkten Vergleich zu unbehandelten MKN1 Zellen keine signifikanten Reduktionen in der EGFR-Aktivierung. Bei unbehandelten MKN1 Zellen variierte die Phosphorylierung des EGFR in den drei durchgeführten Versuchen sehr stark.

Unabhängig von der Behandlungszeit zeigte sich bei steigenden Cetuximab-Konzentrationen, eine umso stärkere Abnahme der EGFR-Aktivierung.

Bei der Aktivierung der MAPK wurden in MKN1 Zellen keine signifikanten Veränderungen nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung detektiert (Abbildung 13B). Nach einminütiger Stimulationszeit führte weder eine EGF-Stimulation noch eine Hemmung mit Cetuximab zu messbaren Differenzen der MAPK-Aktivierung. Nach drei- und 15-minütiger Stimulation mit EGF zeigte sich ein Trend im Anstieg der MAPK-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten MKN1 Zellen. Mit fort-

geschrittener Stimulationszeit erhöhte sich die Differenz der pMAPK Level von MKN1 Zellen, die mit EGF und Cetuximab behandelt wurden und alleinig mit Cetuximab behandelten MKN1 Zellen. Eine Cetuximab-Monotherapie führte zu einer zeitabhängigen, aber nicht konzentrationsabhängigen Reduktion der MAPK-Aktivierung.

In der Zelllinie MKN1 konnten kaum signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Behandlungen mit EGF und/oder Cetuximab in der Aktivierung von AKT detektiert werden (Abbildung 13C). Die Unterschiede zwischen Kombinationsbehandlungen und Cetuximab-Monobehandlungen waren sehr gering. Nach einminütiger Behandlung waren diese nicht zu sehen, nach 3 min, 15 min und 4 h Behandlungsdauer waren leichte Differenzen der Aktivierungslevel zu sehen. Dabei wurde ein leichter Anstieg der AKT-Aktivierung nach Stimulation mit EGF gemessen. Eine Monobehandlung mit Cetuximab für 15 min und 4 h reduzierte die basale AKT-Aktivierung in MKN1 Zellen.

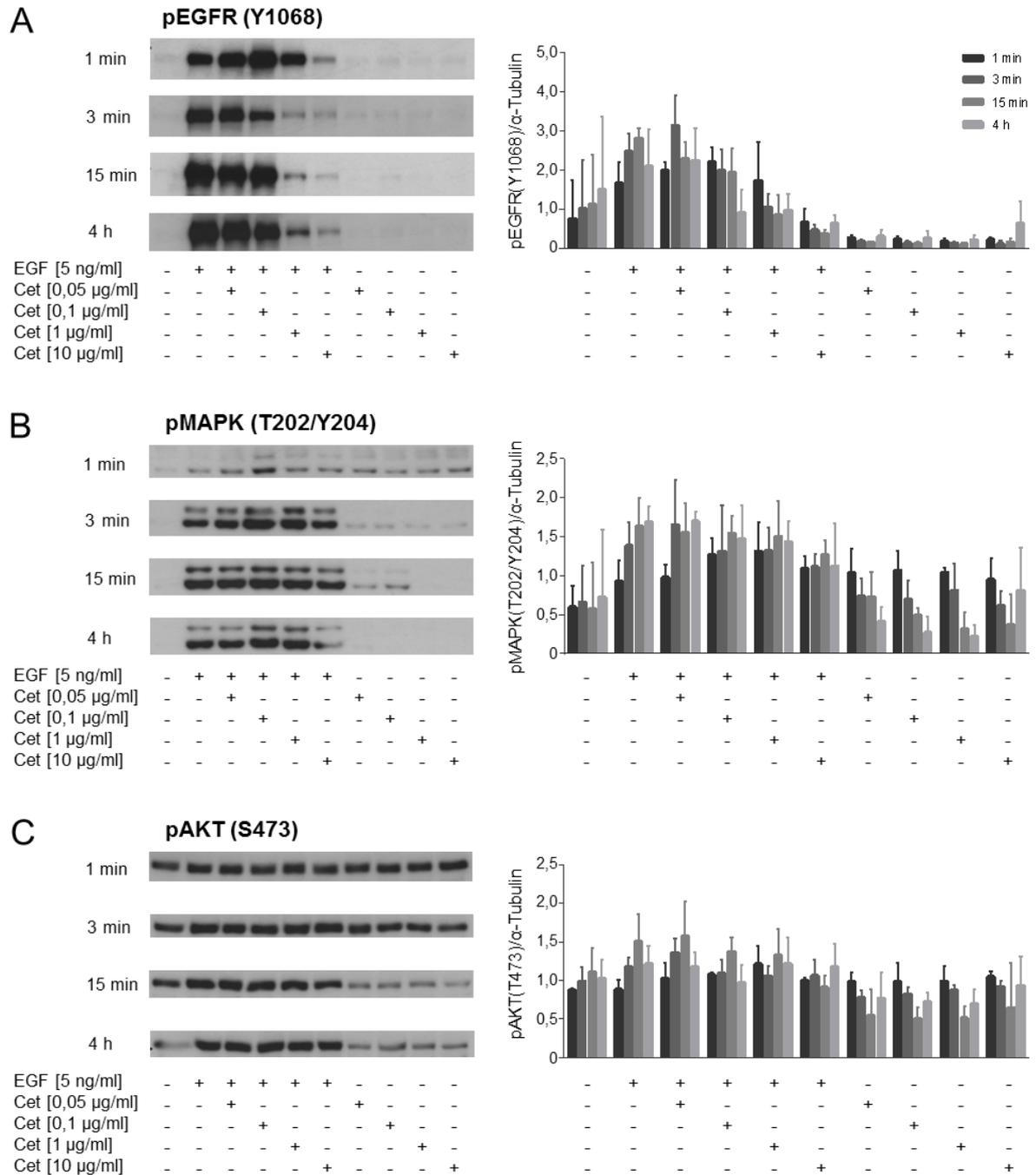


Abbildung 13: Auswirkungen von EGF und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die Aktivierung von (A) EGFR, (B) MAPK und (C) AKT in MKN1 Zellen. EGFR-, MAPK- und AKT-Aktivierungen wurden in Gesamteinlysaten von EGF und/oder Cetuximab behandelten Zellen mittels Western Blot Analysen bestimmt. Es wurden phosphospezifische Antikörper gegen (A) pEGFR (Y1068), (B) pMAPK (T202/Y204) und (C) pAKT (S473) verwendet. Die abgebildeten Ergebnisse sind MW und SD von je drei unabhängigen Experimenten. Die relativen Intensitäten wurden über die Expression von α -Tubulin normalisiert. Zusätzlich ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt. Signifikanzwerte sind Tabelle S5 (Anhang) zu entnehmen.

Bei zuvor gehungerten Zellen wurde die EGF-Konzentration auf 30 ng/ml im Vergleich zu 5 ng/ml EGF erhöht. Wie oben beschrieben, zeigten MKN1 Zellen, die vor der Behandlung gehungert wurden, im unbehandelten Zustand ein geringes basales EGFR-Aktivierungslevel, das EGF-induziert stark anstieg. Somit lag eine größere Differenz der EGFR-Aktivierungslevel von mit EGF-behandelten und alleinig Cetuximab-behandelten Zellen vor. Gehungerte und anschließend mit EGF stimulierte MKN1 Zellen wiesen eine geringere Reduktion der EGFR-Aktivierung nach Cetuximab-Behandlung auf als nicht gehungerte MKN1 Zellen. Kurze Cetuximab-Behandlungen (1, 3 und 15 min) führten, unabhängig von vorausgehender Serumdeprivation, zu einer stärkeren Reduktion der EGFR-Aktivierung als lange (4 h) Behandlungen mit Cetuximab (Abbildung 14).

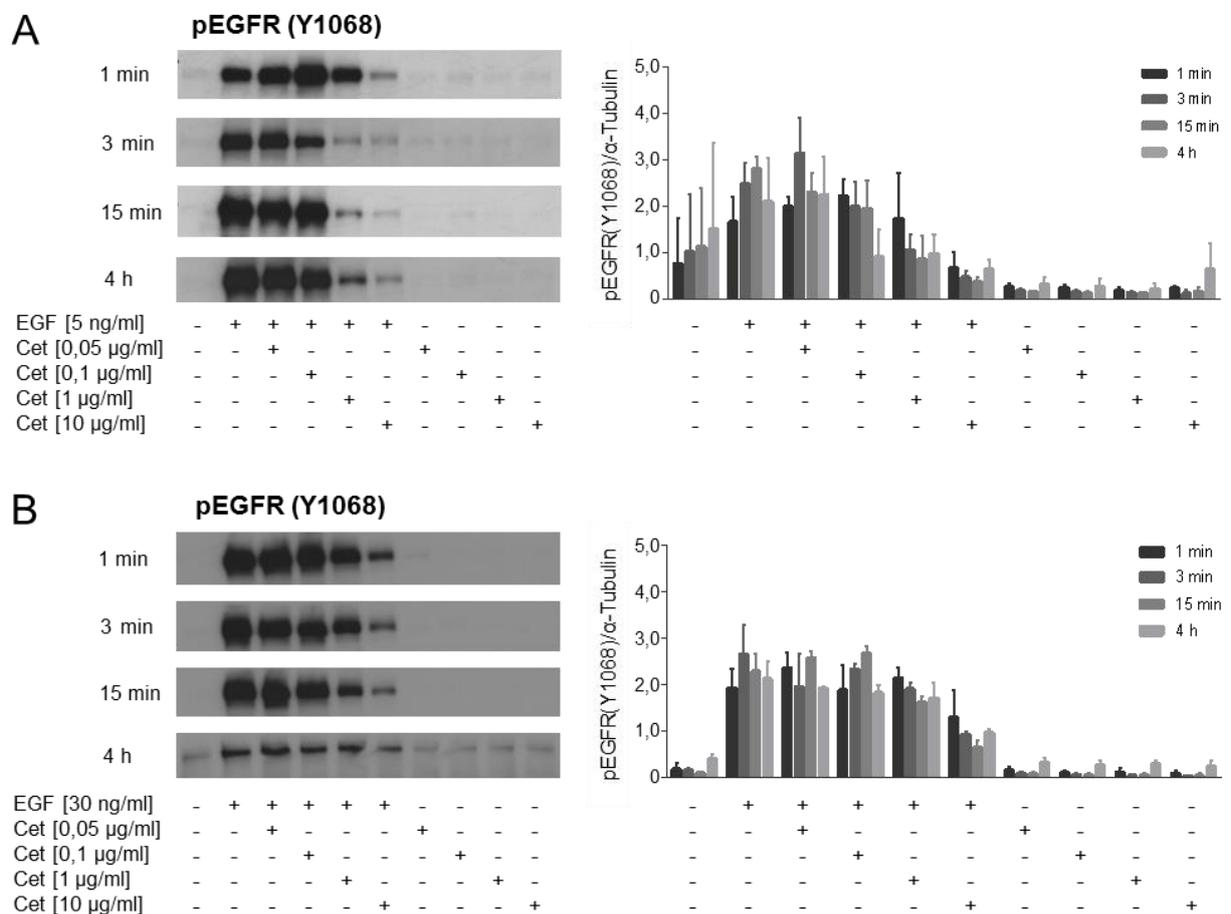


Abbildung 14: Auswirkungen von EGF und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die Aktivierung von EGFR in MKN1 Zellen, die in (A) Vollmedium sowie (B) unter Serumdeprivation kultiviert wurden. Die Aktivierung des EGFR wurde über die Phosphorylierung an Y1068 in Gesamtproteinlysaten von EGF und/oder Cetuximab behandelten Zellen mittels Western Blot Analysen bestimmt. Die abgebildeten Ergebnisse sind MW und SD von je drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzwerte sind im Anhang in Tabelle S6 aufgelistet. Die relativen Intensitäten wurden über die Expression von α -Tubulin normalisiert. Zusätzlich ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt.

Hs746T Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Cetuximab-Konzentrationen behandelt. Da diese Cetuximab-resistente Zelllinie, wie erwartet, kein Ansprechen bei geringen Cetuximab-Konzentrationen, wie sie für MKN1 Zellen zur Hemmung der EGFR-Aktivierung verwendet wurden, zeigte, wurden Hs746T Zellen mit Cetuximab-Konzentration von 1 µg/ml sowie 50 µg/ml Cetuximab behandelt. Hs746T Zellen, die in FKS-haltigem Medium kultiviert und stimuliert wurden, wurden mit 5 ng/ml EGF stimuliert. In Versuchen mit serumdeprivierten Hs746T Zellen wurde 30 ng/ml EGF zur Stimulation eingesetzt.

Die Aktivierung von EGFR, MAPK und AKT in Hs746T Zellen wurde kaum durch Cetuximab beeinflusst (Abbildung 15). Einzelne signifikante Differenzen wurden detektiert. Die Aktivierung des EGFR zeigte in Zellen, die in FKS-haltigem Medium kultiviert wurden, weder nach EGF- noch nach Cetuximab-Behandlungen signifikante Unterschiede (Abbildung 15A). Hs746T Zellen, die vor Behandlung gehungert wurden, wiesen nach ein- und dreiminütiger Stimulation mit EGF einen hochsignifikanten Anstieg der EGFR-Aktivierung auf. Zusätzliches Cetuximab in hoher Konzentration (50 µg/ml) ließ nach einer Behandlung über 3 min die Aktivierung signifikant sinken (Abbildung 16A). Die Signifikanzwerte sind im Anhang in Tabelle S7 aufgelistet.

In serumdeprivierten Hs746T Zellen führte die Gabe von Cetuximab und EGF zu wenigen signifikanten Differenzen in der Aktivierung der MAPK (Abbildung 16B). So bewirkten Behandlungen mit EGF und 50 µg/ml bzw. 1 µg/ml Cetuximab nach 1 min einen Anstieg im Vergleich zur Monobehandlung mit EGF. Die Aktivität der MAPK in Hs746T Zellen, die in FKS-haltigem Medium kultiviert wurden, wurde weder durch Behandlung mit EGF noch mit Cetuximab signifikant verändert (Abbildung 15B).

Bei der AKT-Aktivierung zeigte sich im Gegensatz zur EGFR- und MAPK-Aktivierung ein spiegelbildliches Ergebnis: In serumdeprivierten Hs746T Zellen wurden keinerlei signifikante Unterschiede der AKT-Aktivierung nach EGF- oder Cetuximab-Behandlung detektiert (Abbildung 16C), nicht-serumdeprivierte Hs746T Zellen zeigten einzelne detektierbare Unterschiede (Abbildung 15C), die aufgrund der Cetuximab-Resistenz dieser Zelllinie der Vollständigkeit halber aufgeführt werden sollen: So wurde unter Vollmedium-Bedingung eine geringe EGF-induzierte sowie Cetuximab-induzierte AKT-Aktivierung nach vierstündiger Behandlung detektiert. Dreiminütige Behandlungen mit 1 µg/ml sowie 50 µg/ml Cetuximab mit zusätzlichem EGF hingegen führten zu signifikanten Reduktionen der AKT-Aktivierung. Bezogen auf die AKT-Aktivierung führten EGF- und Cetuximab-Behandlungen nicht zu gegensätzlichen Effekten.

Zusammengefasst ergibt sich, 1.) der EGFR war in beiden untersuchten Zelllinien durch EGF stimulierbar; in MKN1 Zellen deutlich stärker als in Hs746T Zellen. Diese EGF-induzierte EGFR-Aktivierung wurde sowohl in serumdeprivierten als auch nicht-serumdeprivierten MKN1 Zellen detektiert; 2.) die Differenz der durch EGF-induzierten EGFR-Aktivierungslevel war in zuvor gehungerten Zellen sowohl bei MKN1 als auch bei Hs746T Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen - aufgrund des geringen basalen pEGFR Levels - deutlicher stärker als bei Zellen in

Vollmedium; 3.) unstimulierte MKN1 Zellen, die FKS im Medium zur Verfügung hatten wiesen eine höhere basale EGFR-Aktivität auf als serumdeprivierte MKN1 Zellen; 4.) Cetuximab inhibierte die EGFR-Aktivierung in MKN1 Zellen deutlich, in Hs746T Zellen hingegen nicht; 5.) zusätzliche EGF-Behandlung führte zu höheren Aktivierungslevel; 6.) die Einteilung in *Responder*- und *Nonresponder*-Zelllinien, die aus dem Proliferationstest hervorging, wurde auf Proteinebene verifiziert.

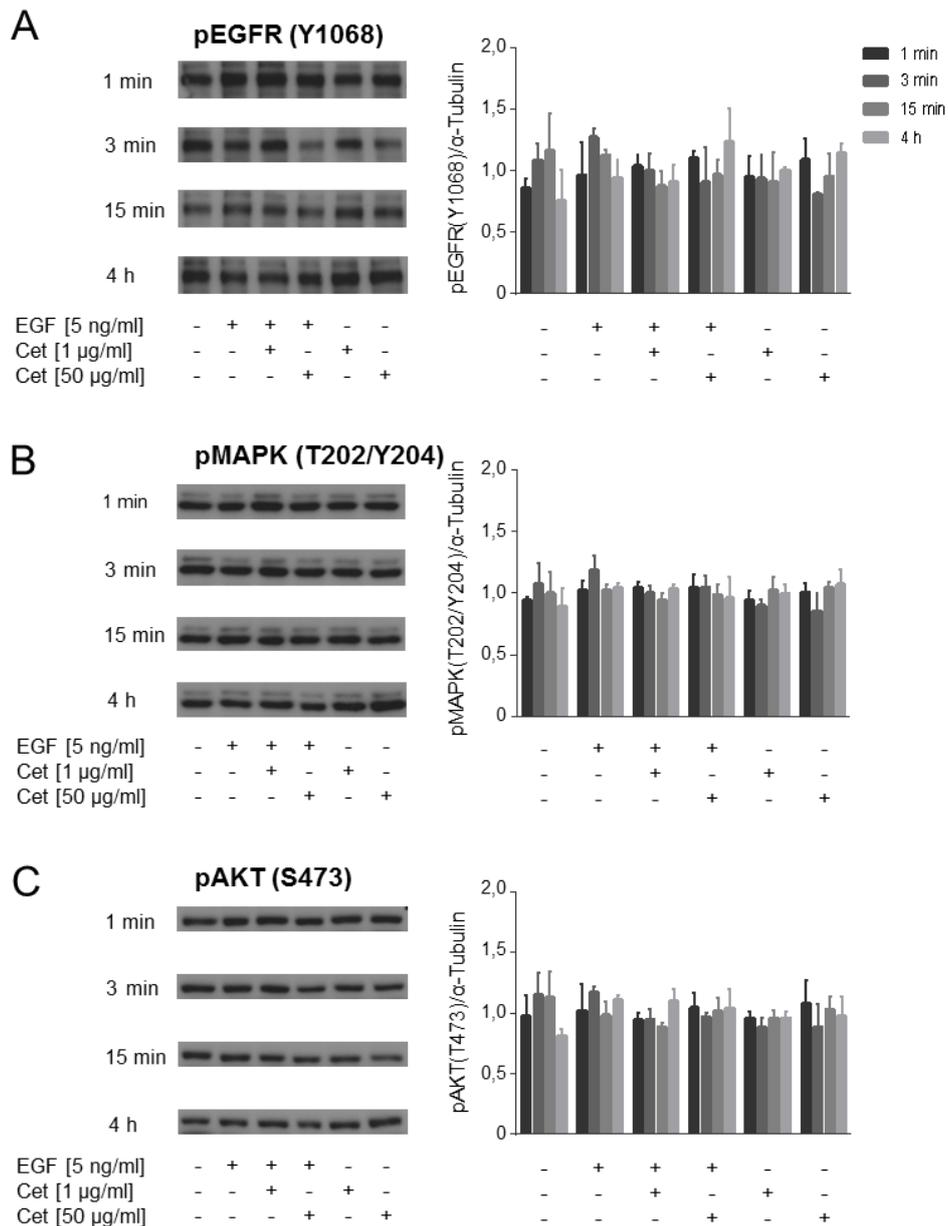


Abbildung 15: Auswirkungen von EGF und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die Aktivierung von (A) EGFR, (B) MAPK und (C) AKT in Hs746T Zellen. Die Zellen wurden in FKS-haltigem Medium kultiviert. EGFR-, MAPK- und AKT-Aktivierungen wurden in Gesamtproteinlysaten von EGF und/oder Cetuximab behandelten Zellen mittels Western Blot Analysen bestimmt. Es wurden phosphospezifische Antikörper gegen (A) pEGFR (Y1068), (B) pMAPK (T202/Y204) und (C) pAKT (S473) verwendet. Die relativen Intensitäten wurden über die Expression von α -Tubulin normalisiert. Es sind MW und SD von je drei unabhängigen Experimenten abgebildet. Signifikanzwerte sind im Anhang in Tabelle S7 verzeichnet. Zusätzlich ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt.

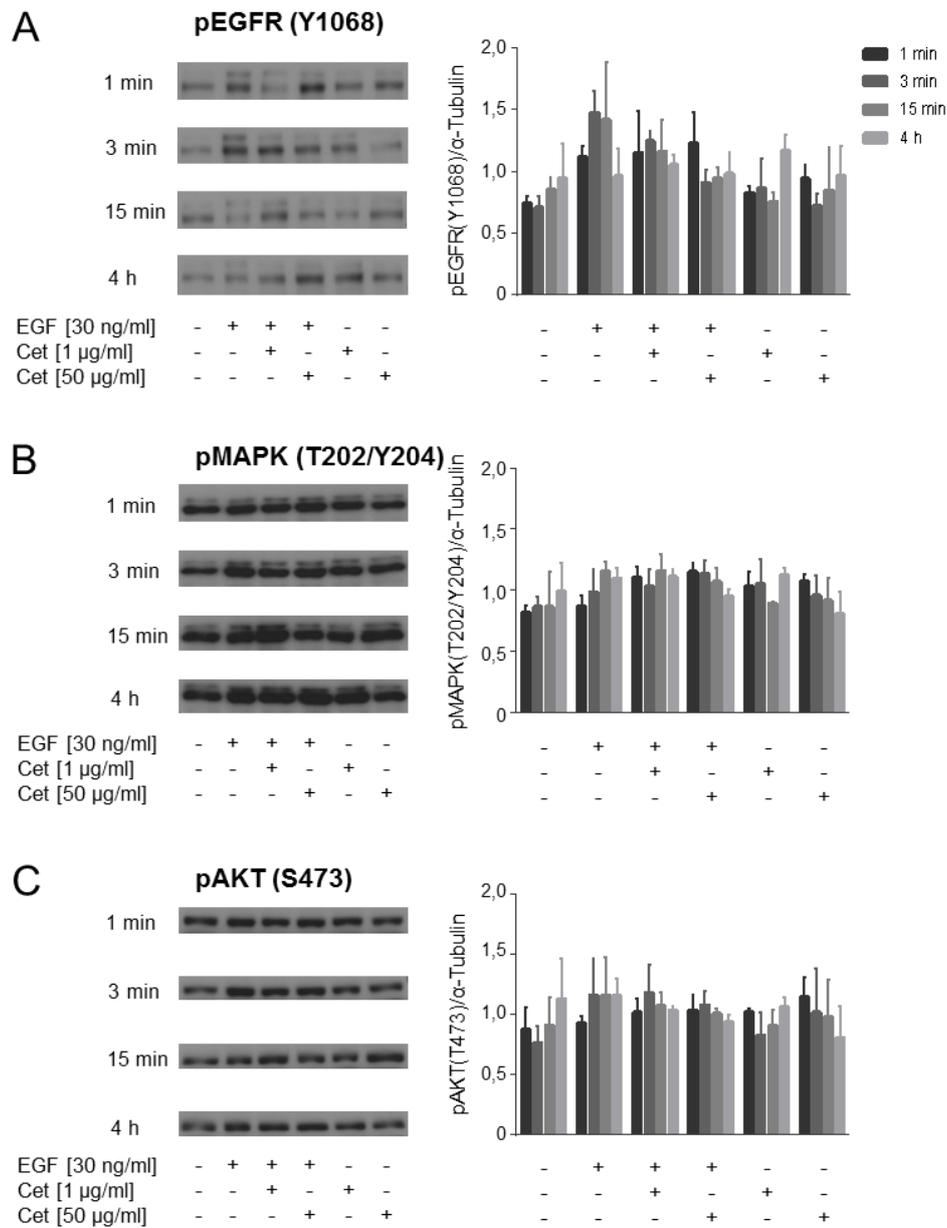


Abbildung 16: Auswirkungen von EGF und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die Aktivierung von (A) EGFR, (B) MAPK und (C) AKT in serumdeprivierten Hs746T Zellen. Die Zellen wurden für 16 h serumdepriviert. EGFR, MAPK und AKT-Aktivierungen wurden in Gesamtproteinlysaten von EGF und/oder Cetuximab behandelten Zellen mittels Western Blot Analysen bestimmt. Es wurden phosphospezifische Antikörper gegen (A) pEGFR (Y1068), (B) pMAPK (T202/Y204) und (C) pAKT (S473) verwendet. Die relativen Intensitäten wurden über die Expression von α -Tubulin normalisiert. Es sind MW und SD von je drei unabhängigen Experimenten abgebildet. Signifikanzwerte sind in Tabelle S8 (Anhang) verzeichnet. Zusätzlich ist jeweils ein repräsentativer Western Blot gezeigt.

3.2.5 Analyse der MET-Expression und Aktivierung

Unterschiedliche Studien haben auf eine prädiktive Rolle von MET in der EGFR-inhibierten Therapie hingewiesen [201-203]. Um die MET-Expression sowie die Rolle einer MET-Aktivierung in dem hier verwendeten Panel aus fünf Magenkarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Zelllinien zeigten unterschiedlich starke MET-Expressionsstärken, wobei die Zelllinie Hs746T die stärkste Expression aufwies. Die Detektion von phosphoryliertem MET (Y1234/1235) zeigte eine starke MET-Aktivierung in Hs746T Zellen, wohingegen in den anderen untersuchten Zelllinien AGS, AZ521, LMSU und MKN1 keine Aktivierung von MET detektiert werden konnte (Abbildung 17).

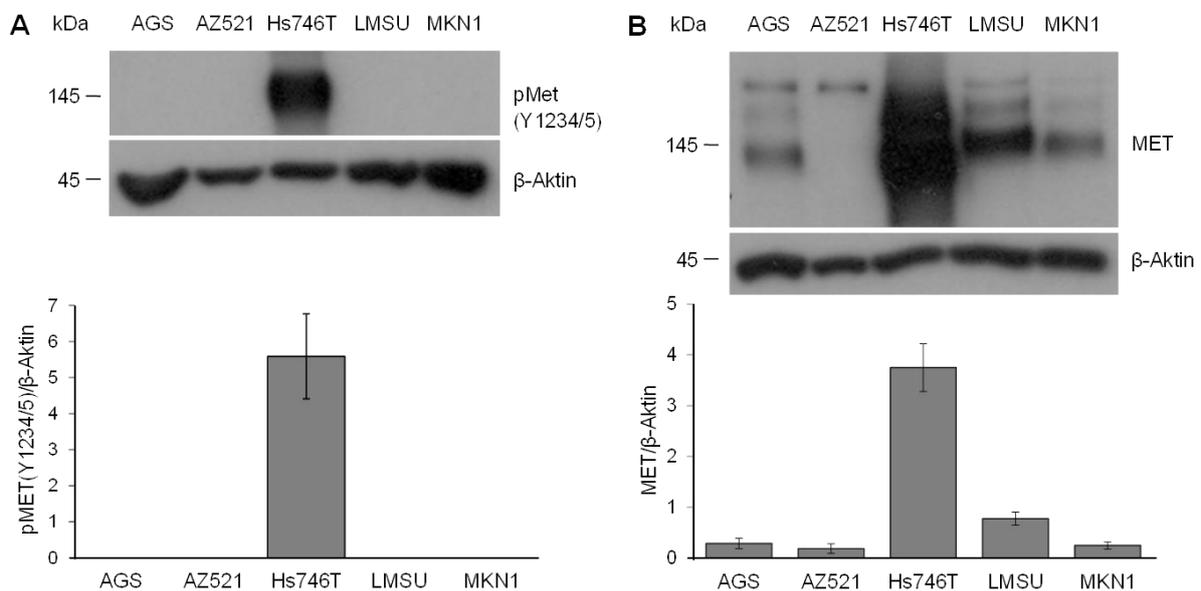


Abbildung 17: (A) Aktivierung und (B) Expression von MET in den Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Die Expression von MET und phosphoryliertem MET (Y1234/1235) in Gesamtproteinlysaten wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die relative Intensität der MET-Aktivierung wurde durch densitometrische Analyse bestimmt und mit der Expression von β -Aktin normalisiert. Der MW und die SD wurden durch drei unabhängige Versuche bestimmt. Weitere Informationen über Signifikanzwerte sind in den Tabellen S9 und S10 (Anhang) zu finden.

3.3 Phänotypische Untersuchungen

3.3.1 Cetuximab-Sensitivität der Zelllinien

Der EGFR-Signalweg ist u.a. in die Proliferation von Tumorzellen involviert. Um den Einfluss des EGFR-Inhibitors Cetuximab auf die Proliferation der Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 zu untersuchen, wurde der Proliferationstest XTT durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die metabolische Aktivität der Zellen analysiert und als Ersatzmarker für die Zellviabilität herangezogen. Die Zellen wurden über 24 h mit unterschiedlichen Cetuximab-Konzentrationen (0 bis 200 µg/ml) behandelt und anschließend mit XTT-Reagenz und ECR versetzt. Die Metabolisierung von Tetrazoliumsalzen führt zur Bildung eines Formazanfarbstoffs, der quantitativ gemessen werden kann und positiv mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert.

Die metabolischen Aktivitäten von AZ521 und MKN1 Zellen wurden durch Cetuximab signifikant reduziert (Abbildung 18). Signifikante metabolisierungshemmende Effekte wurden in MKN1 Zellen bei einer Cetuximabkonzentration ab 1 µg/ml und bei AZ521 Zellen ab 100 µg/ml Cetuximab gemessen (siehe Tabelle S12). Die Zelllinien AGS, Hs746T und LMSU wiesen keine signifikanten Verringerungen der Metabolisierungsraten auf. Signifikanzwerte sind den Tabellen S11 und S12 (Anhang) zu entnehmen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Zelllinien AZ521 und MKN1 als Cetuximab-sensitiv und AGS, Hs746T sowie LMSU Zellen als Cetuximab-resistent definiert.

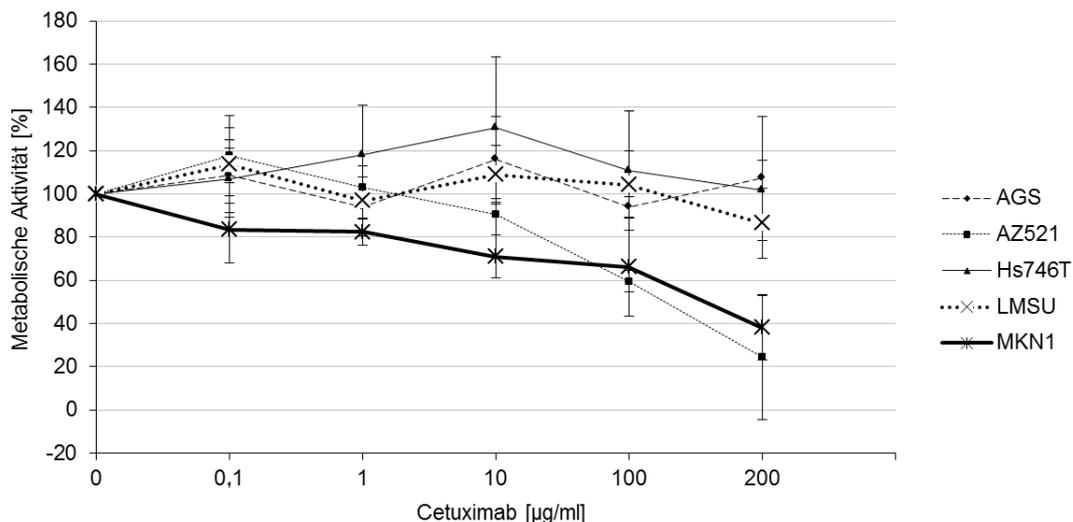


Abbildung 18: Der Effekt einer Cetuximab-Behandlung auf die metabolische Aktivität von Magenkarzinom-Zelllinien. Die Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 wurden 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cetuximab behandelt. Anschließend wurden mithilfe eines XTT-Tests die metabolischen Aktivitäten der Zellen bestimmt. Die gemessenen Werte wurden jeweils auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert. Gezeigt sind MW und SD von mindestens drei biologischen Replikaten, die jeweils aus vier technischen Replikaten bestehen. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels Welch t-Test und Einstichproben t-Test sind im Anhang in den Tabellen S11 und S12 gelistet.

3.3.2 Analyse des Bewegungsverhaltens von Magenkarzinom-Zelllinien nach EGF- und Cetuximab-Behandlungen

Neben der Proliferation und dem Überleben von Zellen [118] ist der EGFR auch für die zelluläre Bewegung [19, 204] wichtig. Diese stellt eine Voraussetzung für die Invasivität von Zellen dar [23]. Es sollte einerseits geklärt werden, ob die Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 auf EGF mit erhöhter zellulärer Motilität reagieren und andererseits ob eine durch EGF-induzierte Motilität durch den EGFR-Inhibitor Cetuximab blockiert werden kann.

Um die zellulären Bewegungen und den Einfluss von EGF und Cetuximab auf die Magenkarzinom-Zelllinien detailliert zu analysieren, wurden Zeitraffer-Mikroskopie Versuche durchgeführt. Dies ist eine aussagekräftige Methode für die detaillierte Analyse des zweidimensionalen (2D) Bewegungsverhaltens von Zellen.

Morphologisch gesehen zeigten MKN1 Zellen nach EGF-Behandlung eine verstärkte Bildung von Lamellipodien (grüner Pfeil in Abbildung 19) verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Außerdem war ein leichter Anstieg der Filopodien-Bildung (oranger Pfeil in Abbildung 19) zu beobachten. Beide Effekte konnten durch gleichzeitige Gabe von Cetuximab reduziert werden. Eine Monobehandlung mit Cetuximab führte zu reduzierter Bildung von Lamellipodien und Filopodien verglichen zur unbehandelten Kontrolle. In Hs746T Zellen konnte morphologisch kein Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungen detektiert werden.

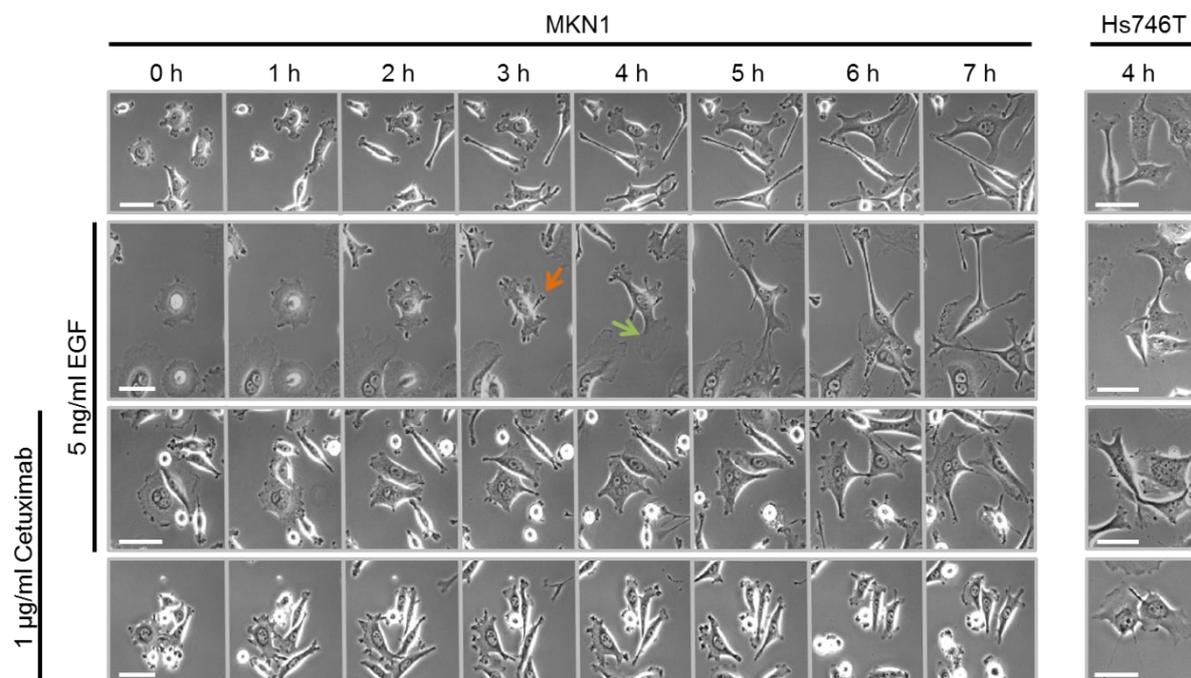


Abbildung 19: Morphologische Unterschiede in MKN1 Zellen nach Behandlung mit EGF und/oder Cetuximab während einer siebenstündigen Filmaufnahme. Gezeigt sind stündliche Aufnahmen von MKN1 Zellen unter verschiedenen Behandlungen. Außerdem sind Hs746T Zellen nach vierstündiger Behandlung gezeigt. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 µm. (Abbildung von Dr. J. Kneißl zur Verfügung gestellt, gering modifiziert)

Die Parameter „Motilitätsstatus“ und „durchschnittliche Geschwindigkeit“ wurden bestimmt, um Unterschiede im Bewegungsmuster der Zellen zu detektieren. Für die Bestimmung des Motilitätsstatus wurde die Gesamtzahl motiler Zellen ermittelt. Motile Zellen wurden dabei als Zellen, die die anfangs durch ihren Zellkörper belegte Fläche während einer Filmdauer von 7 h komplett verlassen, definiert. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Zellen wurde berechnet aus dem Quotient der Strecke, die die Zellen während der Filmdauer zurücklegen, und der Dauer der Filmaufnahme. Um die Effekte von EGF und Cetuximab auf das Bewegungsverhalten zu untersuchen, wurden die Zellen in einer mit Matrix-beschichteten Glasbodenschale ausgelegt, in einer Mikroskop-gekoppelten Inkubationskammer kultiviert und mit EGF und/oder Cetuximab behandelt. Die mittels Proliferationstest ermittelten Cetuximab-sensitiven Zelllinien AZ521 und MKN1 wurden mit 0,1 und 1 µg/ml Cetuximab behandelt. Für MKN1 Zellen wurde zusätzlich der Effekt von 0,05 µg/ml Cetuximab auf deren Bewegungsverhalten untersucht. AGS, Hs746T und LMSU Zellen wurden im Proliferationstest als Cetuximab-insensitiv eingestuft und deswegen mit höheren Cetuximab-Konzentrationen (1 und 50 µg/ml Cetuximab) behandelt. EGF wurde in Vollmedium in einer Konzentration von 5 ng/ml zugegeben. Phasenkontrast-Bilder wurden alle 3 min über 7 h aufgenommen und als Zeitraffer-Filme semi-automatisch ausgewertet. Für alle folgenden Ergebnisse zur durchschnittlichen Geschwindigkeit der fünf untersuchten Zelllinien sind die Signifikanzwerte Tabelle S13 im Anhang zu entnehmen. Signifikanzwerte der Motilitätsanalyse sind in Tabelle S14 aufgelistet.

MKN1 Zellen veränderten ihr Bewegungsverhalten nach EGF-Behandlung, was durch einen signifikanten Anstieg der Geschwindigkeit (p-Wert < 0,001) sichtbar wurde (Abbildung 20). Eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit EGF und Cetuximab führte zu signifikanten Reduktionen der durchschnittlichen Geschwindigkeiten im Vergleich zu EGF-behandelten Zellen (5 ng/ml EGF und 0,1 µg/ml Cetuximab (p-Wert = 0,004), sowie 5 ng/ml EGF und 1 µg/ml Cetuximab (p-Wert = 0,001)). Eine geringere Konzentration von Cetuximab (0,05 µg/ml) führte zu einer nicht signifikanten Reduktion, die jedoch als Trend zu erkennen war. Verglichen mit unbehandelten Zellen war die Geschwindigkeit von EGF- und Cetuximab-behandelten Zellen höher (Tabelle 9). Beim Vergleich der durchschnittlichen Geschwindigkeiten der Zellen bezogen auf unterschiedliche Cetuximab-Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass diese mit steigender Cetuximab-Konzentration leicht abnahm. Im Gegensatz zur durchschnittlichen Geschwindigkeit war die Erhöhung der Motilität der MKN1 Zellen als Antwort auf eine EGF-Stimulation nicht signifikant (Abbildung 21). Die Motilität von MKN1 Zellen, die mit beiden Stimulanzen behandelt wurden, war geringer als die von unbehandelten und alleinig EGF-behandelten Zellen. Eine Kombinationsbehandlung führte, verglichen mit EGF-behandelten Zellen, zu einer signifikanten Reduktion der Motilität (5 ng/ml EGF und 0,05 µg/ml Cetuximab (p-Wert = 0,014), 5 ng/ml EGF und 0,1 µg/ml Cetuximab (p-Wert = 0,009) sowie 5 ng/ml EGF und 1 µg/ml Cetuximab (p-Wert < 0,001)). Dieser Abfall hing von der eingesetzten Cetuximab-Konzentration ab: je höher die eingesetzte Antikörper-Konzentration, desto geringer war die Anzahl motiler Zellen (Tabelle 9). Die Motilität von MKN1 Zellen, die mit 1 µg/ml

Cetuximab behandelt wurden (n=200), war im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich reduziert (32,50 % vs. 50,45 %). Die durchschnittliche Geschwindigkeit war mit 13,65 $\mu\text{m}/\text{h}$ verglichen mit der Geschwindigkeit unbehandelter MKN1 Zellen (13,98 $\mu\text{m}/\text{h}$) nahezu gleich.

Zusammengefasst konnte für die EGF- und Cetuximab-sensitive Zelllinie MKN1 ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Geschwindigkeit durch EGF-Behandlung gezeigt werden. Dagegen hatte EGF keinen signifikanten Einfluss auf die Motilität von MKN1 Zellen. Steigende Cetuximab-Konzentrationen resultierten in einer signifikanten Reduktion motiler Zellen und hohe Cetuximab-Konzentrationen führten ebenso zu geringerer Geschwindigkeit.

Hs746T Zellen wiesen eine deutlich größere Anzahl motiler Zellen auf (Abbildung 21) und waren entscheidend schneller als MKN1 Zellen (Abbildung 20). Im Gegensatz zu MKN1 veränderten Hs746T Zellen nach EGF-Zugabe ihr Motilitätsverhalten kaum. Auch die Geschwindigkeit blieb weitestgehend konstant. Die Gabe von EGF und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cetuximab führte zu einem leichten Abfall der Geschwindigkeit verglichen mit unbehandelten und EGF-behandelten Zellen. Da kaum ein Effekt nach Behandlung mit Cetuximab-Konzentrationen, die für die Behandlung von MKN1 Zellen verwendet wurden (0,05, 0,1 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sichtbar war, wurden Cetuximab-insensitive Zelllinien mit höheren Konzentrationen (1 und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cetuximab) behandelt. Noch höhere Konzentrationen führten zu einem Ablösen der Zellen von der Matrix und wurden daher nicht eingesetzt. Nach Behandlung mit EGF und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cetuximab erhöhte sich die Geschwindigkeit von Hs746T Zellen signifikant (p-Wert = 0,042) in Bezug auf EGF-behandelte Hs746T Zellen. Eine alleinige EGF-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die durchschnittliche Geschwindigkeit von Hs746T Zellen. Alle Behandlungen führten zu einer hohen Motilitätsrate, bei denen Unterschiede kaum detektiert werden konnten. Die höchste Motilität wurde nach Behandlung mit EGF und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cetuximab bestimmt, unbehandelte Hs746T Zellen wiesen fast die gleiche Motilitätsrate auf (87,91 % vs. 87,01 %). Mit Cetuximab behandelte Hs746T Zellen (n=290) wanderten mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 43,01 $\mu\text{m}/\text{h}$ etwas schneller als die unbehandelten Kontrollen (39,42 $\mu\text{m}/\text{h}$). Der Anteil motiler Zellen betrug nach Cetuximab-Behandlung 77,93 % im Vergleich zu 87,01 % bei unbehandelten Hs746T Zellen.

AGS Zellen reagierten auf eine EGF-Behandlung mit erhöhter Geschwindigkeit (p-Wert < 0,001; Abbildung 20) und erhöhter Motilität (p-Wert = 0,037; Abbildung 21). Zusätzlich zu EGF-verabreichte Cetuximab-Behandlungen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) führten im Vergleich zu einer EGF-Monobehandlung zu signifikanten Reduktionen der Geschwindigkeit (p-Werte je < 0,001) ebenso wie zu einer starken Abnahme der Motilität (p-Wert (EGF + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cetuximab) = 0,025). AGS Zellen wiesen die höchste Geschwindigkeit und Motilität der fünf untersuchten Zelllinien auf. Die Motilitätsraten lagen, abhängig von der jeweiligen Behandlung, zwischen 90 und 100 % (Tabelle 9). Die Durchschnittsgeschwindigkeit stieg nach EGF-Behandlung im Mittel an (von 44,28 $\mu\text{m}/\text{h}$ unbehandelt auf 62,16 $\mu\text{m}/\text{h}$) und fiel mit zusätzlicher steigender Cetuximab-Gabe ab (48,46 $\mu\text{m}/\text{h}$ bei einer eingesetzten Cetuximab-Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 46,40 $\mu\text{m}/\text{h}$ bei einer Cetuximab-

Konzentration von 50 µg/ml). Die durchschnittliche Geschwindigkeit von AGS Zellen, die einer Cetuximab-Monobehandlung unterzogen wurden, lag mit 42,34 µm/h etwas unter der Geschwindigkeit unbehandelter AGS Zellen (44,28 µm/h), wohingegen die Motilität fast gleich blieb (96,65 % vs. 96,92 %).

AZ521 Zellen wiesen im Vergleich mit AGS Zellen eine deutlich niedrigere Motilität und auch Geschwindigkeit auf. Die Motilität der Zellen stieg von 5,31 % (unbehandelt) auf 8,57 % nach EGF-Behandlung (Tabelle 9). Mit zusätzlichen 0,1 µg/ml Cetuximab sank die Motilitätsrate auf 4,79 %. Wurden 1 µg/ml Cetuximab zugegeben, stieg hingegen die Anzahl motiler AZ521 Zellen (7,69 %). AZ521 Zellen reagierten auf eine EGF-Behandlung mit einem signifikanten Anstieg der Geschwindigkeit (p-Wert = 0,031; Abbildung 20). Eine zusätzliche Behandlung mit 0,1 µg/ml Cetuximab führte zu einem Abfall der Geschwindigkeit auf 10,60 µm/h (EGF-behandelt 11,94 µm/h; p-Wert = 0,020; Tabelle 9). Die Reduktion der Geschwindigkeit war nicht konzentrationsabhängig: Durch EGF und 1 µg/ml Cetuximab wurde die Geschwindigkeit nur moderat gesenkt (11,09 µm/h im Vergleich zu EGF-behandelten AZ521 Zellen mit 11,94 µm/h; p-Wert = 0,037). Die Motilität von AZ521 Zellen, die mit 1 µg/ml Cetuximab behandelt wurden (n=162), war im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert (4,32 % vs. 5,31 %). Die durchschnittliche Geschwindigkeit war mit 10,47 µm/h im Gegensatz zur Geschwindigkeit unbehandelter AZ521 Zellen (11,48 µm/h) leicht reduziert.

LMSU Zellen wiesen nach EGF-Behandlung eine deutlich höhere Motilität auf als unbehandelte Zellen (79,89 % vs. 69,18 %; p-Wert = 0,026; Tabelle 9 und Abbildung 21). Nach EGF- und Cetuximab-Behandlung (1 µg/ml) sank die Rate motiler Zellen auf 58,43 % (p-Wert < 0,001). Bei höherer Cetuximab-Konzentration von 50 µg/ml stieg die Motilität der LMSU Zellen auf 69,94 % (p-Wert = 0,033) an. Die Geschwindigkeit der Zellen stieg bei unbehandelten zu EGF-behandelten LMSU von 33,91 µm/h auf 37,74 µm/h an und fiel mit 1 µg/ml Cetuximab-Gabe auf 35,18 µm/h ab (Abbildung 20). Eine Behandlung mit EGF und zusätzlich 50 µg/ml Cetuximab resultierte in einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 40,11 µm/h. Mit Cetuximab behandelte LMSU Zellen (n=189) wiesen mit 38,07 µm/h eine etwas höhere durchschnittliche Geschwindigkeit auf als die unbehandelten Kontrollen (33,91 µm/h). Der Anteil motiler Zellen betrug nach Cetuximab-Behandlung 69,31 % im Vergleich zu 69,18 % bei unbehandelten LMSU Zellen.

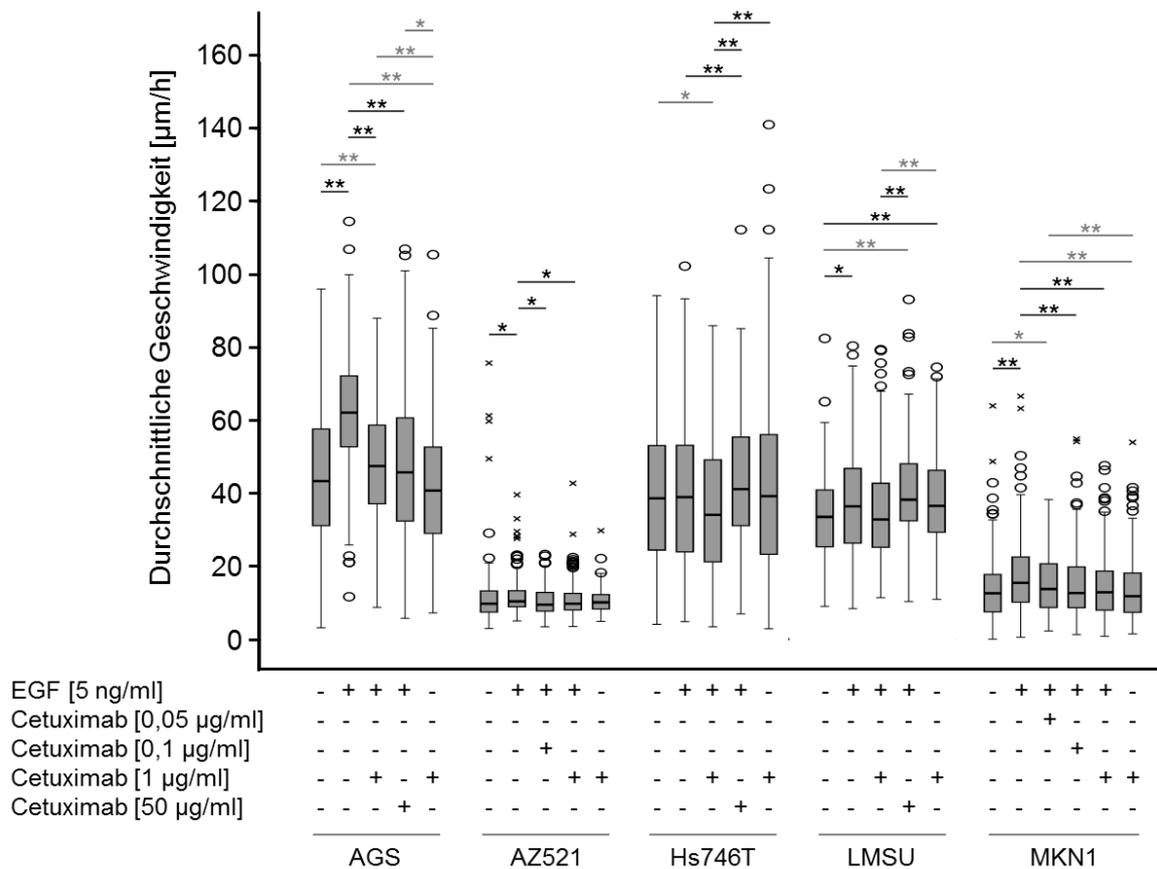


Abbildung 20: Durchschnittliche Geschwindigkeit von Magenkarzinom-Zelllinien nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung. Die Geschwindigkeit wurde in Zeitraffer-Mikroskopie Filmen bestimmt. Jede Zelle wurde als Einzelereignis gewertet. P-Werte mit Signifikanzlevel von $\leq 0,050$ und $\leq 0,010$ sind mit (*) und (**) angegeben. Dabei zeigen schwarze Balken und * relevante Vergleiche, graue hingegen sind nur aus Gründen der Vollständigkeit gezeigt. Ausreißer werden durch \circ und Extremwerte durch \times angezeigt. Nähere Angaben über die Zellzahl, Median, 25 % und 75 % Perzentilen, Minimum, Maximum sind Tabelle 9, sowie p-Werte der Tabelle S13 (Anhang) zu entnehmen.

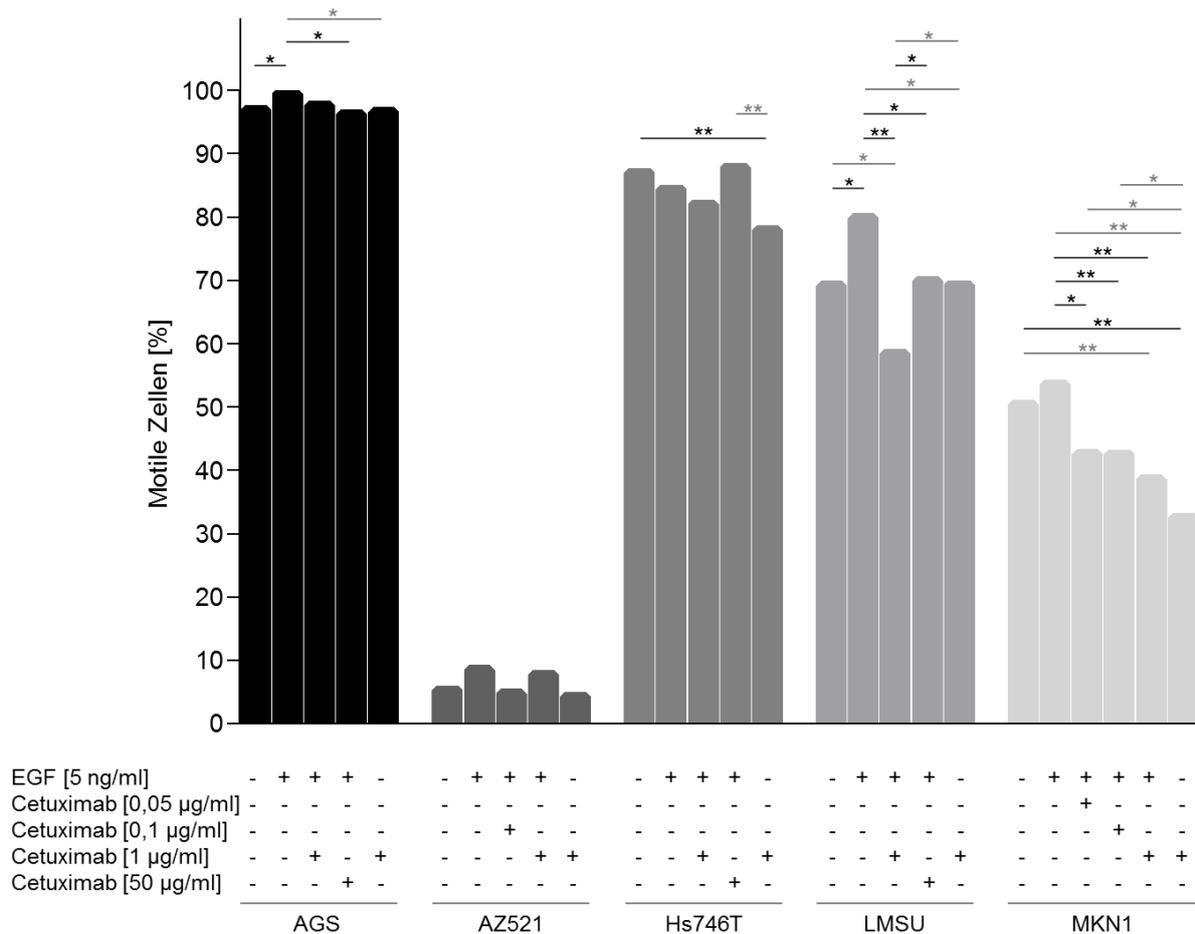


Abbildung 21: Motilität der Magenkarzinom-Zelllinien nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung. Die Motilität wurde in Zeitraffer-Mikroskopie Filmen bestimmt. Jede Zelle wurde als Einzelereignis gewertet. P-Werte mit Signifikanzlevel von $\leq 0,050$ und $\leq 0,010$ sind mit (*) und (**) angegeben. Dabei zeigen schwarze Balken und * relevante Vergleiche, graue hingegen sind nur aus Gründen der Vollständigkeit gezeigt. Nähere Angaben über p-Werte sind Tabelle S14 (Anhang) zu entnehmen.

Tabelle 9: Auflistung der Parameter Motilität und durchschnittliche Geschwindigkeit von AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 Zellen nach Behandlung mit EGF und/oder Cetuximab. Neben der Anzahl ausgewerteter Zellen wurde der Motilitätsstatus [%] und verschiedene Maße der Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$] (MW, Median, Minimum, Maximum, 25 % und 75 % Perzentilen, sowie p-Werte (siehe Anhang Tabellen S13 und S14)) bestimmt.

AGS	Unbehandelt	EGF +		EGF + Cetuximab [50 µg/ml]	Cetuximab [1 µg/ml]
		EGF [5 ng/ml]	Cetuximab [1 µg/ml]		
N	227	229	260	189	239
Motilität [%]	96,92	99,56	97,69	96,30	96,65
Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]					
MW	44,28	62,16	48,46	46,40	42,34
Median	43,28	62,12	47,48	45,77	40,77
Minimum	3,11	11,65	8,72	5,71	7,16
Maximum	96,03	114,63	88,03	107,00	105,51
Perzentile 25	31,09	52,47	37,13	32,14	28,93
Perzentile 75	58,04	72,36	58,73	60,84	52,72

AZ521	Unbehandelt	EGF [5 ng/ml]	EGF + Cetuximab [0,1 µg/ml]	EGF + Cetuximab [1 µg/ml]	Cetuximab [1 µg/ml]
N	207	175	146	156	162
Motilität [%]	5,31	8,57	4,79	7,69	4,32
Geschwindigkeit [µm/h]					
MW	11,48	11,94	10,60	11,09	10,47
Median	9,72	10,35	9,47	9,72	10,09
Minimum	2,90	4,96	3,38	3,46	4,89
Maximum	75,74	39,61	23,25	42,76	29,76
Perzentile 25	7,38	8,80	7,63	8,03	8,29
Perzentile 75	13,25	13,32	12,81	12,56	12,25

Hs746T	Unbehandelt	EGF [5 ng/ml]	EGF + Cetuximab [1 µg/ml]	EGF + Cetuximab [50 µg/ml]	Cetuximab [1 µg/ml]
N	254	224	262	215	290
Motilität [%]	87,01	84,38	82,06	87,91	77,93
Geschwindigkeit [µm/h]					
MW	39,42	39,20	36,10	42,69	43,01
Median	38,65	38,98	34,09	41,15	39,22
Minimum	4,08	4,81	3,38	6,91	2,89
Maximum	94,22	102,36	85,96	112,35	141,18
Perzentile 25	24,38	23,81	21,17	30,950	23,23
Perzentile 75	53,27	53,22	49,22	55,48	56,30

LMSU	Unbehandelt	EGF [5 ng/ml]	EGF + Cetuximab [1 µg/ml]	EGF + Cetuximab [50 µg/ml]	Cetuximab [1 µg/ml]
N	146	179	166	163	189
Motilität [%]	69,18	79,89	58,43	69,94	69,31
Geschwindigkeit [µm/h]					
MW	33,91	37,74	35,18	40,11	38,07
Median	33,54	36,44	32,82	38,27	36,58
Minimum	8,99	8,42	11,36	10,30	10,93
Maximum	82,52	80,46	79,46	93,21	74,62
Perzentile 25	25,28	26,22	25,17	32,39	29,33
Perzentile 75	40,98	47,12	42,86	49,17	46,39

MKN1	Unbehandelt	EGF [5 ng/ml]	EGF + Cetuximab [0,05 µg/ml]	EGF + Cetuximab [0,1 µg/ml]	EGF + Cetuximab [1 µg/ml]	Cetuximab [1 µg/ml]
N	222	291	211	254	241	200
Motilität [%]	50,45	53,61	42,65	42,52	38,59	32,50
Geschwindigkeit [µm/h]						
MW	13,98	17,12	15,30	15,06	14,50	13,65
Median	12,60	15,45	13,75	12,63	12,87	11,78
Minimum	0,00	0,55	2,26	1,26	0,81	1,44
Maximum	64,02	66,63	38,30	54,91	47,61	54,00
Perzentile 25	4,50	10,14	8,61	8,60	7,87	7,33
Perzentile 75	17,86	22,68	20,70	19,83	18,96	18,18

3.3.2.1 Der Einfluss von FKS auf das Bewegungsverhalten von MKN1 Zellen

Um den Einfluss von FKS auf das Bewegungsverhalten der Zellen zu testen, wurden MKN1 Zellen serumdepriviert, anschließend mit EGF und/oder Cetuximab behandelt und ihre Bewegungen aufgezeichnet. Für eine EGF-Behandlung wurden 30 ng/ml EGF verwendet, Cetuximab wurde in den Konzentrationen 0,1 und 1 µg/ml hinzugefügt.

Wie in Abbildung 22 gezeigt, war der durch EGF-induzierte Unterschied sowohl der Motilität als auch der Durchschnittsgeschwindigkeit in serumdeprivierten Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei Zellen, die nicht gehungert waren. In Tabelle 10 sind Angaben zur Zellzahl, Motilität [%] sowie durchschnittlichen Geschwindigkeit [µm/h] aufgelistet. Entsprechende p-Werte sind Tabellen S15 und S16 (Anhang) zu entnehmen.

Tabelle 10: Angaben zu den Parametern Motilität und Geschwindigkeit von gehungerten MKN1 Zellen nach Behandlung mit EGF und/oder Cetuximab. Neben der Anzahl ausgewerteter Zellen wurde der Motilitätsstatus [%], sowie einige Parameter der Geschwindigkeit [µm/h] (MW, Median, Minimum, Maximum, 25 % und 75 % Perzentilen, sowie p-Werte (siehe Anhang Tabellen S15 und S16)) bestimmt.

Gehungerte MKN1	Unbehandelt	EGF [5 ng/ml]	EGF + Cetuximab [0,1 µg/ml]	EGF + Cetuximab [1 µg/ml]
N	107	102	141	121
Motilität [%]	18,70	55,89	14,18	35,54
Geschwindigkeit [µm/h]				
MW	10,57	20,06	9,51	15,67
Median	9,60	16,29	7,54	14,28
Minimum	1,56	4,84	0,54	2,20
Maximum	40,66	73,79	35,87	44,62
Perzentile 25	4,87	10,69	4,98	8,77
Perzentile 75	14,26	25,61	12,18	21,75

Nicht- gehungerte MKN1	Unbehandelt	EGF [5 ng/ml]	EGF + Cetuximab [0,1 µg/ml]	EGF + Cetuximab [1 µg/ml]
N	222	291	254	241
Motilität [%]	50,45	53,61	42,52	38,59
Geschwindigkeit [µm/h]				
MW	13,98	17,12	15,06	14,50
Median	12,60	15,45	12,63	12,87
Minimum	0,00	0,55	1,26	0,81
Maximum	64,02	66,63	54,91	47,61
Perzentile 25	4,50	10,14	8,60	7,87
Perzentile 75	17,86	22,68	19,83	18,96

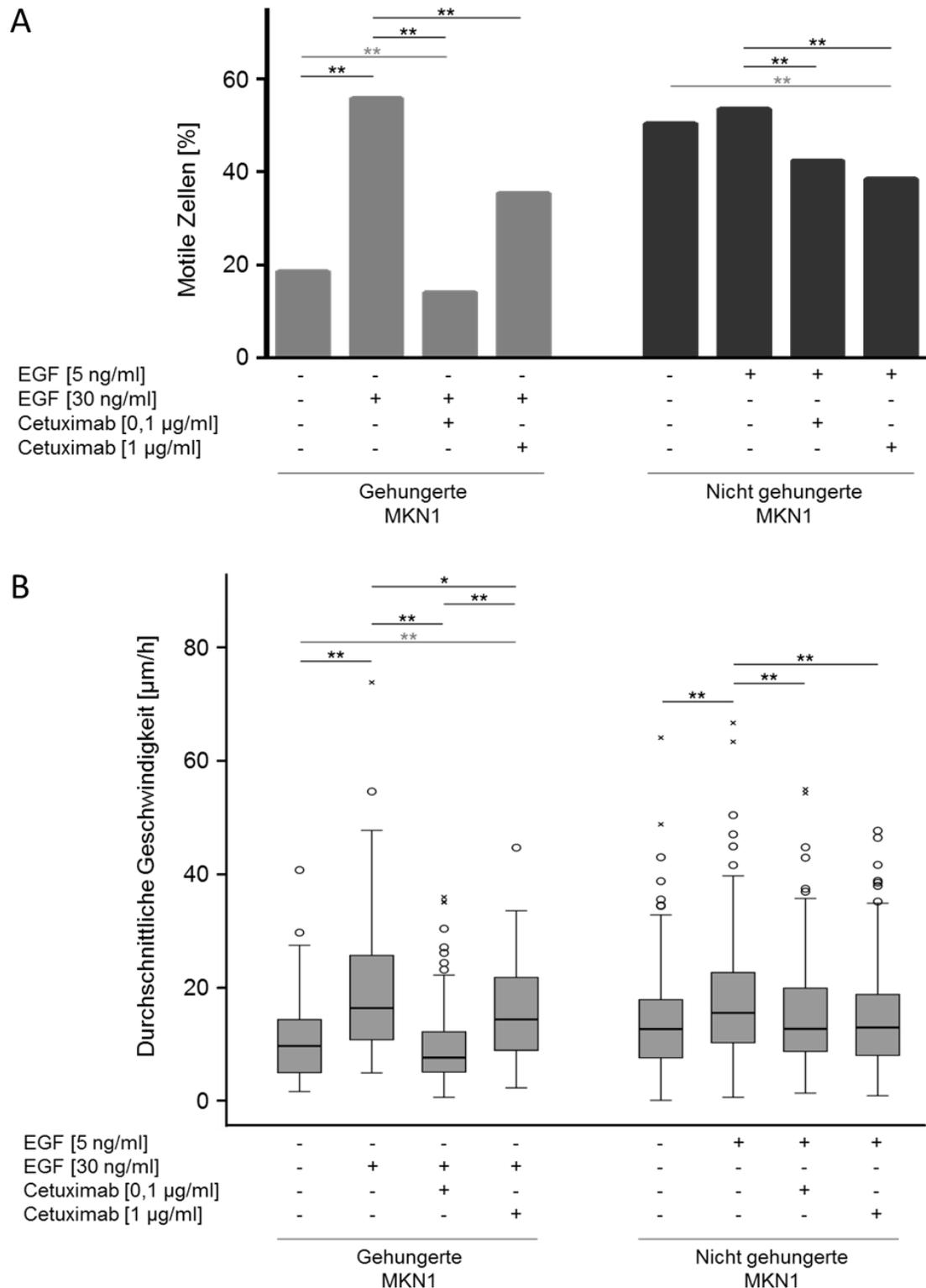


Abbildung 22: Motilität und durchschnittliche Geschwindigkeit der Magenkarzinom-Zelllinie MKN1 in FKS-freiem Medium (linke Seite) und FKS-haltigem Medium (rechte Seite) nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung. Die Motilität und Geschwindigkeit wurde in Zeitraffer-Mikroskopie Filmen bestimmt. Jede Zelle wurde als Einzelereignis gewertet. P-Werte mit Signifikanzlevel von $\leq 0,050$ und $\leq 0,010$ sind mit (*) und (**) angegeben. Dabei zeigen schwarze Balken und * relevante Vergleiche, graue hingegen sind nur aus Gründen der Vollständigkeit gezeigt. Ausreißer werden durch \circ und Extremwerte durch \times angezeigt. Nähere Angaben über die Zellzahl, Median, 25 % und 75 % Perzentilen, Minimum, Maximum sind Tabelle 10, sowie p-Werte den Anhangstabellen S15 (A) und S16 (B) zu entnehmen.

3.4 Analyse potentieller Biomarker für die Cetuximab-Sensitivität

3.4.1 Genexpressionsanalyse

Für die Genexpressionsanalysen wurden AGS, Hs746T, LMSU und MKN1 Zellen auf beschichteten Zellkulturschalen (AGS, Hs746T, MKN1 Zellen: 100 µg/ml Kollagen I; LMSU Zellen: 10 µg/ml Fibronectin) ausgelegt, nach 2 h für 1, 3 und 5 min sowie 4 h mit EGF und/oder Cetuximab bzw. entsprechenden Kontrollen (unbehandelt, EGF (5 ng/ml), EGF (5 ng/ml) + Cetuximab (1 µg/ml), Cetuximab (1 µg/ml)) in FKS-haltigem Medium behandelt und anschließend wurden Gesamt-RNA und miRNA isoliert. Die Proben wurden unserem Projektpartner GenXPro GmbH für Genexpressionsanalysen mittels SuperSAGE Analyse zur Verfügung gestellt.

Aus Kostengründen konnte nur für vier von fünf Zelllinien ein Genexpressionsprofil erstellt werden. Da AZ521 Zellen eine sehr geringe Motilität und Geschwindigkeit aufweisen, wurde diese Zelllinie von der Genexpressionsanalyse ausgeschlossen.

Das Ziel von Genexpressionsanalysen ist es, Informationen zu erhalten, welche Gene einer Probe exprimiert sind und deren Anzahl von Transkripten zu quantifizieren. Bei der SuperSAGE Analyse wird dazu mRNA in cDNA transkribiert und diese mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Aus diesen cDNA Fragmenten werden alle Fragmente mit polyA proximalen Enden gesammelt und an ein *Linker*-Fragment gebunden. Dieses *Linker*-Fragment besitzt eine spezifische Basensequenz, die als Erkennungsstelle für eine Restriktionsendonuklease (EcoP15I) dient. Durch diesen Schritt erhält man 26 bp große Fragmente von jeweils einer definierten Position der cDNA, die *Tags*. Nachdem die *Linker* abgetrennt wurden, werden die *Tags* verbunden, in einen Plasmid-Vektor kloniert und sequenziert. Die Anzahl der *Tags* in der Gesamtprobe spiegelt die Menge des Transkripts wider, da jeder *Tag* eindeutig einem Transkript zuzuordnen ist. Die 26 bp Sequenz dient als Vorlage bei der Suche nach den sequenzierten *Tags* in Datenbanken (Ablauf siehe auch Abbildung 23) [205, 206].

Um die Ergebnisse unterschiedlich behandelter Proben zu vergleichen, wurden Genexpressionsprofile erstellt, um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, deren Genotyp mit den Ergebnissen der phänotypischen Untersuchungen korreliert werden konnten. Zur Bestätigung der Genexpressionsanalyse durch die SuperSAGE Methode wurden für viele interessante Gene quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) durch die GenXPro GmbH durchgeführt. Nach bioinformatischer und statistischer Auswertung durch die Projektpartner GenXPro GmbH, Biomax Informatics AG und Viscovery Software GmbH wurden differenziell exprimierte Gene als potentielle Zielgene für RNAi Analysen anhand der folgenden sechs Bedingungen ausgewählt: 1) es liegen EGF-abhängige Änderungen der RNA-Expression in *Responder*-Zellen vor, 2) EGF-abhängige Änderungen der RNA-Expression werden durch Cetuximab in *Respondern* inhibiert, 3) EGF führt zu keinen Änderungen der RNA-Expression in *Nonresponder*-Zellen, 4) eine kombinierte EGF- und Cetuximab-Behandlung führt zu keinen Änderungen in der RNA Expression in *Nonrespondern*-Zellen, 5) es gibt

eine unterschiedliche konstitutive RNA-Expression zwischen *Responder*- und *Nonresponder*-Zellen, 6) die RNA-Expression unbehandelter *Nonresponder*-Zellen ist ähnlich der mit EGF-behandelten *Responder*-Zellen.

Diese Kriterien, angewandt an MKN1 und Hs746T Zellen, führten zu einer Liste mit mehr als 100 potentiellen Zielgenen, die in kommenden Projekten mittels RNAi auf mögliche Biomarker-Qualitäten analysiert werden sollen. Eines dieser Gene, PTK2B, wurde in dieser Arbeit in MKN1 und Hs746T Zellen auf Proteinebene inhibiert und es wurden Motilitätsanalysen durchgeführt.

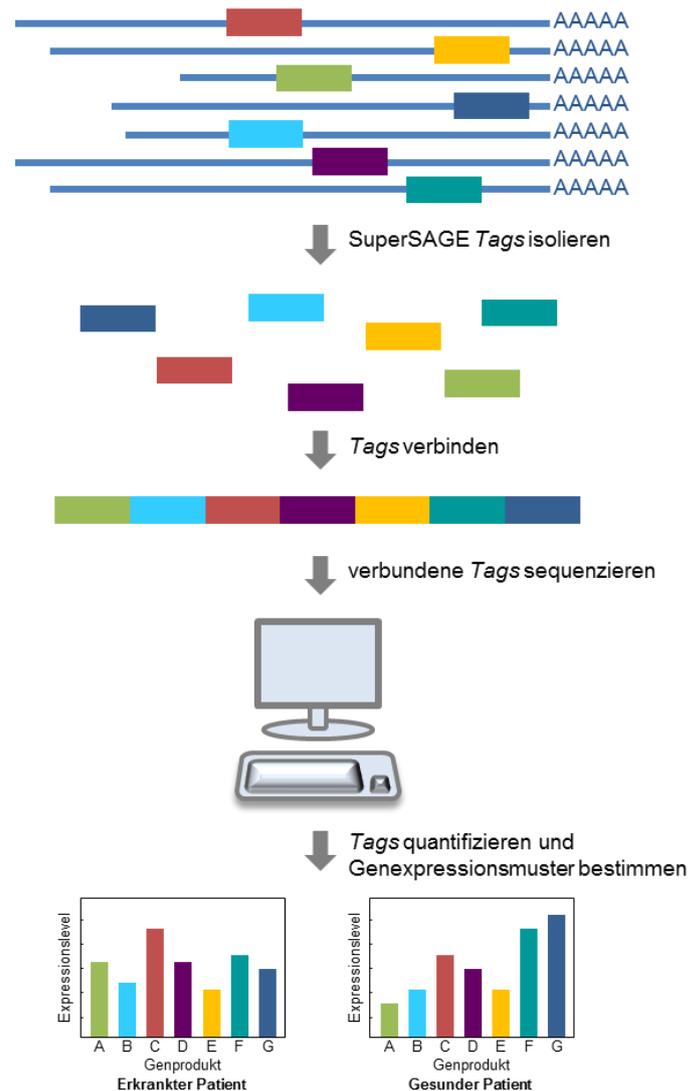


Abbildung 23: Einfaches Schema einer SuperSAGE Analyse. Aus zuvor geschnittenen cDNA Fragmenten werden alle Fragmente mit polyA proximalen Enden gesammelt und an ein Linker-Fragment gebunden. Dieses Linker-Fragment besitzt eine spezifische Basensequenz, die eine Erkennungsstelle für eine Restriktionsendonuklease (EcoP15I) enthält. Durch diesen Schritt erhält man bei der SuperSAGE Analyse 26 bp große Fragmente von jeweils einer definierten Position der cDNA, die Tags. Nachdem die *Linker* abgetrennt wurden, werden die Tags verbunden, in einen Plasmid Vektor kloniert und sequenziert. Die Anzahl der Tags in der Gesamtprobe spiegelt die Menge des Transkripts wieder.

(Modifiziert nach <http://www.sagenet.org/findings/index.html>)

3.4.1.1 PTK2B Inhibition in MKN1 und Hs746T

Um erste Hinweise zu erhalten, ob sich die Proteintyrosinkinase 2 B (PTK2B; auch Pyk2 genannt) als möglicher Biomarker für eine Therapie mit Cetuximab eignet, sollte PTK2B in MKN1 und Hs746T Zellen auf Proteinebene durch einen Inhibitor von Mitgliedern der FAK-Familie (PF431396) blockiert werden. Nach Inhibition wurden Motilitätsaufnahmen über 7 h durchgeführt. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurden die Zellen dabei unterschiedlich behandelt: Cetuximab (1 µg/ml), 100 nM PF431396, 100 nM PF431396 + Cetuximab (1 µg/ml), 500 nM PF431396, 500 nM PF431396 + Cetuximab (1 µg/ml). Pro Behandlung wurden mind. drei Filme ausgewertet, wodurch mindestens 91 Zellen in die Auswertung miteinfließen. Neben den Motilitätsanalysen wurden Western Blot Analysen durchgeführt, um mögliche Veränderungen in der PTK2B-Expression und -Aktivierung zu detektieren. Da der eingesetzte Inhibitor nicht PTK2B-spezifisch ist, wurde zusätzlich die Expression und Aktivierung eines weiteren Proteins, der *Focal Adhesion Kinase* (FAK; auch Proteintyrosinkinase (PTK) 2 genannt), das wie PTK2B in der Regulation des Zytoskeletts und somit der Beweglichkeit von Zellen eine wichtige Rolle spielt, analysiert.

Die Motilität von MKN1 Zellen (Abbildung 24A; Signifikanzwerte in Tabelle S17; Anhang) nahm sowohl mit Cetuximab (um ca. 10 %) als auch mit dem Inhibitor PF431396 (um ca. 32 % bzw. 34 %) ab. Eine Kombination von Cetuximab und PF431396 führte zur Reduktion der Motilität von MKN1 Zellen um ca. 46 % bzw. 50 %. Die Geschwindigkeit (Abbildung 24B; Signifikanzwerte Tabelle S18; Anhang) von MKN1 Zellen wurde durch Cetuximab um etwa 7 % reduziert, durch Zugabe von PF431396 (alleine oder kombiniert mit Cetuximab) sank die Geschwindigkeit der Zellen um 30 - 40 %. Bei der Messung der Geschwindigkeit konnten keine additiven Auswirkungen von Cetuximab und PF431396 detektiert werden. In Hs746T Zellen änderte sich die Motilitätsrate nach einer Behandlung mit Cetuximab um nur 2 %. Auch durch den Inhibitor und Kombinationen des Inhibitors mit Cetuximab änderte sich die Motilität der Zellen nur sehr gering (zwischen 1,5 % und 13 %). Bei der Messung der Geschwindigkeit wurde ein Abfall nach Cetuximab-Behandlung von 11 % gemessen. Eine Monobehandlung mit PF431396 führte zu einer Geschwindigkeitsreduktion von 18 % bzw. 12 %, eine kombinierte Behandlung mit dem Inhibitor und Cetuximab ließ die Zellen um 19 % und 25 % langsamer migrieren.

Bei der Untersuchung der Expression und Aktivierung von PTK2B und FAK nach Behandlung mit PF431396 und/oder Cetuximab in MKN1 Zellen wurden keine starken Unterschiede nach zwei gemessenen Stimulationszeiten (4 und 7 h) gemessen (Abbildung 25 und Abbildung 26). Sowohl die Expression als auch die Aktivierung von PTK2B zeigten nach 4 h Behandlung keine signifikanten Änderungen. Nach 7 h kam es zu einem Anstieg sowohl der Expression als auch der Aktivierung von PTK2B. Die FAK-Expression wurde nach siebenstündiger Behandlung mit PF431396 und der Kombinationsbehandlung des Inhibitors mit Cetuximab reduziert. Die FAK-Aktivierung stieg nach siebenstündiger Behandlung mit Cetuximab und/oder PF431396 im Vergleich zur vierstündigen Behandlung an. Die Signifikanzwerte sind im Anhang in Tabelle S19 gelistet.

Tabelle 11: Angaben zu den Parametern Motilität und Geschwindigkeit von Hs746T und MKN1 Zellen nach Behandlung mit PF431396 und/oder Cetuximab. Neben der Anzahl ausgewerteter Zellen (N) wurden Motilität [%], sowie folgende Parameter der Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$], bestimmt: MW, Minimum, Maximum, Median, 25 % und 75 % Perzentilen, sowie p-Werte (siehe Anhang Tabellen S17 und S18).

Hs746T	Unbehandelt	Cetuximab [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$]	PF431396 [100 nM]	Cetuximab +		Cetuximab + PF431396 [500 nM]
				PF431396 [100 nM]	PF431396 [500 nM]	
N	215	145	137	94	123	125
Motilität [%]	71,16	69,66	70,07	61,70	68,30	65,60
Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]						
MW	38,04	33,95	31,05	30,83	33,52	28,33
Median	36,79	32,62	32,15	30,40	32,67	27,81
Minimum	4,92	2,80	0,00	3,45	5,12	1,20
Maximum	102,79	100,46	73,24	69,57	83,68	82,89
Perzentile 25	19,85	17,94	19,74	15,97	21,56	19,91
Perzentile 75	53,14	43,75	41,34	42,71	44,41	34,49

MKN1	Unbehandelt	Cetuximab [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$]	PF431396 [100 nM]	Cetuximab +		Cetuximab + PF431396 [500 nM]
				PF431396 [100 nM]	PF431396 [500 nM]	
N	105	109	174	97	156	91
Motilität [%]	43,81	39,45	29,89	23,71	28,85	21,98
Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]						
MW	15,93	14,75	9,65	10,41	11,03	9,75
Median	13,46	12,48	8,25	7,87	9,97	7,32
Minimum	2,15	1,93	1,18	1,77	0,72	1,99
Maximum	58,12	62,22	27,51	40,16	44,68	33,13
Perzentile 25	6,93	7,70	5,33	4,89	5,79	4,68
Perzentile 75	21,98	18,45	13,21	12,90	14,43	13,44

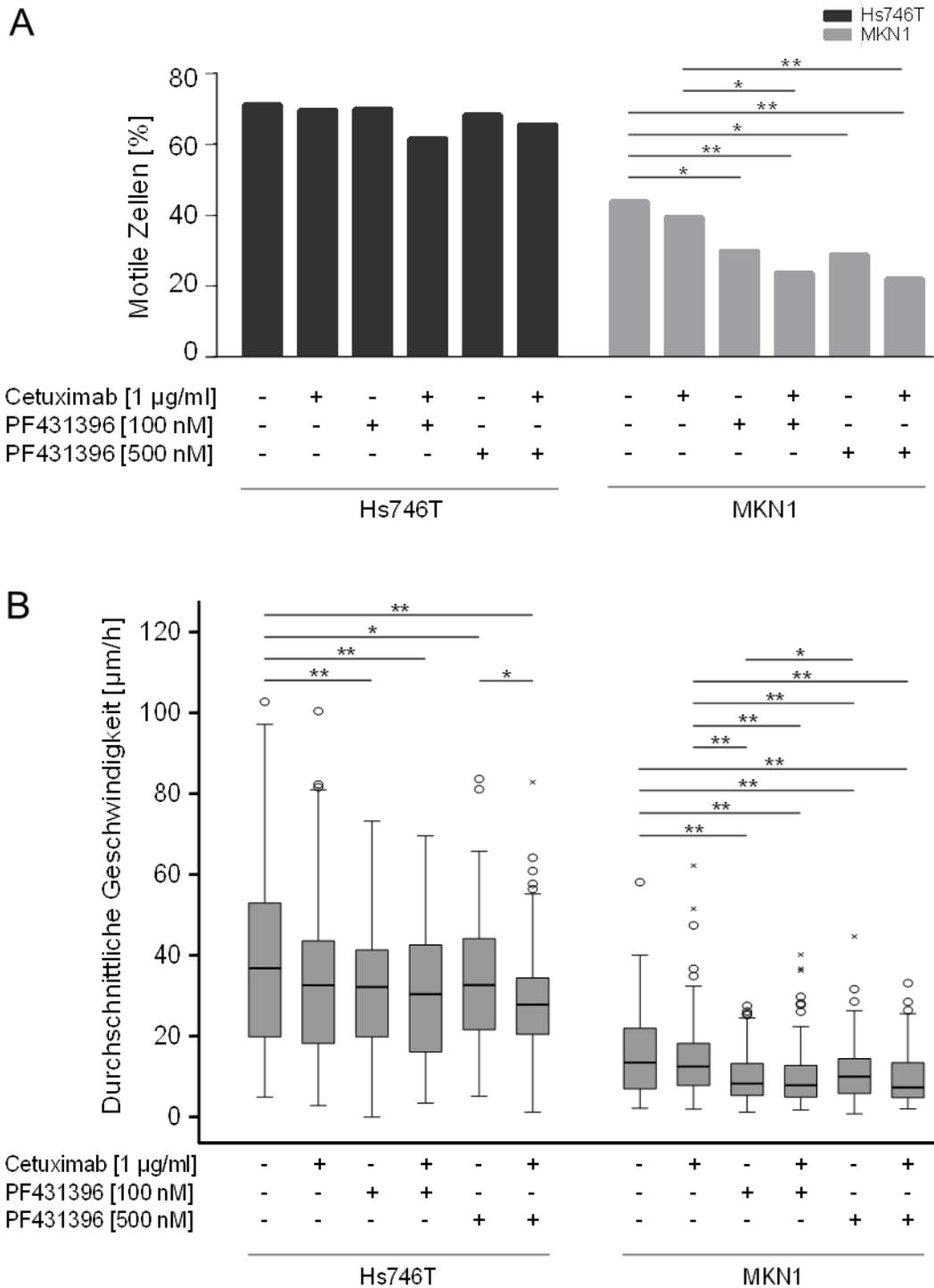


Abbildung 24: Motilität und durchschnittliche Geschwindigkeit der Magenkarzinom-Zelllinien Hs746T und MKN1 nach PF431396- und/oder Cetuximab-Behandlung. Die Geschwindigkeit wurde in Zeitraffer-Mikroskopie Filmen bestimmt. Jede Zelle wurde als Einzelereignis gewertet. P-Werte mit Signifikanzlevel von $\leq 0,050$ und $\leq 0,010$ sind mit (*) und (**) angegeben. Dabei zeigen schwarze Balken und * relevante Vergleiche, graue hingegen sind nur aus Gründen der Vollständigkeit gezeigt. Ausreißer werden durch \circ und Extremwerte durch \times angezeigt. Signifikanzwerte sind im Anhang in den Tabellen S17 (A) und S18 (B) verzeichnet.

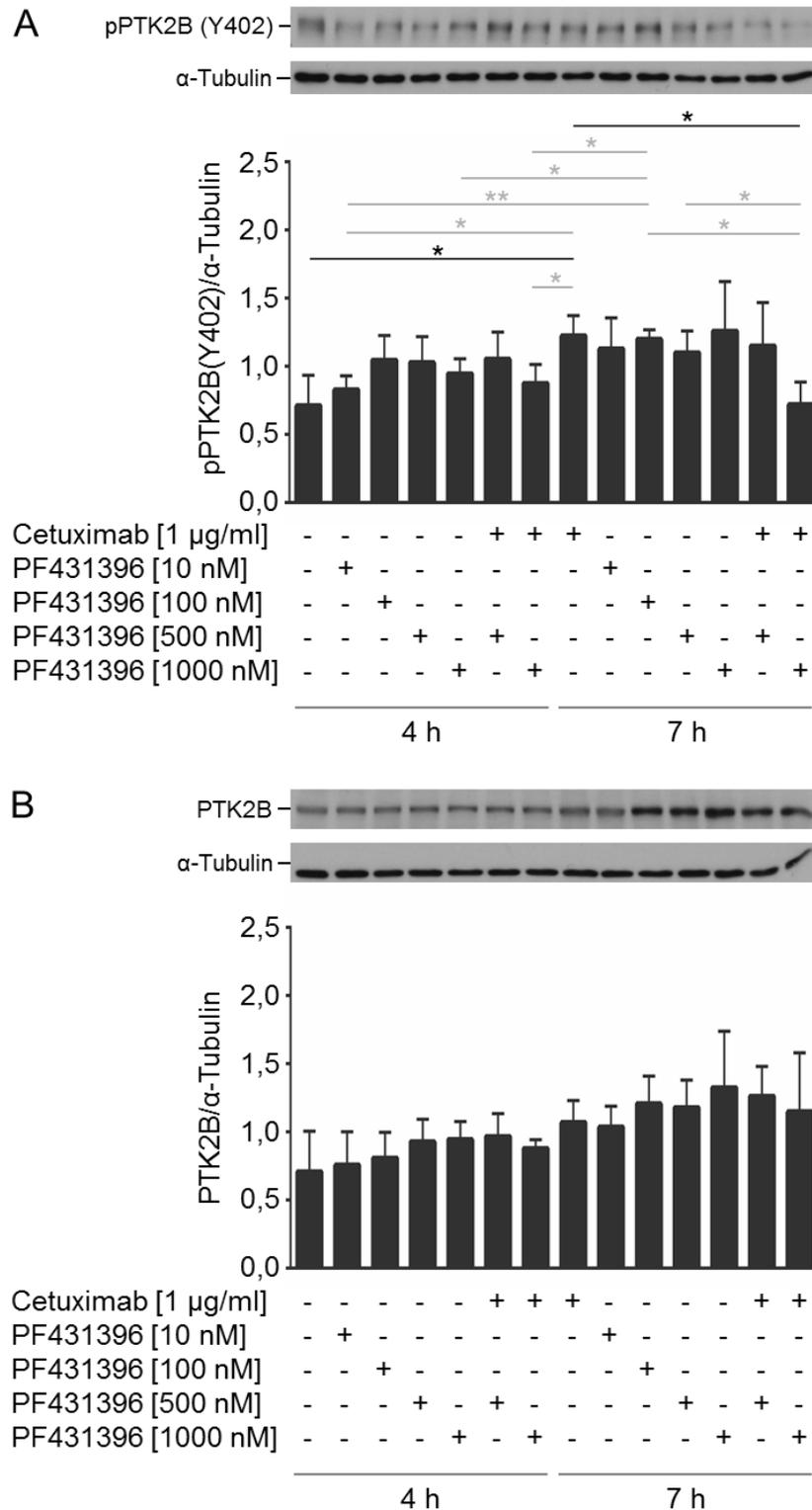


Abbildung 26: Auswirkungen von PF431396 und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die (A) PTK2B-Aktivierung und (B) PTK2B-Expression in MKN1 Zellen. Die Zellen wurden in FKS-haltigem Medium kultiviert. Die Expression und Aktivierung wurden in Gesamtproteinlysaten von PF431396 und/oder Cetuximab behandelten Zellen mittels Western Blot Analysen bestimmt. Es wurde ein phosphospezifischer Antikörper gegen (A) pPTK2B (Y402) verwendet. Die relativen Intensitäten wurden über die Expression von α -Tubulin normalisiert. Es sind MW und SD von je drei unabhängigen Experimenten abgebildet. P-Werte mit Signifikanzlevel von $\leq 0,050$ und $\leq 0,010$ sind mit (*) und (**) angegeben. Dabei zeigen schwarze Balken und * relevante Vergleiche, graue hingegen sind nur aus Gründen der Vollständigkeit gezeigt. Signifikanzwerte sind in Tabelle S19 (Anhang) gelistet.

3.4.2 Einfluss von E-Cadherin auf den EGFR in Magenkarzinom-Zellen

Der Übergang von gutartigen Tumoren zu invasiven und metastasierenden Karzinomen ist u.a. durch den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion charakterisiert [136]. In Magenkarzinomen kommen häufig Mutationen des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin vor, die zu verminderter Expression oder zum Verlust des funktionellen Zelladhäsionsmoleküls führen [176, 207]. E-Cadherin interagiert mit dem EGFR in einem Mehrkomponenten-Komplex, wobei es die Aktivierung des EGFR negativ beeinflusst [159]. Somatische Mutationen von E-Cadherin sind hingegen mit einer verstärkten EGFR-Aktivität assoziiert [208]. Die Interaktionen zwischen dem EGFR und E-Cadherin sind somit möglicherweise für die Tumorprogression und das Ansprechen auf molekulare Therapien wichtig.

In diesem Projekt wurde E-Cadherin als möglicher Biomarker für eine Cetuximab-Therapie in Magenkarzinom-Zellen untersucht. Hierfür wurden der Zusammenhang zwischen E-Cadherin und dem EGFR und dessen Signalweg, sowie der modulierende Effekt von E-Cadherin auf den EGFR analysiert. Drei Magenkarzinom-Zelllinien, die alle E-Cadherin exprimieren, wurden analysiert; dabei wurde in einer Magenkarzinom-Zelllinie, die funktionelles E-Cadherin exprimiert (MKN28) dieses durch RNAi stillgelegt und in zwei weiteren Magenkarzinom-Zelllinien mit mutiertem funktionslosem E-Cadherin (MKN45 und KATOIII) intaktes E-Cadherin eingeschleust. Die sich durch diese Manipulationen ergebenden Änderungen wurden hinsichtlich proteomischer Veränderungen im EGFR-Signalweg charakterisiert.

3.4.2.1 Hemmung oder Überexpression von E-Cadherin in Magenkarzinom-Zelllinien

Um die Funktion von E-Cadherin bei der Tumorgenese sowie der Invasion und Metastasierung besser zu verstehen, wurden die Eigenschaften von drei E-Cadherin exprimierenden Magenkarzinom-Zelllinien in proteomischen Untersuchungen analysiert.

Es wurde im ersten Schritt die Hemmung der Expression von funktionellem E-Cadherin durch siRNA-*Silencing* in MKN28 Zellen und die Expression von funktionellem E-Cadherin in MKN45 und KATOIII Zellen etabliert, was auch als molekularbiologische Wirkungskontrolle für weitere Versuche diente.

Die Zelllinie MKN28 exprimiert, wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben, WT E-Cadherin, wohingegen MKN45 Zellen eine 18 Basenpaar-lange Deletion in der Exon 6-Intron 6 Bindung innerhalb des E-Cadherin-Gens und KATOIII Zellen eine G zu A Substitution der letzten 3' Nukleotide auf Exon 7 von *CDH1* aufweist [187, 196].

RNA-Interferenz und deren Effizienz

Um Einflüsse von E-Cadherin auf den EGFR-Signalweg besser verstehen zu können, wurde E-Cadherin in der Zelllinie MKN28 durch RNAi herunterreguliert. Die Effizienz der transienten Transfektion wurde nach 24, 48, 72, 96 und 120 h siRNA Behandlung untersucht. Für die Detektion der E-Cadherin-Expression wurden zwei voneinander unabhängige Western Blot Analysen durchgeführt.

Durch den posttranslationalen *Knock-Down* nahm die Expression von E-Cadherin auch nach der längsten Inkubationsdauer ab. In Abbildung 27 ist zu sehen, dass nach 24 h eine Verringerung der Expressionsstärke um durchschnittlich 71 %, nach 48 h um 87 %, nach 72 h und 96 h um 92 % und nach 120 h um ca. 91 % detektiert wurde. Als Kontrolle zur möglichen Beeinflussung von E-Cadherin durch die Transfektion wurden transiente Transfektionen mit Negativkontroll-siRNA in MKN28 Zellen durchgeführt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für weitere Untersuchungen der Zelllinie MKN28 eine Transfektionsdauer von 96 h gewählt.

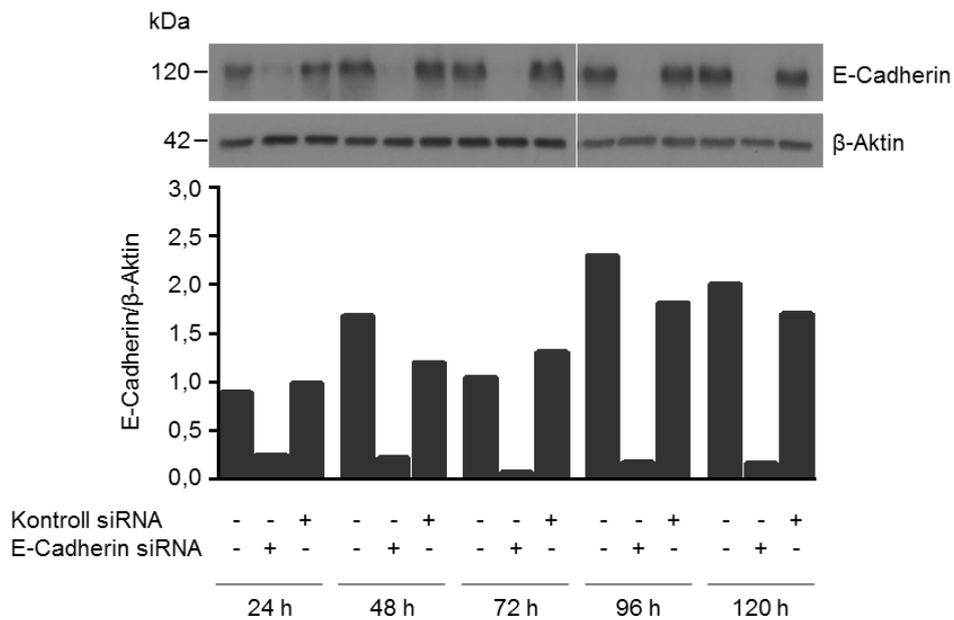


Abbildung 27: Effizienzbestimmung der Transfektion von gegen E-Cadherin gerichteter siRNA in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN28. Die Expressionsstärke von E-Cadherin wurde in Gesamtproteinlysaten von mit siRNA-behandelten MKN28 Zellen mittels Western Blot Analyse ermittelt. Die relative Intensität der E-Cadherin-Expression wurde durch densitometrische Analyse bestimmt und mit der Expression von β -Aktin normalisiert. Es ist der MW von zwei unabhängigen Versuchen gezeigt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

DNA-Transfektion und deren Effizienz

Wie oben beschrieben, weisen MKN45 und KATOIII Zellen Mutationen in *CDH1* auf. Um den Einfluss von funktionellem WT E-Cadherin in diesen Zelllinien zu untersuchen, wurde ein EGFP-gekoppeltes Plasmid mit WT E-Cadherin (*wt-EcadEGFP*) [180] transient transfiziert.

Die Effizienz der Transfektion wurde nach 6, 24, 30 und 48 h Behandlung mit dem *wt-EcadEGFP* Konstrukt untersucht. Dafür wurde die Expression von E-Cadherin in zwei voneinander unabhängig durchgeführten Western Blot Analysen bestimmt.

Sowohl bei MKN45 als auch bei KATOIII Zellen wurde nach sechsständiger Behandlung mit *wt-EcadEGFP* ein deutlicher Anstieg der Expression des an EGFP-gekoppelten E-Cadherins detektiert.

Nach 48 h stieg das Expressionslevel des EGFP-gekoppelten E-Cadherins (normalisiert auf α -Tubulin) um ca. 400 %, KATOIII Zellen wiesen einen Anstieg um 2100 % auf.

Die Expression des endogenen mutierten E-Cadherins war nach 24 h Behandlung bei MKN45 Zellen leicht, bei KATOIII Zellen jedoch nicht erhöht. Auffallend war, dass die Expression von α -Tubulin bei steigender Behandlungsdauer mit *wt-EcadEGFP* in KATOIII Zellen reduziert war. Zudem wurde bei MKN45 und KATOIII Zellen eine zusätzliche Proteinbande auf Höhe von 80 kDa (nicht gezeigt) detektiert. Um den Einfluss der Transfektion auf MKN45 und KATOIII Zellen zu untersuchen, wurden diese Zellen alleinig mit Transfektionsreagenz behandelt. Hierbei zeigte sich bei der Zelllinie MKN45 ab 30 h nach Beginn der Transfektion eine geringe Erhöhung des Expressionslevels des mutierten E-Cadherins, während bei KATOIII Zellen keine Änderung detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

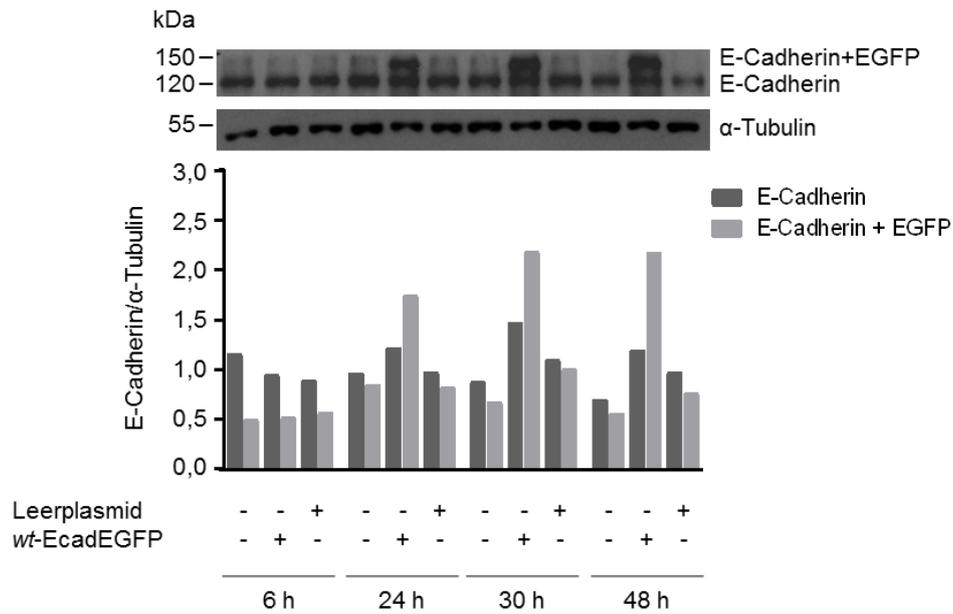


Abbildung 28: Effizienzbestimmung der Transfektion von WT E-Cadherin in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN45. Die Expressionsstärke von E-Cadherin wurde in Gesamtproteinlysaten von mit wt-EcadEGFP-behandelter MKN45 Zellen mittels Western Blot Analyse ermittelt. (A) Western Blot Analyse zur Bestimmung der Transfektionsstabilität. Je Behandlung ist ein repräsentatives Ergebnis aus insgesamt zwei voneinander unabhängigen Analysen dargestellt. (B) Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen. Die relative Intensität der E-Cadherin-Expression wurde durch densitometrische Analyse bestimmt und mit der Expression von α -Tubulin normalisiert. Es ist der MW von zwei unabhängigen Versuchen gezeigt.

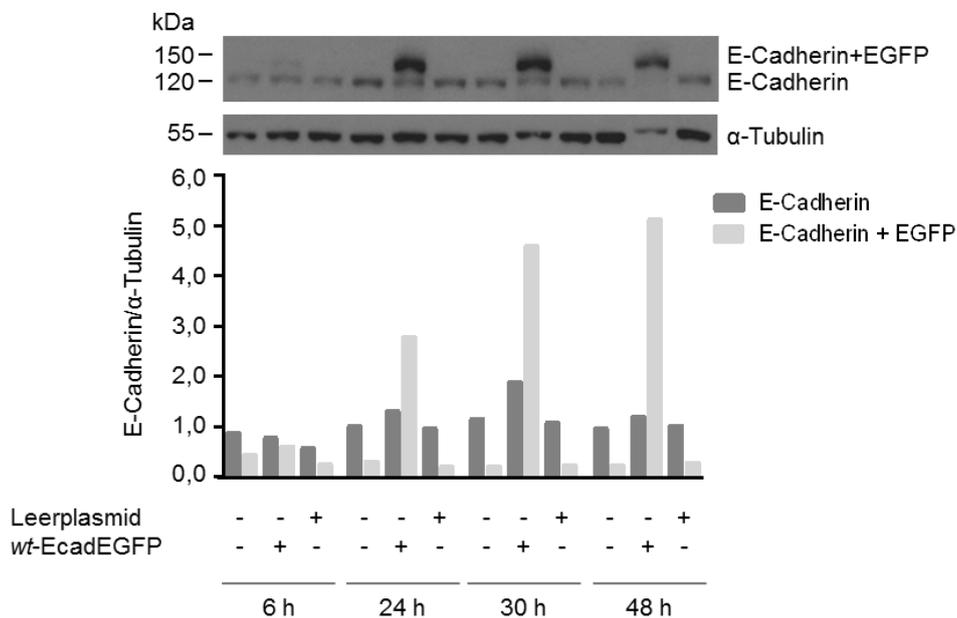


Abbildung 29: Effizienzbestimmung der Transfektion von WT E-Cadherin in der Magenkarzinom-Zelllinie KATOIII. Die Expressionsstärke von E-Cadherin wurde in Gesamtproteinlysaten von mit wt-EcadEGFP-behandelter KATOIII Zellen mittels Western Blot Analyse ermittelt. (A) Western Blot Analyse zur Bestimmung der Transfektionsstabilität. Je Behandlung ist ein repräsentatives Ergebnis aus insgesamt zwei voneinander unabhängigen Analysen dargestellt. (B) Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen. Die relative Intensität der E-Cadherin-Expression wurde durch densitometrische Analyse bestimmt und mit der Expression von α -Tubulin normalisiert. Es ist der MW von zwei unabhängigen Versuchen gezeigt.

3.4.2.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von E-Cadherin

Neben der Untersuchung intrazellulärer Veränderungen wurde auch die subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin bei unbehandelten Zellen und Zellen nach Transfektion durch Immunfluoreszenz analysiert. Beim WT aller drei untersuchten Zelllinien konnte die Membranständigkeit des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie MKN28 konnten starke Zell-Zell-Kontakte detektiert werden. Bei den Zelllinien MKN45 und KATOIII war E-Cadherin gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt [Abbildungen nicht gezeigt]. Nach einem transienten *Knock-Down* des funktionellen E-Cadherins der Zelllinie MKN28 zeigte sich eine deutliche Verminderung der E-Cadherin-Expression. Bei den Zelllinien MKN45 und KATOIII wurde nach Transfektion des *wt-EcadEGFP*-Konstrukts das auf dem Plasmid kodierte EGFP auf der Zelloberfläche detektiert [Abbildungen nicht gezeigt; siehe [209]]. Es wurde mikroskopisch eine 80 - 90 %ige *wt-EcadEGFP* Transfektionseffizienz in MKN45 und KATOIII Zellen detektiert.

3.4.2.3 Analyse proteomischer Veränderungen im EGFR-Signalweg

Einfluss von WT und mutiertem E-Cadherin

Molekularbiologische proteomische Untersuchungen wurden einerseits zur Charakterisierung der Zelllinien und andererseits zur Untersuchung des Einflusses von funktionellem bzw. funktionslosem E-Cadherin hinsichtlich der Expression und Aktivierung des EGFR und nachgeschalteter Signalwegsmoleküle durchgeführt.

Um den Einfluss von E-Cadherin auf proteomische Veränderungen im EGFR-Signalweg zu untersuchen, wurden zunächst die Expression von E-Cadherin sowie die Expression und Aktivierung des EGFR und der dem EGFR nachgeschalteten Signalmoleküle MAPK und AKT in Zellen mit funktionellem sowie eingeschränkt funktionellem E-Cadherin detektiert.

In MKN28 Zellen wurde E-Cadherin durch RNAi herunterreguliert. MKN45 und KATOIII Zellen mit mutiertem *CDH1* wurden durch transiente Transfektion von Plasmid-DNA (*wt-EcadEGFP*) funktionelles E-Cadherin eingeschleust. Die Kultivierung untransfizierter Zellen erfolgte parallel. Als Referenzprotein wurde β -Aktin nachgewiesen. Es wurden drei voneinander unabhängige Ansätze durchgeführt.

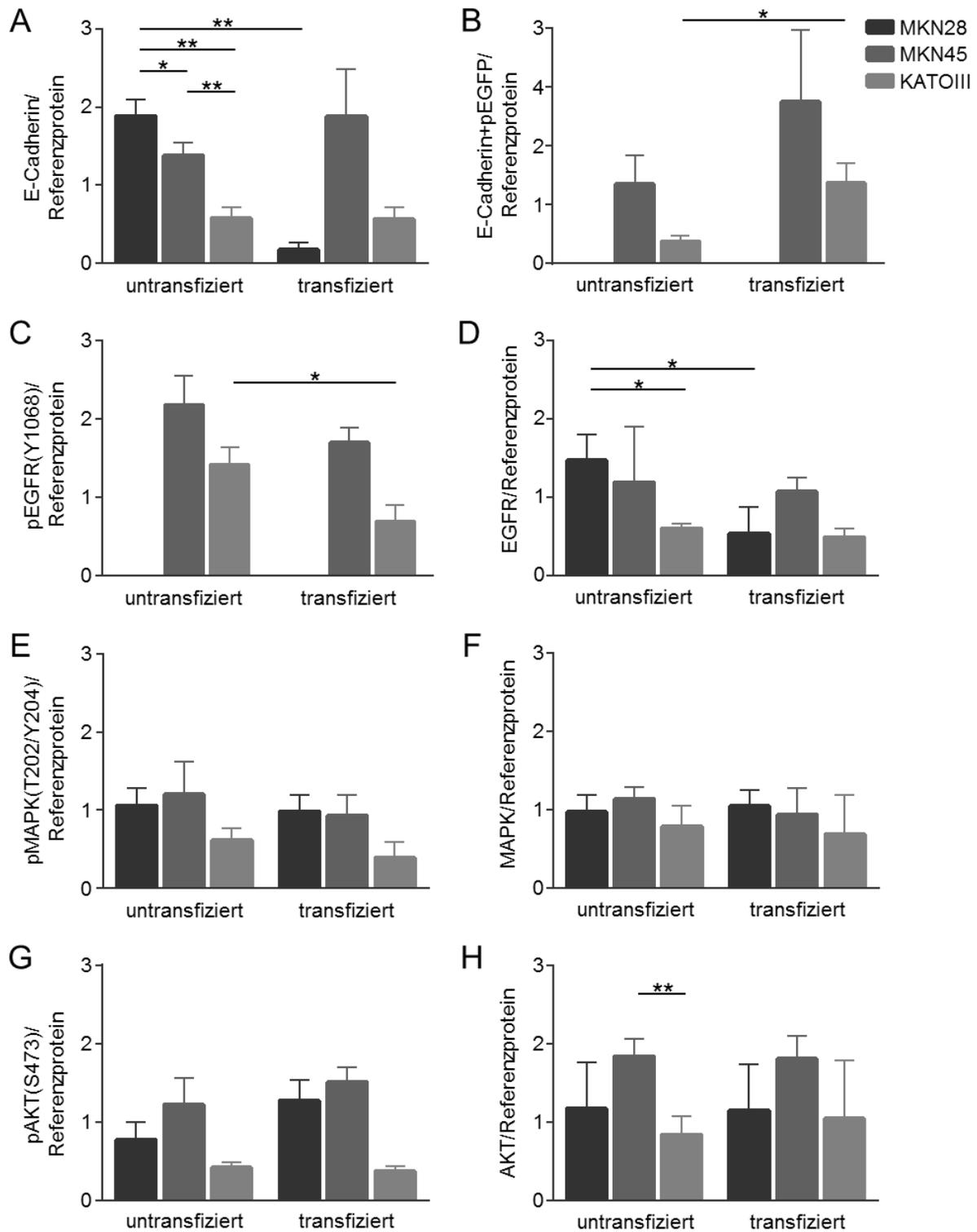


Abbildung 30: Einfluss von funktionellem E-Cadherin auf die Expression von (A) und (B) E-Cadherin, (D) EGFR, (F) MAPK und (H) AKT sowie die Aktivierung von (C) EGFR, (E) MAPK und (G) AKT in den Zelllinien MKN28, MKN45 und KATOIII. Die relative Intensität der Expression und Aktivierung wurde in Gesamtproteinlysaten von untransfizierten sowie transfizierten Zellen, normalisiert auf ein Referenzprotein, β -Aktin oder α -Tubulin, bestimmt. Zur Bestimmung der Aktivierung wurden phosphospezifische Antikörper verwendet (pEGFR(Y1068), pMAPK (T202/Y204) und pAKT(S473)). Es ist jeweils der MW mit SD aus drei unabhängigen biologischen Replikaten gezeigt. Signifikanzen sind eingezeichnet als (*) $p \leq 0,05$ und (**) $p \leq 0,01$. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels Welch t-Test sind im Anhang in Tabelle S20 gelistet.

Beim Vergleich untransfizierter Zellen jeder Magenkarzinom-Zelllinie wurden bereits große Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Proteine detektiert (siehe Abbildung 30). Die Zelllinie MKN28 exprimierte endogenes E-Cadherin am stärksten, die Expression in MKN45 und KATOIII Zellen war geringer (Abbildung 30A). Die Unterschiede der endogenen E-Cadherin-Expression in allen drei Zelllinien waren signifikant. Die Expression des EGFR nahm in der Reihenfolge MKN28 > MKN45 > KATOIII Zellen ab (Abbildung 30D). Die Expression des EGFR war in MKN28 im Vergleich zu KATOIII Zellen signifikant erhöht. Die Zelllinie MKN28 exprimierte nur sehr geringe Mengen von pEGFR (Abbildung 30C). Die Detektion lag dabei an der Nachweisgrenze, sodass für MKN28 Zellen keine pEGFR (Y1068) Expression bestimmt werden konnte.

MKN28 und KATOIII Zellen wiesen ähnliche, MKN45 Zellen, im Vergleich zu KATOIII Zellen, signifikant erhöhte Mengen an exprimierter AKT auf (Abbildung 30H). Die Aktivierung von AKT war in der Zelllinie MKN45 am stärksten und in MKN28 Zellen etwas schwächer, während KATOIII Zellen eine deutlich geringere Aktivierung aufwies (Abbildung 30G).

Bei den Zelllinien MKN28 und MKN45 zeigte sich eine ähnliche Expressionsstärke der MAPK, in der Zelllinie KATOIII hingegen war diese schwächer (Abbildung 30F). Die Aktivierung der MAPK wurde durch Phosphorylierung an T202/Y204 detektiert. Die Expressionsstärke von pMAPK (T202/Y204) war bei MKN45 Zellen am höchsten, gefolgt von MKN28 Zellen und mit etwas Abstand KATOIII Zellen (Abbildung 30E).

Es wurden deutliche Unterschiede in der Expression und Aktivierung der untersuchten Moleküle zwischen Zellen mit WT E-Cadherin-Expression und der Expression von mutiertem bzw. herunterreguliertem E-Cadherin innerhalb einer Zelllinie festgestellt.

MKN28 Zellen wiesen nach 96-stündiger Behandlung mit E-Cadherin-spezifischer siRNA eine hochsignifikante Reduktion der E-Cadherin-Expression um 91 % auf (Abbildung 30A). E-Cadherin zeigte in MKN28 Zellen einen Einfluss auf die Expression von EGFR: wurde E-Cadherin gehemmt, so war auch die EGFR-Expression signifikant geringer (Reduktion um 63 %). Das teilweise Stilllegen von E-Cadherin in MKN28 Zellen hatte keine Auswirkungen auf die MAPK-Expression und MAPK-Aktivierung. Die Expression von AKT war unabhängig von E-Cadherin. In Zellen mit herunterreguliertem E-Cadherin war die Aktivierung von AKT höher als bei WT Zellen.

MKN45 Zellen wurden 24 h einer Transfektion mit *wt*-EcadEGFP unterzogen, was zur Expression eines funktionellen, EGFP-gekoppelten E-Cadherins führte. Für die Quantifizierung des EGFP-gekoppelten E-Cadherin Signals wurden die Banden bei 150 kDa, was dem Molekulargewicht von E-Cadherin mit EGFP entspricht, herangezogen. Auch bei untransfizierten Zellen wurde ein geringes Signal detektiert, was ein unspezifisches Hintergrundrauschen darstellt. Die Expression des mutierten endogenen E-Cadherin stieg im Vergleich zu untransfizierten Zellen ebenfalls um 32 % an. Die Expression von EGFR blieb unabhängig vom E-Cadherin Status gleich, wohingegen die Aktivierung des EGFR in MKN45 Zellen mit WT E-Cadherin um 22 % sank. Auch auf die AKT-Expression und

-Aktivierung hatte E-Cadherin keinen Einfluss. WT E-Cadherin führte zu einer ca. 20 %igen Reduktion der Expression und Aktivierung der MAPK.

KATOIII Zellen wurden ebenfalls 24 h mit *wt*-EcadEGFP transfiziert. Diese Behandlung führte zu einer starken Expression des an EGFP-gekoppelten funktionellen E-Cadherins, wohingegen sich die Expression des mutierten E-Cadherins nach Transfektion des *wt*-EcadEGFP Konstrukts nicht änderte. Die Expression von EGFR war in KATOIII Zellen mit WT E-Cadherin gleich wie in KATOIII Zellen mit mutiertem E-Cadherin. Die Aktivierung war um 50 % geringer als in Zellen mit mutiertem E-Cadherin. Die Expression von AKT stieg um 25 % in KATOIII Zellen mit WT E-Cadherin, wohingegen die Aktivierung um 12 % sank. MAPK wurde in mit *wt*-EcadEGFP transfizierten KATOIII Zellen unghgefähr gleich stark exprimiert und aktiviert wie in KATOIII mit mutiertem E-Cadherin.

4 DISKUSSION

Der EGFR ist in unterschiedliche Signalwege und somit u.a. in die Regulation von Zellproliferation, Motilität und Invasion eingebunden [89, 117]. Eine Überexpression oder Amplifikation des EGFR in Karzinomen wird häufig mit fortgeschrittenem Tumorstatus, Therapieresistenz und teilweise mit schlechter Prognose assoziiert [118-120]. Aufgrund der tumorspezifischen Überexpression stellt der EGFR eine ideale Zielstruktur für eine selektive Tumorintervention dar.

Der gegen EGFR-gerichtete monoklonale Antikörper Cetuximab blockiert die Ligandenbindedomäne des EGFR, wodurch die Aktivierung des Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege gehemmt wird. Cetuximab ist bereits für die Behandlung von metastasierenden Kolonkarzinomen sowie Kopf- und Halstumoren zugelassen [126, 127]. Die Wirkung von Cetuximab beim Magenkarzinom wurde in mehreren klinischen Studien untersucht [78, 130-135]. Trotz vielversprechender Ergebnisse in Phase II Studien, konnte in einer Phase III Studie kein zusätzlicher Nutzen durch Cetuximab plus Chemotherapie im Vergleich zu einer Behandlung mit Chemotherapeutika alleine in der Erstlinientherapie bei fortgeschrittenen Magenkarzinomen detektiert werden [78]. Das Ansprechen auf ein Medikament kann von unterschiedlichen Faktoren abhängig sein. Für Cetuximab fehlen bisher verlässliche Parameter, die das Ansprechen der Patienten auf die Therapie oder Therapieresistenz vorhersagen. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit das therapeutische Ansprechen auf Cetuximab im Zellkultursystem untersucht werden.

Um das therapeutische Ansprechen auf Cetuximab im Zellkultursystem zu untersuchen, wurden fünf Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 umfassend hinsichtlich der Expression und Aktivierung von Signalwegs-Komponenten des EGFR-Signalwegs charakterisiert und das therapeutische Ansprechen in Bezug auf die Zellproliferation sowie Zellbeweglichkeit analysiert.

Die systembiologischen Analysen im BMBF-geförderten Verbundprojekt „MedSys – Cancermotivsys“ beruhen auf einer interdisziplinären Methodik, die mathematische Konzepte, sowie computergestützte Auswertungen und biologische Experimente umfasste. Ziel war es hierbei, phänotypische und genotypische Merkmale zu verbinden. Es sollten zelluläre Prozesse, die für die Beweglichkeit metastasierender Magenkrebszellen verantwortlich sind, auch auf molekularer sowie subzellulärer Ebene analysiert und beurteilt werden. Dabei sollten 1.) Genexpressionsmarker zur Vorhersage des metastatischen Potentials und therapeutischen Ansprechens beim Magenkarzinom, 2.) potentielle Zielgene für Medikamente, die mit der Beweglichkeit von Tumorzellen assoziiert sind, sowie 3.) Bewegungsmuster, die die Zellbewegung charakterisieren und somit einen Indikator der Metastasierung beim Magenkarzinom darstellen, identifiziert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, in einem durch die Anton & Petra Ehrmann Stiftung geförderten Projekt, den Einfluss des Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin auf intrazelluläre Vorgänge in drei weiteren Magenkarzinom-Zelllinien, KATOIII, MKN28 und MKN45, zu untersuchen. Dabei wurde E-Cadherin, das in Magenkarzinomen häufig mutiert ist, als potentieller Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab hin analysiert.

4.1 Molekulare Charakterisierung der Magenkarzinom-Zelllinien durch Proteomanalysen

4.1.1 Expression und Aktivierung des EGFR in den Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1

Eine Ligandenbindung an den EGFR resultiert in dessen Dimerisierung, Stimulation der Tyrosinkinaseaktivität und schließlich in der Aktivierung nachgeschalteter Signalwegs-Kaskaden. Die Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 wiesen in unbehandeltem Zustand unterschiedliche EGFR-Expressionslevel auf. Eine Aktivierung des EGFR konnte in jeder dieser Zelllinien nachgewiesen werden, sie variierte jedoch stark zwischen den Zelllinien. Wie in den hier vorliegenden Ergebnissen, wurde auch in einer weiteren Zellkultur-basierten *in vitro* Studie unserer Arbeitsgruppe [170] keine Korrelation zwischen der EGFR-Aktivierung und der EGFR-Expression in einem Panel aus fünf Magenkarzinom-Zelllinien detektiert. Im Gegensatz dazu wurde *in vivo* in einer Phase II Studie unserer Arbeitsgruppe [210] eine Korrelation der EGFR-Aktivierung und der EGFR-Expression detektiert.

In einer Studie mit fünf nativen Magenkarzinomgeweben waren EGFR und ErbB2 im Vergleich zur benachbarten gesunden Mukosa aktiviert. Diese beiden RTKs wurden ebenso in vier Magenkarzinom-Zelllinien, MKN1, MKN7, MKN45 und MKN74, als aktivierte Proteine detektiert [211]. Eine Überexpression oder Amplifikation des EGFR wird häufig in Karzinomen nachgewiesen [118]. In einer Studie mit Geweben von 511 Magenkarzinompatienten zeigten 27,4 % der Fälle eine EGFR-Protein-Überexpression; diese war mit vorangeschrittenem Alter, moderat bis schlecht differenzierter Histologie, sowie stärker ausgeprägtem Krankheitsbild assoziiert. Zusätzlich wiesen Patienten mit einer EGFR-Überexpression eine schlechtere Prognose auf [212]. In einer weiteren Studie mit 69 Magenkarzinomfällen wurden in 57,9 % der Fälle erhöhte *EGFR*-Genkopienzahlen sowie -Genamplifikationen festgestellt. Eine starke Proteinexpression des EGFR war in 52,2 % der Fälle nachweisbar. Neben EGFR wurde in dieser Studie auch ErbB2 untersucht. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass *EGFR*- und *ErbB2*-Amplifikationen positiv mit der EGFR- und ErbB2-Protein-Expression korrelierten. Außerdem wurde gezeigt, dass höhere *EGFR*- und *ErbB2*-Genamplifikationen verstärkt in Magenkarzinom-Patienten mit Lymphknotenmetastasen auftraten [213]. Weitere Studien zeigten eine Assoziation zwischen EGFR-Überexpression und schlechter Prognose [58, 131, 214-216].

Das in dieser Arbeit verwendete Panel der fünf Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 zeigt deutliche Unterschiede in der Stärke der Aktivierung und Expression des EGFR, was der Diversität der EGFR-Aktivierung und EGFR-Expression in Magenkarzinom-Patienten entspricht.

4.1.2 Expression und Aktivierung von Komponenten des EGFR-Signalwegs nach EGF-Stimulation

Die Aktivierung des Ras-MAPK-Signalwegs kann durch alle ErbB-Liganden und -Rezeptoren erfolgen [111]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung der MAPK nach Stimulation mit EGF in den Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 weniger stark ausgeprägt war als die EGFR-Aktivierung und zeitverzögert zu dieser einsetzte. Die schwache Aktivierbarkeit durch eine EGF-Behandlung lässt vermuten, dass die Aktivität der MAPK schon auf einem hohen Basalniveau lag. Für MKN1 Zellen ist eine stille Mutation in *MAP3K14* [217] und für die Zelllinie Hs746T eine Mutation in *MAP3K15* (c.1787G>A, p.R596H) beschrieben. Letztere wird als eine zu einer malignen Alteration führende Mutation beschrieben [187, 217]. In AGS Zellen liegt eine Mutation in *KRAS* vor, die zur konstitutiven Aktivierung von *KRAS* führt [187]. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass durch EGF-Stimulation die Aktivität der MAPK in AGS Zellen gesteigert wird. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass weitere Regulationsmechanismen für die Aktivierung der MAPK verantwortlich sind.

Einen anderen, dem EGFR nachgeschalteten Signalweg, stellt der PI3K-PKB/AKT-Signalweg dar. Die Aktivierung von AKT (pS473) wies über den Zeitverlauf in allen untersuchten Zelllinien Schwankungen mit Maxima nach wenigen Minuten auf. In zwei Zelllinien liegen *PIK3CA*-Mutationen vor: in AGS Zellen *PIK3CA* (c.1357G>A, p.E453K) und in MKN1 Zellen *PIK3CA* (c.163G>A, p.E545K) [187]. Da in allen Zelllinien AKT durch EGF stimulierbar war, kann geschlossen werden, dass die vorliegenden Mutationen in AGS und MKN1 Zellen keine Auswirkungen auf die EGF-induzierte Aktivierung des PI3K-PKB/AKT-Signalwegs haben.

Auch Corso und Kollegen haben gezeigt, dass in einer gehungerten Magenkarzinom-Zelllinie, GTL-16, mit zehnminütiger EGF-Stimulation (5 ng/ml) sowohl EGFR als auch MAPK aktiviert wurden, wohingegen AKT durch EGF kaum aktivierbar war [218].

4.1.3 EGF und Cetuximab beeinflussen die Expression und Aktivierung des EGFR

Um den inhibierenden Einfluss von Cetuximab auf die EGFR-Aktivierung und somit auch auf die Proliferation und Beweglichkeit der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen, neben EGF, zusätzlich mit Cetuximab behandelt. Über die Detektion von pEGFR (Y1068) wurde gezeigt, dass in AGS, AZ521, LMSU und MKN1 Zellen die EGF-induzierte Rezeptor-Aktivierung durch Cetuximab konzentrationsabhängig gehemmt werden konnte. Dies wurde sowohl in serumdeprivierten Zellen als auch in Zellen, die in FKS-haltigem Medium kultiviert wurden, detektiert. In Vollmedium kultivierte Hs746T Zellen zeigten keine Veränderungen der Expression oder Aktivierung des EGFR nach einer Behandlung mit EGF oder Cetuximab. Die geringe basale EGFR-Aktivität in serumdeprivierten Hs746T Zellen wurde hingegen durch EGF erhöht. Die in diesen Versuchen verwendeten EGF-Konzentrationen (5 ng/ml EGF für Zellen, die in FKS-haltigem Medium kultiviert wurden und 30 ng/ml EGF für die Stimulation serumdeprivierter Zellen) scheint für Hs746T Zellen zu gering zu sein, um eine EGFR-Aktivierung zu induzieren. Mit 100 ng/ml EGF waren auch serumdeprivierte Hs746T Zellen (vgl. Abbildung 11) stimulierbar, allerdings ist diese Konzentration nicht physiologisch, weshalb für weitere Versuche 30 ng/ml EGF für serumdeprivierte Zellen und 5 ng/ml EGF für nicht-serumdeprivierte Zellen verwendet wurde. Die EGF-Konzentration im Serum beträgt in gesunden Frauen und Männern zwischen 150 pg/ml und 4 ng/ml [199, 200]. Viele Zellkultur-basierte Studien setzen EGF-Konzentrationen von 5 - 100 ng/ml EGF ein [170, 219-225].

In einem Panel aus fünf Magenkarzinom-Zelllinien (AGS, KATOIII, MKN1, MKN28 und MKN45) wurde die Cetuximab-Sensitivität mit einer hohen Expression und geringen Aktivierung des EGFR korreliert [170]. Die Cetuximab-sensitive Zelllinie MKN1 wies auch in diesen Versuchen eine starke Expression und durchschnittliche Aktivierung des EGFR auf, wohingegen die ebenfalls Cetuximab-sensitiven AZ521 Zellen sowohl eine sehr schwache EGFR-Expression als auch -Aktivierung zeigten. In Immunfluoreszenzversuchen (Daten nicht gezeigt, für MKN1 Zellen in Heindl et al. 2012 veröffentlicht) wurde eine zytoplasmatische Lokalisation des EGFR in MKN1 Zellen nachgewiesen [170]. Es wurde beschrieben, dass die *FBXW7*-Mutation zu reduzierter Substratbindung und folglich zu einer zytoplasmatischen Akkumulation des EGFR führen kann [226]. Es wird vermutet, dass eine Mutation in *FBXW7* für die zytoplasmatische Akkumulation des EGFR in MKN1 Zellen verantwortlich sein könnte [170]. Um die Unterschiede in MKN1 und Hs746T Zellen genauer zu analysieren, wurden weitere proteomische Analysen mit erweitertem Behandlungsspektrum durchgeführt.

4.1.3.1 Cetuximab inhibiert die EGFR-Aktivierung in MKN1 Zellen

Um kinetische Einflüsse in einer Cetuximab-sensitiven (MKN1) und einer Cetuximab-resistenten Zelllinie (Hs746T) auf den EGFR-Signalweg zu untersuchen, wurde in diesen Zellen die Aktivität von EGFR sowie zweier nachgeschalteter Moleküle, MAPK und AKT, durch EGF und/oder Cetuximab analysiert.

Zusammengefasst ergaben die Proteom-Untersuchungen von Cetuximab-sensitiven und Cetuximab-resistenten Zellen deutliche Unterschiede:

Erstens ist der EGFR in MKN1 Zellen stärker durch EGF stimulierbar als in Hs746T Zellen; wie schon zuvor diskutiert, ist eine Konzentration von 5 ng/ml EGF zur Induktion der EGFR-Aktivierung in Hs746T Zellen eventuell zu gering. Kinetikversuche mit 100 ng/ml EGF als Stimulanz wiesen eine signifikante EGF-induzierte Aktivierung des Rezeptors in Hs746T Zellen auf. Allerdings ist eine EGF-Konzentration von 100 ng/ml außerhalb des physiologischen Spektrums (s.o.), weswegen für alle weiteren molekularen sowie phänotypischen Untersuchungen 5 ng/ml EGF verwendet wurde.

Des Weiteren ist die EGFR-Aktivierung durch EGF, sowohl bei MKN1 als auch bei Hs746T Zellen, bei zuvor gehungerten Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei Zellen, die in Vollmedium kultiviert wurden. Da in Hungermedium keine zusätzlichen Wachstumsstoffe enthalten sind, ist das Basisniveau der EGFR-Aktivierung unbehandelter Zellen geringer als von Zellen, die in FKS-haltigem Medium kultiviert wurden. Durch diese Gegebenheit ist der Anstieg der EGF-induzierten Aktivierung klar detektierbar. In Hungermedienversuchen wurden die Zellen mit 30 ng/ml EGF stimuliert um das Fehlen von Wachstumsstoffen zu kompensieren. Hungermedienversuche spiegeln das Geschehen somit durch deutlichere Differenzen wider. Nichtsdestotrotz wurde in dieser Arbeit, soweit möglich, mit FKS-haltigem Medium gearbeitet. Dies hatte im Wesentlichen zwei Gründe: Einerseits entspricht FKS-haltiges Medium eher der Umgebung von Tumorzellen, da in Tumorgewebe natürlicherweise Wachstumsstoffe vorhanden sind. Außerdem stellt Hungern einen zusätzlichen Stress für die Zellen dar. Dies führt zur Aktivierung stressinduzierbarer Signalwege, was durch Interaktionen wiederum Auswirkungen auf die Aktivität der untersuchten Signalwege haben kann.

Weiter fiel auf, dass Cetuximab die EGFR-Aktivierung in MKN1 Zellen konzentrationsabhängig inhibierte, in Hs746T Zellen hingegen nicht; die Einteilung in Cetuximab-sensitive und Cetuximab-resistente Zelllinien, die aus dem Proliferationstest hervorging, wurde auf Proteinebene verifiziert. Die EGFR-Aktivierung korrelierte nicht mit der EGFR-Expression, jedoch spiegelte die EGFR-Aktivierung die Cetuximab-Sensitivität der einzelnen Zelllinien wider. Das heißt, Cetuximab inhibiert die EGFR-Aktivierung auf Proteinebene, was sich anschließend durch weniger stark aktivierte nachgeschaltete Signalwege in verminderter Proliferation (Abbildung 18) auswirkt.

4.1.4 Zusammenfassung und Konklusion 1

In den analysierten Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 wurde EGFR in Medium mit FKS in unterschiedlicher Stärke exprimiert und aktiviert. Die Expression und die Aktivierung von EGFR korrelierten nicht.

Nach Serumdeprivation war EGFR in allen Zelllinien durch 100 ng/ml EGF transient aktivierbar und wies eine maximale Aktivierung nach wenigen Minuten auf. Die nachgeschalteten Signalwegskomponenten MAPK und AKT wurden zeitverzögert aktiviert.

In AGS, AZ521, LMSU und MKN1 Zellen war in Vollmedium mit FKS die EGF-induzierte EGFR-Aktivierung durch Cetuximab konzentrationsabhängig inhibierbar. In Hs746T Zellen wurde die EGFR-Aktivierung durch eine Cetuximab-Behandlung nicht reduziert. Weder Behandlungen mit Cetuximab noch mit EGF führten in den Zelllinien zu signifikanten Veränderungen der EGFR-Expression.

In kinetischen Analysen der EGFR-Aktivierung zeigte sich, dass Cetuximab die EGFR-Aktivierung in MKN1 Zellen, nicht aber in Hs746T Zellen konzentrationsabhängig inhibierte.

4.2 Phänotypische Analysen zur Prädiktion der Cetuximab-Sensitivität

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Proliferation und das Bewegungsverhalten als phänotypische Marker für die Cetuximab-Sensitivität der Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 analysiert.

4.2.1 Analyse der Cetuximab-Sensitivität der Zelllinien auf Proliferationsebene

Um den Einfluss des EGFR-Inhibitors Cetuximab auf die Proliferation der Magenkarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurde ein Proliferationstest durchgeführt. Die Cetuximab-Sensitivität der Zelllinien wurde dabei über die Bestimmung der Zellviabilität analysiert. Es zeigte sich, dass zwei der untersuchten Zelllinien, AZ521 und MKN1, eine dosisabhängige signifikant reduzierte metabolische Aktivität aufwiesen. Diese Zelllinien wurden als Cetuximab-sensitiv, AGS, Hs746T und LMSU Zellen hingegen als Cetuximab-resistent definiert. Diese Daten stimmen mit zuvor publizierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe für die Zelllinien MKN1 und AGS überein [170].

Alle untersuchten Zelllinien exprimieren EGFR in unterschiedlicher Stärke (4.1.1 Expression und Aktivierung des EGFR in den Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1). Es konnte keine Korrelation zwischen der Cetuximab-Sensitivität und der EGFR-Expression oder -Aktivierung in unbehandelten Zellen festgestellt werden.

In allen Zelllinien, außer der Zelllinie Hs746T, war die Inhibierung der durch EGF-induzierten EGFR-Aktivierung durch den Antikörper Cetuximab auf Proteomebene äußerst wirksam (3.2.3). Die dabei verwendeten Cetuximab-Konzentrationen lagen unterhalb der klinisch relevanten Dosis von 100 µg/ml [227, 228]. Die metabolische Aktivität wurde durch Cetuximab in nur zwei Zelllinien, MKN1 und AZ521, signifikant reduziert. Obwohl klinisch-relevante Cetuximab-Konzentrationen eingesetzt wurden, waren die Ansprechraten auf eine Behandlung eher gering. Ein Grund für die geringen Ansprechraten kann das verwendete Medium sein. Um Nebenwirkungen, die durch Hungern entstehen, zu vermeiden, wurden die Zellen für den Proliferationstest in FKS-haltigem Medium kultiviert. In diesem sind proliferationsfördernde Substanzen enthalten. Dadurch können alternative Signalwege, die für die Zellproliferation oder das Überleben der Zellen verantwortlich sind, aktiviert werden, wodurch der hemmende Effekt von Cetuximab auf die EGFR-Aktivierung relativiert wird.

Der Effekt von Cetuximab im Magenkarzinom wurde durch unterschiedliche Untersuchungen an Zelllinien, Xenotransplantationsmodellen sowie in klinischen Studien untersucht. Eine kürzlich publizierte Studie bestätigt unser Ergebnis, dass Cetuximab keinen wachstums- und viabilitäts-hemmenden Effekt auf AGS Zellen, sowie MKN45 und NCI-N87 Zellen, hat [229]. *In vitro* zeigte Cetuximab keinen Effekt auf die Magenkarzinom-Zelllinien MKN28 und GLM-1. In einem

Xenotransplantationsmodell wies Cetuximab einen signifikanten inhibierenden Effekt auf das subkutane und intraperitoneale Tumorwachstum von MKN28 Zellen, jedoch nicht von GLM-1 Zellen auf [230].

Bei der Behandlung des Magenkarzinoms wurde in mehreren klinischen Phase II Studien ein Ansprechen auf Cetuximab in Kombination mit unterschiedlichen Erstlinien-Chemotherapie-Behandlungen nachgewiesen. Die Gesamt-Ansprechraten lagen um 41 - 65 % höher als bei Patienten mit alleiniger Chemotherapie-Behandlung [130-135]. In der Phase III Studie EXPAND konnte durch die additive Gabe von Cetuximab kein zusätzlicher Nutzen im Vergleich zu einer Monotherapie mit Chemotherapie detektiert werden [78].

4.2.2 Analyse der EGF- und/oder Cetuximab-induzierten Änderungen des Bewegungsverhaltens von Magenkarzinom-Zelllinien

Metastasen sind für ca. 90 % der Todesfälle solider Tumoren verantwortlich. Während der metastatischen Progression müssen die Zellen migrieren und durch die ECM invadieren. Somit sind Zellmigration und Zellinvasion wichtige Schritte in der Bildung von Metastasen [11]. Der EGFR ist einerseits für die Proliferation und das Überleben von Zellen [118] sowie andererseits für die zelluläre Bewegung [19, 204], die eine Voraussetzung für die Invasivität von Zellen darstellt [23], wichtig.

Es wurde der Einfluss von EGF und des EGFR-Inhibitors Cetuximab auf die Motilität und Invasivität der Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 analysiert. Außerdem wurde der Einfluss einer Behandlung auf die Morphologie der Zellen untersucht.

Morphologisch betrachtet zeigten EGF-behandelte MKN1 Zellen deutlich mehr Lamellipodien und Filopodien als unbehandelte Zellen. Mit zusätzlicher Gabe von Cetuximab sank die Bildung der Lamellipodien und Filopodien konzentrationsabhängig. Eine Monotherapie mit Cetuximab führte in MKN1 Zellen zur Reduktion von Zellfilamenten im Vergleich zu unbehandelten MKN1 Zellen. In Hs746T Zellen hingegen wurden unter verschiedenen Behandlungsbedingungen keine morphologischen Unterschiede detektiert.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Analysen von Felkl et al. 2012 [219]. In deren Studie wurden die EGF-induzierte zeitliche und räumliche Koordination der Zytoskelettfilament-Reorganisation sowie die fokale ECM-Adhäsionsdynamik analysiert. Es wurde ein EGF-induzierter Anstieg der Lamellipodien-Aktivität beschrieben. Dieser war nach wenigen Minuten bis hin zu einer Stunde detektierbar und durch Cetuximab inhibierbar. Hs746T Zellen reagierten hingegen weder auf Behandlung mit EGF noch Cetuximab. Bei unseren Untersuchungen startete die Bewegungsanalyse 1 h nach Behandlung der Zellen mit EGF oder Cetuximab. Die EGF-induzierte und Cetuximab-inhibierte Bildung von Lamellipodien und Filopodien wurde während siebenstündigen Aufnahmen von MKN1 Zellen detektiert; keine morphologischen Änderungen waren hingegen bei EGF- und

Cetuximab-resistenten Hs746T Zellen detektierbar. Somit wurde gezeigt, dass die verstärkte Bildung von Zellfilamenten ein lang-andauernder Effekt ist, der zumindest über mehrere Stunden detektiert werden kann.

Um das Bewegungsverhalten der Zellen zu analysieren, wurden die Parameter Motilitätsstatus und durchschnittliche Geschwindigkeit detektiert. Hierbei wurden die Zellen auf ihr Ansprechen gegenüber EGF- und Cetuximab-Behandlungen analysiert. Ein idealer *Responder* reagiert auf die Behandlung mit EGF mit einem signifikanten Anstieg der Motilität und Geschwindigkeit. Die Motilität und Geschwindigkeit eines idealen *Responders* wird durch die zusätzliche Gabe von Cetuximab konzentrationsabhängig signifikant reduziert. Außerdem weist ein *Responder* nach einer Monobehandlung mit Cetuximab ein signifikant geringeres Niveau der Motilität und Geschwindigkeit auf als unbehandelte *Responder*-Zellen.

Zusammengefasst konnte für die EGF- und Cetuximab-sensitive Zelllinie MKN1 ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Geschwindigkeit durch EGF-Behandlung gezeigt werden. Der durch EGF induzierte Anstieg der Motilität von MKN1 Zellen war deutlich, jedoch nicht signifikant. Steigende Cetuximab-Konzentrationen resultierten in einer signifikanten Reduktion EGF-induzierter motiler Zellen und hohe Cetuximab-Konzentrationen führten ebenso zu geringerer Geschwindigkeit. Dies spiegelt die zuvor anhand von Proliferationstests bestimmte Cetuximab-Sensitivität von MKN1 Zellen [170, 185] auf Motilitätsebene wider.

In Bezug auf das Bewegungsverhalten zeigte sich die Hs746T Zelllinie in diesen Zeitraffer-Mikroskopie Versuchen als Cetuximab-resistente Zelllinie, da kaum signifikante Unterschiede detektiert wurden - weder beim Motilitätsstatus noch bei der Geschwindigkeit. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der zuvor beschriebenen Cetuximab-Insensitivität von Hs746T Zellen [185].

AGS Zellen reagierten auf eine EGF-Behandlung mit erhöhter Geschwindigkeit und Motilität. Cetuximab-Behandlungen in Kombination mit EGF führten zu signifikanten Reduktionen der durchschnittlichen Geschwindigkeit sowie der Motilität verglichen mit EGF-behandelten AGS Zellen. AGS Zellen wiesen von allen fünf untersuchten Zelllinien die höchste Geschwindigkeit und Motilität auf. AZ521 Zellen wiesen im Vergleich mit AGS Zellen eine deutlich niedrigere Motilität und Geschwindigkeit auf. Die Motilität der AZ521 Zellen stieg nach EGF-Behandlung nur gering an und sank nach Behandlung mit geringer Cetuximab-Konzentration. EGF hatte auf die Geschwindigkeit von AZ521 Zellen keinen Einfluss. LMSU Zellen wiesen nach EGF-Behandlung eine deutlich höhere Motilität und Geschwindigkeit auf als unbehandelt. Nach EGF- und Cetuximab-Behandlung sanken die Rate motiler Zellen sowie die Geschwindigkeit, wohingegen die Motilität nach Stimulation mit Cetuximab in hohen Konzentrationen stieg. Nach Serumdeprivation der MKN1 Zellen waren die durch EGF-Behandlungen induzierten Unterschiede sowohl hinsichtlich der Motilität als auch der Durchschnittsgeschwindigkeit stärker ausgeprägt als bei nicht gehungerten MKN1 Zellen.

Der Effekt von EGF auf die Migration und Invasion von Krebszellen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen ausführlich untersucht. Es wurde berichtet, dass die Migration von MKN1, MKN7

und MKN28 Zellen nach EGF-Behandlung gesteigert wurde [231]. Diese Ergebnisse bestätigen die in dieser Arbeit präsentierten Daten für MKN1 Zellen. Die Induktion der Migration durch EGF wurde auch für Prostatakarzinom-Zellen [232] und Plattenepithelkarzinom-Zellen (E10) [233] beschrieben. EGF induzierte auch die Invasivität der Fibrosarkom-Zelllinie HT-1080 [234].

In früheren Studien anderer Arbeitsgruppen wurde ebenfalls eine Assoziation der Inhibierung des EGFR-Signalwegs mit der Reduktion der Zellmigration und -invasion analysiert. In Glioblastomen war eine *EGFR*-Amplifikation mit erhöhter Migration assoziiert, wohingegen die Inhibierung des EGFR mit Gefitinib die Tumorzellmigration in *EGFR*-amplifizierten Glioblastom-Zellen verminderte [235].

Capsaicin, eine natürliche Komponente der scharfen Chillischote, der antikarzinogene Aktivität zugesprochen wird [236], inhibierte die EGF-induzierte Migration und Invasion in HT-1080 Zellen über FAK/AKT, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK und AP-1 Signalwege [234]. Platycodin D, ein aktives Triterpensaponin, das in mehreren Studien wachstumsinhibierend auf humane Krebszellen wirkte [237], inhibierte die Migration und Invasion von MDA-MB-231 Mammakarzinom-Zellen durch die Suppression der EGFR-vermittelten AKT und MAPK Signalwege [238]. Der EGFR-Inhibitor Cetuximab führte zu einer Abnahme der Migration in der SCCHN-Zelllinie SCC-1 [239] und in Zungen-Plattenepithelzellkarzinom-Zellen [233]. In SCC-1 Zellen inhibierte Cetuximab außerdem das invasive Potential der Zellen [239].

Es wurde, wie schon zuvor erwähnt, von Kooperationspartnern gezeigt, dass die Behandlung von MKN1 Zellen mit EGF zu einem starken Anstieg des Membran-*Rufflings* und der Aktivität der Lamellipodien führte, der innerhalb von 1-2 min durch die Gabe von Cetuximab geblockt wurde. Im Gegensatz zu MKN1 Zellen zeigten Hs746T Zellen keine bedeutenden das Zytoskelett betreffenden Änderungen nach EGF- oder Cetuximab-Behandlung [219]. *Ruffling* wurde als Parameter für die Motilität und Invasion von Tumorzellen beschrieben [240]. Die Intensität des *Rufflings* in MKN1 und Hs746T Zellen nach EGF- oder Cetuximab-Behandlung [219] war mit Motilität, sowie Migration und Invasivität der Zellen (Arbeiten aus der Arbeitsgruppe; Keller und Kneißl et al., Manuskript in Vorbereitung) in dieser Arbeit assoziiert.

In Patienten kommt EGF im Stroma vor. Da in den analysierten Zelllinien EGF weder im konditionierten Medium noch im Zellextrakt in signifikanten Konzentrationen detektiert werden konnte [185] wurden die Zellen in den hier vorliegenden Untersuchungen zusätzlich zu Cetuximab mit EGF behandelt, um die Situation im Zellkultur-System möglichst nahe an die im Patienten anzugleichen. Durch die Zugabe von EGF wurde die EGFR-Signalkaskade maximal stimuliert. Als Kontrolle wurden für jede Zelllinie Zeitraffer-Mikroskopie Aufnahmen mit Cetuximab-Monotherapie behandelten Zellen durchgeführt.

Die Fähigkeiten von Zellen zu proliferieren, aber auch zu migrieren und invadieren, werden allgemein untersucht, um die Sensitivität von Zelllinien gegenüber unterschiedlichen Stimulanzen zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Bestimmung der Motilität und

Geschwindigkeit der Zellen durch Zeitraffer-Mikroskopie Aufnahmen gelegt. Zusätzlich wurden in der Arbeitsgruppe *Transwell* Migrations- und Invasionsexperimente durchgeführt, die für diese Arbeit als Vergleichsmethode herangezogen werden können.

Die aufwändige manuelle Auswertung der Zeitraffer-Mikroskopie Filme ergab starke individuelle Schwankungen der Motilität und Geschwindigkeit einzelner Zellen, sodass manche Ergebnisse nicht statistisch signifikant waren, obwohl eindeutige Trends erkennbar waren. Tumorzellen an sich sind von sehr heterogener Art, so ist es schlüssig, dass sie sich in Geschwindigkeit und Bewegungscharakteristika stark voneinander unterscheiden. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits früher Zeitraffer-Mikroskopie Aufnahmen durchgeführt, bei denen bis zu zehnfache Unterschiede in der Geschwindigkeit gemessen wurden [179]. In der eben zitierten Studie und auch in den in dieser Arbeit vorliegenden Analysen wurde der Zellzyklus der untersuchten Zellen vor der Bewegungsanalyse nicht synchronisiert. In einer Studie einer anderen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Zellen Unterschiede in ihrem Bewegungsverhalten aufweisen, die von den Zellzyklus-Phasen abhängig sind [241]. Um die interzellulären Unterschiede auszugleichen, wurden pro Zelllinie und Behandlung zwischen 146 und 291 Zellen, für Cetuximab-Kontrollen und Hungermedienversuche mindestens 100 Zellen, analysiert. In den hier vorliegenden Experimenten wurden Zellen, die sich während der siebenstündigen Aufnahme teilen, von der Analyse ausgeschlossen. Durch die hohe Komplexität der zellulären Bewegung, die durch Zeitraffer-Mikroskopie Aufnahmen beobachtet wurde, ist das vorliegende System sehr sensitiv gegenüber Störungen. Beispielsweise kann eine Behandlung zu verminderter Anheftung von Zellen an die Matrix führen, was möglicherweise als erhöhte Motilität missinterpretiert werden kann.

Der *Transwell* Migrations- und Invasionstest bietet eine Ja-Nein Entscheidung um das Migrations- bzw. Invasionspotential von Zellen zu bestimmen. Mithilfe dieses Tests können jedoch nur die Migration sowie die Invasion als Parameter der Zellbewegung bestimmt werden, wohingegen bei der Zeitraffer-Mikroskopie diverse Parameter bestimmt und eventuelle Veränderungen der Zellen in ihrem Bewegungsmuster detektiert und zeitlich eingeordnet werden können.

Mit den bereits vorhandenen Zeitraffer-Mikroskopie Filmen können in folgenden Projekten weitere Parameter auf ihre mögliche Eignung als Biomarker analysiert werden, die das Bewegungsverhalten der Zellen nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung zusätzlich beschreiben, wie z.B. die minimalen und maximalen Ausdehnungen der einzelnen Zellen.

4.2.3 Zusammenfassung und Konklusion 2

Als phänotypische Marker für die Cetuximab-Sensitivität der Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 wurden Proliferation und das Bewegungsverhalten analysiert.

Im Proliferationstest wiesen die Zelllinien AZ521 und MKN1 eine dosisabhängige signifikant reduzierte metabolische Aktivität auf und wurden deshalb als Cetuximab-sensitive Zelllinien definiert. AGS, Hs746T und LMSU Zellen hingegen wiesen eine Cetuximab-Resistenz auf. Es wurde keine Korrelation zwischen der Cetuximab-Sensitivität und der EGFR-Expression oder -Aktivierung in unbehandelten Zellen festgestellt.

Beim Vergleich der Morphologie von MKN1 und Hs746T Zellen zeigte sich, dass die verstärkte Bildung von Zellfilamenten durch EGF-Behandlung in MKN1 Zellen ein lang-andauernder Effekt ist, der zumindest über mehrere Stunden detektiert werden kann.

Bei der Analyse des Bewegungsverhaltens der Magenkarzinom-Zelllinien weisen die hier präsentierten Ergebnisse darauf hin, dass Cetuximab die Motilität, Geschwindigkeit und Invasivität von MKN1 Zellen, aber nicht von Hs746T Zellen reduziert. Diese Wirkung zeigt Cetuximab einerseits in Kombination mit EGF, aber auch wenn Cetuximab als Monotherapie eingesetzt wird. Außerdem wurde gezeigt, dass EGF das Bewegungs- und Invasionspotential von MKN1 Zellen erhöht, wohingegen durch EGF keine Auswirkungen auf Hs746T Zellen detektiert wurden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine EGF-induzierte EGFR-Aktivierung zu erhöhter Motilität und Invasivität von MKN1 Zellen führte. Diese Aktivierung konnte in der Cetuximab-sensitiven MKN1 Zelllinie durch Cetuximab inhibiert werden. Die Cetuximab-resistente Zelllinie Hs746T zeigte geringe Änderungen nach EGF-Stimulation, durch Cetuximab konnte weder die EGFR-Aktivierung noch die Motilität der Zellen beeinflusst werden. Diese Daten stehen in Einklang mit der, über Proliferationsanalysen, bestimmten Cetuximab-Sensitivität von MKN1 Zellen, sowie der Cetuximab-Resistenz von Hs746T Zellen.

AGS, AZ521 und LMSU Zellen zeigten zwar nach EGF-Behandlung eine erhöhte Geschwindigkeit und Motilität. Jedoch waren die Reduktionen der Motilität und Geschwindigkeit nach Cetuximab-Behandlungen in Kombination mit EGF oder als Monotherapien nicht für alle Behandlungen, wie für einen idealen *Responder* nötig, gegeben. Aus diesem Grund wurden AGS, AZ521 und LMSU Zellen, wie Hs746T Zellen betreffend der Motilität und durchschnittlichen Geschwindigkeit als Cetuximab-resistente Zelllinien definiert.

Um den Effekt von EGF und Cetuximab auf das Bewegungsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden neben Zeitraffer-Mikroskopie Versuchen in unserer Arbeitsgruppe auch Migrations- und Invasionstests durchgeführt, die für die einfache und schnelle Bestimmung der Sensitivität in Bezug auf die Migration verwendet werden können. Die Komplexität des Bewegungsverhaltens und kleine Änderungen der Bewegung können allerdings nur durch aufwändige und aussagekräftigere Zeitraffer-Mikroskopie Experimente analysiert werden.

4.3 Korrelation des Proteoms mit dem Phänotyp

4.3.1 Modell für die Vorhersage des Ansprechens auf eine Cetuximab-Behandlung

Um Magenkarzinom-Zelllinien korrekt nach ihrer Cetuximab-Sensitivität bzw. -Resistenz zu klassifizieren, wurde ein hierarchisches Modell mit prädiktiven molekularen Biomarkern (Abbildung 31) entwickelt [185]. Dieses beinhaltet das Vorhandensein einer aktivierenden *KRAS*-Mutation, die Aktivierung von MET sowie die Sekretion des EGFR-Liganden Amphiregulin (AREG). Das Modell wurde mithilfe von fünf Magenkarzinom-Zelllinien - AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 - erstellt und durch drei weitere Zelllinien - KATOIII, MKN28, MKN45 - validiert.

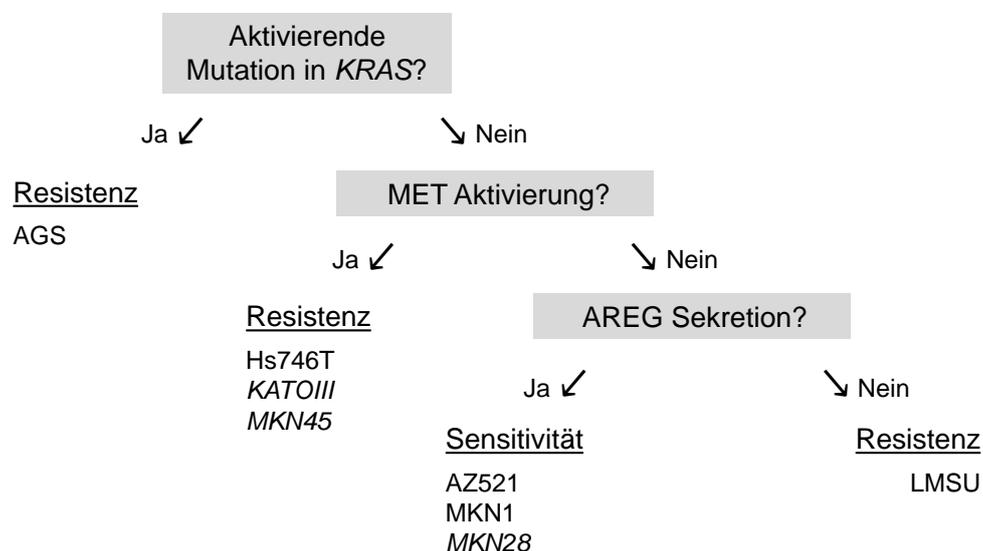


Abbildung 31: Modell für die Vorhersage der Cetuximab-Sensitivität in Magenkarzinom-Zelllinien. Basierend auf drei Einteilungskriterien - dem Vorhandensein einer *KRAS*-Mutation, einer MET-Aktivierung, sowie der AREG-Sekretion - wurden die Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 als Cetuximab-sensitiv oder -resistent eingeteilt. Dieses Modell wurde durch drei weitere Magenkarzinom-Zelllinien (MKN28, MKN45 und KATOIII) validiert.

Die höchste Priorität wurde *KRAS*-Mutationen zugeordnet. Der Grund hierfür ist das Wissen, dass Kolorektalkarzinom-Patienten, die keine Onkogen-Aktivierungen der dem EGFR nachgeschalteten Effektoren *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* und *PTEN* aufweisen, besser auf anti-EGFR-Therapien ansprechen [242]. Eine Cetuximab-Behandlung zeigte in AGS Zellen weder einen Effekt auf die Zellproliferation noch auf die Zellviabilität [229]. *PIK3CA*-Mutationen wurden in dem vorliegenden Modell als Marker ausgeschlossen, da sowohl die Cetuximab-sensitive Zelllinie MKN1 als auch die Cetuximab-resistenten AGS Zellen *PIK3CA*-Mutationen aufweisen [187]. Weiterhin ist aus Untersuchungen an Kolonkarzinom-Zelllinien bekannt, dass *PIK3CA*-Mutationen alleine nicht

ausreichen, um Zelllinien nach Cetuximab-Sensitivität und -Resistenz einzuordnen [243]. Der *KRAS*-Mutationsstatus in Magenkarzinom-Patienten ist deutlich geringer als bei Kolonkarzinom-Patienten. Betrachtet man den *KRAS*-Mutationsstatus auf den *Hotspot* Codons 12 und 13, so beläuft sich die aus ca. 50 Studien ermittelte Mutationshäufigkeit in Magenkarzinomen auf einen Median von 6,5 % (0 - 36 %) [244].

Die Aktivierung von MET wurde in unterschiedlichen Studien mit einer Cetuximab-Resistenz in Verbindung gebracht [170, 245, 246] und steht in diesem Modell an zweiter Stelle. Es gibt unterschiedliche Studien, die auf eine prädiktive Rolle von MET in der EGFR-inhibierten Therapie hinweisen [201-203, 247, 248]. Wie schon durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlicht wurde, geht die Aktivierung von MET in KATOIII und MKN45 Zellen mit der Aktivierung des EGFR einher [170]. Eine ähnliche Beobachtung wurde in dieser Arbeit gemacht: Hs746T Zellen, bei denen bereits *Splice Site* Mutationen in *cMET*, was in der Deletion der Juxtamembran Domäne resultiert [249], und eine genomische Amplifizierung von MET nachgewiesen wurden [217], zeigten hohe MET- und EGFR-Aktivierungslevel. Bemerkenswerterweise hatte Cetuximab in dieser Zelllinie nur geringe Effekte auf die Phosphorylierung von EGFR, wohingegen die EGFR-Aktivierung durch Behandlung in den vier weiteren Zelllinien (AGS, AZ521, LMSU und MKN1) moduliert wurde. Es wurde gezeigt, dass eine Beziehung zwischen den Tyrosinkinasen MET und EGFR, die sich u.a. durch physikalische Interaktion, sowie liganden-abhängige oder liganden-unabhängige Transaktivierung äußert, besteht und dass eine Coaktivierung mehrerer RTKs in Tumorzellen in einer Resistenz gegen Monotherapien resultiert [202, 250]. Aus diesem Grund könnte die Coaktivierung von MET die Ineffektivität einer anti-EGFR-Therapie in den Cetuximab-resistenten Zelllinien Hs746T, KATOIII und MKN45 erklären.

Als letztes Einteilungskriterium wurde die Sekretion von AREG bestimmt (Versuche durchgeführt von Dr. J. Kneißl und T. Lorber). Dabei zeigte sich, dass AZ521 Zellen die höchste Konzentration an AREG (1375 pg/ml im konditionierten Medium, 1017 pg/mg im zellulären Extrakt) aufwiesen. Auch in MKN1 Zellen wurde ein hoher AREG-Gehalt detektiert (519 pg/ml im konditionierten Medium, 746 pg/mg im zellulären Extrakt). Im Gegensatz dazu wurden in Hs746T Zellen nur geringe Mengen an AREG (zehnfach geringer als in AZ521 Zellen) gemessen. In AGS und LMSU Zellen war es nicht möglich signifikante AREG-Konzentrationen zu messen [185].

Eine hohe Expression von AREG und EREG in Kolonkarzinomen wurde als prädiktiver Biomarker für kombinierte Cetuximab- und Chemotherapien in Patienten ohne *KRAS*-Mutationen bestimmt [251, 252]. Gegensätzlich zu den Ergebnissen bei Kolorektalkarzinomen wurde in einer Phase II Studie bei mit Oxaliplatin, Leucovorin und 5-FU behandelten Magenkarzinom-Patienten keine signifikante Korrelation zwischen der AREG-Expression und der Ansprechrate detektiert [135]. Die MET-Aktivierung wurde in dieser Studie nicht bestimmt. Ein technischer Unterschied zwischen den beiden zitierten Studien ist die Messung der AREG-Expression: im Kolorektalkarzinom wurde das mRNA Expressionslevel bestimmt, bei den Magenkarzinom-Patienten wurden die Serumlevel gemessen.

Wurde die Korrelation zwischen Tumor-mRNA-Expression und dem Proteinlevel im Blut, das über ELISA-Analysen gemessen wurde, bestimmt, wurde nur eine geringe Korrelation zwischen den systemischen Protein-Leveln und den Tumor-mRNA-Leveln von AREG festgestellt [252]. Cetuximab ist für die Behandlung von SCCHN und Kolonkarzinomen zugelassen. Für diese Tumorentitäten sind die Aussagen bezüglich des prädiktiven Wertes von AREG widersprüchlich. In einer Studie sprachen hohe Expressionslevel von EGFRvIII und AREG weniger für eine erfolgreiche Behandlung mit Cetuximab und Docetaxel [253], wohingegen die autokrine Produktion von AREG in *EGFR*-Wildtyp SCCHN-Karzinomen und -Zelllinien auf Gefitinib- und auch Cetuximab-Sensitivität hinwies [254]. Unterschiedliche Studien zeigen, dass von Tumorzellen produziertes AREG in die Pathogenese und/oder Progression humaner Magenkarzinome involviert ist [255, 256]. Von 32 Tumoren exprimierten 20 (62,5 %) AREG-mRNA auf höherem Level als die jeweils vergleichbare normale Mukosa. Im Gegensatz dazu konnte keine Beziehung zwischen AREG-mRNA-Leveln und den histologischen Typen oder dem Tumor-*Staging* von Magenkarzinomen festgestellt werden [255]. Zusätzlich wurde von einer Assoziation zwischen der AREG-Expression und der Entwicklung einer Peritonealkarzinose in Magenkarzinom-Patienten berichtet [256]. Die Kombination von EGFR-Expression mit geringen Leveln der EGFR-Liganden EGF und TGF- β wurde positiv mit der Ansprechrate auf eine Kombinationstherapie mit Cetuximab und modifizierter FOLFOX6 korreliert [135]. Aufgrund der geringen EGF-Expression in Cetuximab-sensitiven und Cetuximab-resistenten Magenkarzinom-Zelllinien, wurde geschlossen, dass die EGF-Expression im vorliegenden Projekt kein prädiktiver Marker für die Cetuximab-Sensitivität darstellt. Dieser Mangel an löslichem EGF lässt vermuten, dass obwohl EGF in allen Zelllinien in geringem Maß exprimiert wird, EGF nicht proteolytisch aktiv ist. Es wurde vorgeschlagen, dass die proteolytische Abgabe von EGF für dessen Aktivität essentiell ist, da es nicht in juxtakriner Weise wirken kann [247]. Die Abwesenheit von löslichem EGF lässt vermuten, dass die EGF-basierte Induktion des EGFR-Signalweges in den verwendeten Magenkarzinom-Zelllinien keine bzw. nur eine geringe Rolle spielt. Jedoch wurde in unterschiedlichen Versuchen gezeigt, dass sowohl die EGFR-Aktivierung als auch die Motilität und Invasion durch exogene EGF-Stimulation verstärkt wird.

Das beschriebene Modell wurde durch drei weitere Magenkarzinom-Zelllinien, KATOIII, MKN28 und MKN45, verifiziert. Die Cetuximab-Sensitivität von MKN28 Zellen, sowie die Resistenz gegenüber Cetuximab von MKN45 und KATOIII Zellen [170] wurden durch dieses Modell bestätigt. Keine dieser Zelllinien hat eine *KRAS*-Mutation. In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich gezeigt, dass MET in den Cetuximab-resistenten Zelllinien KATOIII und MKN45, jedoch nicht in MKN28 Zellen, aktiviert ist [170]. In MKN28 wurde ein hohes Level an sekretiertem AREG gemessen, was zur Einteilung als Cetuximab-sensitive Zelllinie führte. Hingegen konnte keine AREG-Sekretion von MKN45 Zellen nachgewiesen werden. Trotz der hohen AREG-Sekretion, wurden KATOIII Zellen aufgrund der erhöhten MET-Aktivierung als Cetuximab-resistente Zellen eingeteilt [185].

An dieser Stelle wird der Vorteil eines Modelles mit mehreren Biomarkern zur Bestimmung der Cetuximab-Sensitivität, im Gegensatz zu einem einzelnen Marker, deutlich. Um Magenkarzinom-Zelllinien nach ihrer Cetuximab-Sensitivität korrekt zu klassifizieren, wird das in dieser Arbeit vorgestellte Modell mit etablierter Hierarchie empfohlen.

Auch wenn Zellkulturmodelle zu einfach sind um die komplexe *in vivo* Situation in Patienten nachzustellen, glauben wir als Arbeitsgruppe, die mit Zellkulturmodellen arbeitet doch, dass die Einbeziehung einer großen Anzahl an Zelllinien sowie eine akkurat durchgeführte Statistik eine Hypothesenbildung zulassen, die als Grundlage für weitere klinische Studien dienen kann.

Das prädiktive Potential der Marker kann nur in klinischen Studien verifiziert werden. Die Methoden dafür sind für die hier bestimmten potentiellen Biomarker für Patientenmaterial verfügbar. KRAS-Mutationen können durch Sequenzierung bestimmt werden, die Aktivierung von MET kann durch Immunhistologie nachgewiesen werden und die Sekretion von AREG ist durch ELISA-Analysen detektierbar.

4.3.2 Assoziation des Bewegungsverhaltens der Magenkarzinom-Zelllinien mit proteomischen Änderungen im EGFR-Signalweg

Da der EGFR-Signalweg und dessen nachgeschaltete Signalwegsmoleküle eine wichtige Rolle in der Induktion von Migrations- und Invasionssignalen spielen [19, 204], wurden Magenkarzinom-Zelllinien mit EGF und/oder Cetuximab behandelt, die Aktivierung von EGFR, AKT und MAPK durch Western Blot Analysen unter Vollmediumbedingungen (siehe Abbildung 13 und Abbildung 15) analysiert und mit dem Bewegungsverhalten der Zellen verknüpft.

EGF induzierte eine starke Phosphorylierung von EGFR in MKN1 Zellen, wohingegen in Hs746T Zellen aufgrund der konstitutiven Aktivierung eine nur geringe Aktivierung des EGFR detektiert wurde. Außerdem wurde die MAPK durch EGF-Behandlung in MKN1 Zellen stark aktiviert, während nur ein leichter Anstieg der AKT-Aktivierung nach EGF-Behandlung nachgewiesen wurde. In Hs746T Zellen führte weder eine EGF- noch Cetuximab-Behandlung zu Änderungen der Aktivierung von MAPK oder AKT. Nach EGF-Behandlung war das Bewegungsverhalten bei fast allen untersuchten Zelllinien, bis auf Hs746T Zellen, identisch; sowohl die Rate motiler Zellen als auch die durchschnittliche Geschwindigkeit stiegen nach EGF-Behandlung an.

Cetuximab reduzierte die EGF-induzierte Aktivierung von Signalwegsmolekülen in MKN1 Zellen in folgender Weise: bei EGFR und MAPK stark, bei AKT nur sehr gering. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe gemacht, bei denen der EGFR und dessen nachgeschaltete Signalwege mit 1 nM EGF in Zungen-Plattenepithelkarzinom-Zellen stimuliert wurden. Eine Stimulation mit EGF führte zur schnellen Phosphorylierung des EGFR (Y1173) mit einer Maximalaktivierung nach dreiminütiger EGF-Stimulation. Die maximale Aktivierung von MAPK und AKT war nach 3 - 5 min erreicht, die stärkste p38 Aktivierung nach 10 min. Nach diesen

Maxima nahm die Aktivierung der verschiedenen Signalmoleküle stufenweise ab. Cetuximab hob die EGF-induzierte Phosphorylierung von EGFR, MAPK und AKT auf [233].

Bei Hs746T Zellen wurden nur geringe, statistisch nicht signifikante Unterschiede der Aktivierungsniveaus der verschiedenen Signalmoleküle detektiert. So wurde geschlossen, dass die Hemmung der Signalweiterleitung durch Cetuximab in der Cetuximab-sensitiven Zelllinie MKN1 v.a. den MAPK-Signalweg betrifft, während AKT weniger stark betroffen ist. MKN1 Zellen besitzen eine Mutation in *PIK3CA* (c.163G>A, p.E545K) [187]. Diese E545K Mutation resultiert in einer Aminosäuren Substitution an Position 545 in *PIK3CA* von Glutaminsäure (E) zu Lysin (K). Mutierte *PIK3CA* Proteine zeigen eine erhöhte katalytische Aktivität, die zu verstärkter Signalweitergabe an nachgeschaltete Signalwege sowie *in vitro* zu onkogener Transformation führt. Diese Mutation führt in MKN1 zu einer konstitutiven Aktivierung von PI3K [257]. Die Aktivierung von AKT wurde in MKN1 Zellen weder durch EGF- noch durch Cetuximab-Behandlung reguliert, dennoch wurde in dieser Arbeit eine teilweise Hemmung der Motilität von MKN1 Zellen durch Cetuximab detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass die Bewegung der Zellen nicht alleine über den PI3K/PKB-AKT-Signalweg reguliert wird.

Interessanterweise wurde für die Zelllinien MKN1 und Hs746T eine Korrelation der EGFR- und MAPK-Aktivierung mit dem Bewegungsverhalten festgestellt. So sprachen MKN1 Zellen sowohl auf Proteinebene (EGFR- und MAPK-Aktivierung) als auch auf phänotypischer Ebene auf EGF und Cetuximab an, wohingegen Hs746T Zellen auf beiden Ebenen nicht ansprachen.

Um den Effekt von EGF und Cetuximab auf den EGFR-Signalweg detaillierter zu betrachten, wurde in der Arbeitsgruppe eine *Proteome Profiler* Analyse mit den Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 durchgeführt. Hierfür wurden serumdeprivierte Zellen 4 h mit 30 ng/ml EGF und/oder 1 µg/ml Cetuximab behandelt. Proteine, deren Phosphorylierung nach EGF-Behandlung anstieg und durch zusätzliches Cetuximab wieder reduziert wurde, wurden als *Responder* definiert. Im Detail sind die Ergebnisse in *Keller und Kneißl et al., Manuskript in Vorbereitung*, beschrieben. Kurz zusammengefasst zeigte sich dabei folgendes:

Bezogen auf den MAPK-Signalweg wurde ein Anstieg der Phospho-Protein-Expression (pMEK1/2; pMAPK, pCREB) aufgrund einer EGF-Stimulation (5 ng/ml), sowie eine Expressionsminderung durch Cetuximab (1 µg/ml) in MKN1 Zellen, aber nicht in Hs746T, AGS, AZ521 und LMSU Zellen, detektiert. Auch in Western Blot Analysen wurden, wie oben bereits erwähnt, MKN1 Zellen als *Responder* und Hs746T Zellen als *Non-Responder* bezüglich der MAPK-Aktivierung definiert, was durch die *Proteome Profiler* Analyse ein weiteres mal bestätigt wurde.

Durch eine Cetuximab-Behandlung wurden in Hs746T Zellen, aber nicht in AGS, AZ521, LMSU und MKN1 Zellen, die Phospho-Protein-Level mehrerer Mitglieder der Src-Familie (pSrc, pFyn, pLyn, pYes und pHck) erhöht.

Außerdem wurde beobachtet, dass in den Zelllinien MKN1 und Hs746T die Phosphorylierung von FAK, PTK2B und Paxillin durch EGF gesteigert wurden. Jedoch wurde nur für Paxillin eine

Reduktion der Phosphorylierung nach zusätzlicher Cetuximab-Behandlung in MKN1 Zellen, jedoch nicht in Hs746T Zellen detektiert. Eine Cetuximab-Behandlung resultierte in Hs746T Zellen in einem deutlichen Anstieg der PTK2B-Phosphorylierung.

Interessanterweise wurden FAK, PTK2B, Paxillin, sowie die Mitglieder der Src-Familie als wichtige Regulatoren der Zellmigration beschrieben [258] [259] [260].

Für einige der hier analysierten Zelllinien wurden molekulare, den EGFR-Signalweg betreffende Charakteristika beschrieben. So weist die Zelllinie Hs746T eine *single nucleotide variation* (SNV) im *MAP3K15* Gen auf [217]. In MKN1 Zellen liegt eine Mutation in *MAPK9* vor [217]. *MAPK9/JNK2* ist von speziellem Interesse, da eine Cetuximab-Behandlung zu einer starken Phosphorylierung von *JNK2* in SCCHN-Zellen führte [261]. Das Phosphorylierungsprofil von *JNK* deutete in unseren Versuchen jedoch auf einen typischen *Responder* hin, d.h. durch EGF-Behandlung stieg die *JNK*-Aktivität und durch zusätzliches Cetuximab sank diese wieder ab. Entweder wurde das atypische *JNK2*-Phosphorylierungsprofil durch die Phosphorylierung anderer *JNK2*-Proteine maskiert oder die in den Zelllinien vorliegende SNV ist für die Phosphorylierung des Proteins in Bezug auf EGF- und Cetuximab-Behandlung irrelevant.

KRAS dient als Prädiktor der Cetuximab-Sensitivität in Kolorektalkarzinomen [129], wodurch genetische Veränderungen im *KRAS*-Gen auch für die Cetuximab-Therapie beim Magenkarzinom interessant sein könnten. In der Magenkarzinom-Zelllinie MKN1 ist *KRAS* amplifiziert [262] und in AGS Zellen liegt eine aktivierende Mutation in *KRAS* (G12D) vor [263]. Im Gegensatz zu Kolorektalkarzinomen treten *KRAS*-Mutationen in Magenkarzinomen nur sehr selten (in ca. 5 % der Tumoren) auf [244]. *KRAS*-Amplifikationen treten in ca. 9 % der Magenkarzinome auf [264]. Bei Kolorektalkarzinomen werden *KRAS*-Amplifikationen mit einer Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitor-Therapeutika, wie z.B. Cetuximab, assoziiert [265]. Für die Magenkarzinom-Zelllinie MKN1 wurde dies nicht bestätigt; diese weist eine *KRAS*-Amplifikation auf [262], ist aber Cetuximab-sensitiv.

Wie zuvor beschrieben, sind AGS Zellen bezüglich der Zellproliferation resistent gegenüber Cetuximab [185]. Interessanterweise steigt die durchschnittliche Geschwindigkeit von AGS Zellen jedoch durch EGF an und wird durch zusätzliches Cetuximab reduziert. Dies weist daraufhin, dass die Zellmigration unabhängig von *KRAS* reguliert wird, wohingegen die Zellproliferation durch *KRAS* jedoch stark beeinflusst wird.

Zusammenfassend deuten unsere Versuche daraufhin, dass *KRAS*-Amplifikationen und *KRAS*-Mutationen für die Vorhersage des Ansprechens auf eine Cetuximab-Therapie in Magenkarzinom-Zellen von untergeordneter Bedeutung zu sein scheinen.

AZ521 Zellen, die mit EGF behandelt wurden, zeigten eine Steigerung der durchschnittlichen Geschwindigkeit sowie der Motilitätsrate, jedoch führte eine Cetuximab-Behandlung nur zu einer teilweisen und nicht konzentrationsabhängigen Reduktion der Bewegungsparameter in AZ521 Zellen. Die EGFR-Aktivierung stieg nach dreiminütiger EGF-Behandlung an und wurde durch zusätzliches Cetuximab gehemmt. Aufgrund der proteomischen Ergebnisse sowie der Ergebnisse aus dem

Proliferationstest wäre die Zelllinie AZ521 als Cetuximab-sensitiv zu definieren. Allerdings zeigt sie keine konzentrationsabhängige Reduktion der Motilität und Geschwindigkeit. Da AZ521 Zellen einen sehr geringen Anteil motiler Zellen sowie eine geringe Geschwindigkeit aufweisen, ist die verwendete Matrix eventuell nicht geeignet für die Analyse der Bewegungsparameter der AZ521 Zellen. In weiteren Versuchen müssten noch zusätzlich zu den bereits getesteten Matrices Kollagen I, Vitronektin sowie Fibronektin, weitere Matrices wie Laminin oder Matrigel getestet werden, um die Zelllinie AZ521 beweglicher zu bekommen.

LMSU Zellen wiesen auf Proteom-Ebene sowohl einen Anstieg der EGFR-Aktivität nach dreiminütiger Behandlung mit EGF als auch eine Reduktion durch Cetuximab-Behandlung auf. Bei den Bewegungsparametern Motilität und durchschnittliche Geschwindigkeit wurde für LMSU Zellen eine EGF-Sensitivität, jedoch keine konzentrationsabhängige Cetuximab-Sensitivität detektiert. Im Proliferationstest wiesen LMSU Zellen eine leichte Reduktion nach 200 µg/ml Cetuximab auf, diese war jedoch nicht signifikant.

Für AGS, AZ521 und LMSU Zellen liegen keine zeitaufgelösten Daten für die MAPK- und AKT-Aktivierung vor. Diese wurden nur für die Zelllinien Hs746T und MKN1 erhoben. Jedoch wurde die in der Arbeitsgruppe durchgeführte *Proteome Profiler* Analyse auch für diese Zelllinien durchgeführt. Hierbei reagierten alle Zelllinien bezüglich der MAPK-Aktivität auf eine EGF-Behandlung und ebenso leicht auf eine Cetuximab-Behandlung. Für die *Proteome Profiler* Analyse wurden die Zellen 4 h mit EGF und/oder Cetuximab behandelt, außerdem wurde die Analyse nur einmal durchgeführt, sodass eventuelle technische Unregelmäßigkeiten nicht detektiert wurden und die Ergebnisse nicht validiert werden konnten.

4.3.3 Zusammenfassung und Konklusion 3

Um Magenkarzinom-Zelllinien nach ihrer Cetuximab-Sensitivität korrekt zu klassifizieren, wird das in dieser Arbeit vorgestellte hierarchische Modell empfohlen. In dem verwendeten Panel aus fünf Magenkarzinom-Zelllinien war die Cetuximab-Sensitivität von AZ521 und MKN1 Zellen mit der AREG-Expression sowie -Sekretion assoziiert. Die Cetuximab-Resistenz von AGS Zellen wurde v.a. auf die aktivierende *KRAS*-Mutation zurückgeführt [170]. Als Grund für die Insensitivität von Hs746T Zellen gegenüber Cetuximab wurde die starke Aktivierung von MET, ausgelöst durch eine *Splice Site* Mutation in *cMET*, angesehen. Eine Assoziation der MET-Aktivierung mit einer Cetuximab-Resistenz wurde bereits in vielen Studien beschrieben [170, 245, 246]. Der Grund für die Cetuximab-Resistenz von LMSU Zellen ist bisher noch unbekannt. Bei der Validierung des Modells durch drei weitere Magenkarzinom-Zelllinien wurden MKN45 und KATOIII aufgrund der hohen MET-Aktivierung als Cetuximab-resistent eingeteilt; MKN28 Zellen, die AREG sekretieren, als Cetuximab-sensitiv. Es wurde deutlich, dass nicht ein alleiniger Biomarker für die Bestimmung der Cetuximab-Sensitivität

herangezogen werden kann, sondern dass Modelle mit mehreren Biomarkern für die Einteilung der Sensitivität gegenüber Medikamenten notwendig sind.

In Kapitel 4.2 wurde bereits gezeigt, dass Cetuximab die Motilität, Geschwindigkeit und Invasivität von MKN1 Zellen, aber nicht von Hs746T Zellen reduziert. Außerdem wurde nachgewiesen, dass EGF das Bewegungs- und Invasionspotential von MKN1 Zellen erhöht, wohingegen durch EGF keine Auswirkungen auf Hs746T Zellen detektiert wurden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine EGF-induzierte EGFR-Aktivierung zu verstärkter Bildung von Zellfilamenten sowie zu erhöhter Motilität und Invasivität von MKN1 Zellen führte. Es wurde gezeigt, dass die durch den Proliferationstest als Cetuximab-sensitiv definierte Zelllinie MKN1, sowohl durch ihre phänotypischen Merkmale wie Motilität, Geschwindigkeit, Invasion und Migration als auch auf proteomischer Ebene hinsichtlich der EGFR- und MAPK-Aktivierung auf Cetuximab reagierte.

Die Zelllinie Hs746T zeigte geringe Änderungen nach EGF-Stimulation. Hs746T Zellen, die im Proliferationstest als Cetuximab-resistente Zellen eingestuft wurden, reagierten auch hinsichtlich ihrer phänotypischen und proteomischen Eigenschaften nicht auf eine Cetuximab-Behandlung.

AGS Zellen, die eine aktivierende *KRAS*-Mutation haben, sprachen auf Proliferationsebene nicht auf eine Cetuximab-Therapie an, hingegen wurde bei der Analyse der Geschwindigkeit eine Cetuximab-Sensitivität festgestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse bei der Proliferation und Bewegungsanalyse, sowie der Tatsache, dass *KRAS*-Mutationen nur selten in Magenkarzinomen auftreten, ist *KRAS* nach unseren Untersuchungen nicht als alleiniger Prädiktor der Cetuximab-Sensitivität in Magenkarzinom-Zellen geeignet. AZ521 und LMSU Zellen zeigten in der Motilitätsanalyse und Geschwindigkeitsuntersuchung keine Antwort auf eine Cetuximab-Behandlung und auch auf proteomischer Ebene wurden sie durch die *Proteome Profiler* Analyse als Cetuximab-resistente Zelllinien eingeteilt.

4.4 Validierung potentieller Biomarker für eine Cetuximab-Therapie in Magenkarzinom-Zelllinien

Es wurden zwei potentielle Biomarker bzw. mögliche Resistenz- oder *Response*-Faktoren zur Vorhersage der Cetuximab-Sensitivität untersucht. Einerseits ein Protein, das durch die im Verbundprojekt Cancermotisis durchgeführten Genexpressionsanalysen als möglicher Biomarker der Cetuximab-Sensitivität definiert wurde und andererseits ein Protein, das aufgrund von Literatur und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als potentieller Biomarker näher untersucht werden sollte.

PTK2B, ein Protein der FAK-Familie, das u.a. in die Regulation des Zytoskeletts involviert ist [258], wurde in den in diesem Projekt durchgeführten Genexpressionsanalysen als differenziell exprimiertes Gen detektiert und durch bioinformatische Analysen unserer Partner GenXPro GmbH und Biomax Informatics AG als möglicher Biomarker definiert.

E-Cadherin, ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das in ca. 50 % der diffusen Magenkarzinome mutiert ist [176], wurde aufgrund von Literaturhinweisen [159, 167, 170, 173, 266, 267] sowie Vorarbeiten der Arbeitsgruppe [170, 210] als möglicher Biomarker untersucht.

4.4.1 Einfluss von PTK2B und FAK auf das Bewegungsverhalten von MKN1 und Hs746T Zellen

Die systembiologischen Analysen im Verbundprojekt Cancermotisis hatten zum Ziel, eine Korrelation von phänotypischen und genotypischen Merkmalen herzustellen. Es sollten Genexpressionsmarker zur Vorhersage des therapeutischen Ansprechens auf eine Cetuximab-Therapie beim Magenkarzinom sowie potentielle Zielgene, die mit Tumorzell-Beweglichkeit assoziiert sind, identifiziert werden.

Für die Genexpressionsanalysen wurde von behandelten und unbehandelten AGS, Hs746T, LMSU und MKN1 Zellen Gesamt- und miRNA isoliert. Durch die GenXPro GmbH wurden mit diesen Proben Genexpressionsanalysen mittels SuperSAGE Analyse durchgeführt.

Um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, wurden Genexpressionsprofile anhand von definierten Bedingungen für potentielle Zielgene (siehe 3.4.1) erstellt. Bezogen auf die Cetuximab-sensitive Zelllinie MKN1 und die Cetuximab-resistenten Hs746T Zellen ist eines dieser differenziell exprimierten Gene PTK2B. PTK2B wurde durch den Kinase-Inhibitor PF431396 geblockt und anschließend auf Veränderungen der Proteinexpression und -aktivierung sowie des Bewegungsverhaltens untersucht. Da PTK2B auch in einer *Proteome Profiler* Analyse der Arbeitsgruppe (Daten nicht gezeigt, Keller und Kneißl et al., *Manuskript in Vorbereitung*) durch EGF- und Cetuximab-reguliert wurde, wurden die Familienmitglieder PTK2B und FAK weiteruntersucht.

4.4.1.1 PTK2B und FAK inhibieren die Motilität von Cetuximab-sensitiven MKN1 Zellen

Die Motilität und Geschwindigkeit von MKN1 Zellen nahm sowohl unter Cetuximab- als auch PF431396-Behandlung ab. Durch Kombination von Cetuximab mit PF431396 wurde ein additiver Effekt ausgelöst, der zu einer stärkeren Reduktion führte. In Bezug auf die Geschwindigkeit konnte kein Synergismus festgestellt werden, allerdings wurde hierbei deutlich, dass der Inhibitor eine größere Auswirkung auf die Reduktion der Geschwindigkeit hat als Cetuximab.

Im Vergleich zu MKN1 Zellen wurden bei Hs746T Zellen keine bis nur sehr schwache Effekte durch Cetuximab- und/oder PF431396-Behandlungen in Bezug auf die Motilität detektiert. Die Geschwindigkeit wurde durch PF431396-Behandlung auch in Hs746T Zellen reduziert.

Da der Inhibitor PF431396 mehrere Proteine der FAK-Familie inhibiert, wurden die Expression und Aktivierung von PTK2B sowie FAK analysiert.

Bei der Untersuchung der Expression und Aktivierung von PTK2B und FAK nach Stimulation mit PF431396 und/oder Cetuximab in MKN1 Zellen wurde keine starke Regulation nach zwei gemessenen Stimulationszeiten (4 und 7 h) detektiert. Weder die PTK2B-Expression noch die Aktivierung zeigten nach vierstündiger Stimulation signifikante Änderungen. Nach 7 h kam es zu einem Anstieg sowohl der Expression als auch der Aktivierung der PTK2B, wohingegen die FAK-Expression nach siebenstündiger Stimulation mit PF431396 und in Kombination mit Cetuximab reduziert war. Die FAK-Aktivierung stieg nach siebenstündiger Stimulation mit Cetuximab und/oder PF431396 im Vergleich zur vierstündigen Behandlung an.

Die Funktion von FAK in gesunden Zellen ist die Signaltransduktion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die unterschiedliche Signalwege regulieren. Bisher gibt es keine Kenntnisse darüber, dass FAK in Tumoren mutiert ist, aber es wurde in einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine Überexpression von FAK negativ mit dem Überleben von Patienten korrelierte und mit erhöhter Zellmigration, Invasion und Metastasierung assoziiert war [268]. Erhöhte FAK-Expression wurde in unterschiedlichen epithelialen Tumoren, wie hepatozellulären Tumoren, Lungentumoren, Oesophaguskarzinomen oder Ovarialkarzinomen, nachgewiesen [268-274]. PTK2B ist eine Tyrosinkinase die durch Autophosphorylierung an Y402 aktiviert wird. Diese Phosphorylierung dient der SH2-Domäne von Src als Bindestelle [275]. Die Funktion von PTK2B in der Tumorgenese ist bisher noch ungeklärt, es ist jedoch bekannt, dass PTK2B in viele zelluläre Prozesse involviert ist, wie Zellproliferation und Migration [268]. Eine Überexpression von PTK2B in Leberzellkarzinom-Zellen förderte die Aktivierung von c-Src, die Bildung des c-Src/PTK2B Komplexes und die Aktivierung des MAPK-Signalwegs, was schließlich die Proliferation und Invasivität förderte [276].

In den hier gezeigten Untersuchungen wird deutlich, dass bei MKN1 Zellen eine Inhibition der Motilität und Geschwindigkeit durch Cetuximab und den FAK-Familien-Inhibitor PF431396 möglich war. Hs746T Zellen sprachen in Bezug auf die Motilität nicht auf den Inhibitor an. Dies liegt

vermutlich an der *MET*-Amplifikation von Hs746T Zellen. In Medulloblastom-Zellen wurde gezeigt, dass *MET* die Phosphorylierung von FAK und PTK2B induziert. Außerdem wurde gezeigt, dass aktiviertes FAK und PTK2B die Zellproliferation, Migration und Invasion erhöhen. Diese Induktion konnte durch die Kombination eines *MET*- und FAK-Inhibitors stärker gehemmt werden als durch die Verwendung eines einzelnen Inhibitors [277]. Da *MET* in der Zelllinie Hs746T amplifiziert ist, wird vermutet, dass die alleinige Inhibition von FAK aufgrund der starken Überexpression von *MET* nicht erfolgreich ist.

Jedoch wurde in einer *Proteome Profiler* Analyse, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, ein deutlicher Anstieg der PTK2B-Phosphorylierung durch Cetuximab-Behandlung in Hs746T Zellen detektiert, ebenso wie ein Anstieg der Phosphorylierungen mancher Src-Familienmitglieder. Außerdem wurde in der *Proteome Profiler* Analyse beobachtet, dass in den Zelllinien MKN1 und Hs746T die Phosphorylierung von FAK, PTK2B und Paxillin durch EGF gesteigert wurden. Jedoch wurde nur für Paxillin eine Reduktion der Phosphorylierung nach zusätzlicher Cetuximab-Behandlung in MKN1 Zellen - jedoch nicht in Hs746T Zellen - detektiert. Eine Cetuximab-Behandlung resultierte in Hs746T Zellen in einem deutlichen Anstieg der PTK2B-Phosphorylierung. Interessanterweise wurden FAK, PTK2B, Paxillin, sowie die Mitglieder der Src-Familie als wichtige Regulatoren der Zellmigration beschrieben [258] [259] [260].

In NSCLC-Zellen mit erworbener Cetuximab-Resistenz wurde eine erhöhte Aktivierung von Src-Proteinen beschrieben. Eine Co-Behandlung mit dem Src-Inhibitor Dasatinib resultierte in einer Resensitivierung gegenüber Cetuximab [278]. Für Pankreaskarzinom-Zellen wurde, bezogen auf eine Kombinationsbehandlung mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib und Dasatinib, ein synergistischer inhibitorischer Effekt beschrieben [279]. Aus diesen Gründen könnte die Aktivierung unterschiedlicher Src-Kinasen infolge einer Cetuximab-Behandlung auch in Magenkarzinom-Zellen einen Resistenzfaktor gegen Cetuximab darstellen. Eine Kombinationsbehandlung mit Src-Kinase-Inhibitoren und Cetuximab könnte somit als Therapieansatz bei Magenkarzinomen eine vielversprechende Möglichkeit bieten.

In einer bisher ersten Phase I Studie mit selektiven Komponenten gegen FAK und PTK2B wurde die Sicherheit, Pharmakokinetik sowie Pharmakodynamik eines FAK- und PTK2B-Inhibitors (PF-00562271) analysiert. Die Autoren befürworteten weitere klinische Untersuchungen von FAK-Inhibitoren als Mono- oder Kombinationstherapien für die Behandlung maligner Tumoren [280].

Da viele Faktoren - wie bspw. Src - auf die Regulation der FAK- und PTK2B-Aktivierung einwirken, muss die Proteinebene weiter untersucht werden, um Aussagen über Veränderungen der Expression und Aktivierung treffen zu können. Neben RNAi-Experimenten, durch die gezielt PTK2B oder FAK herunterreguliert werden, wird vorgeschlagen, auch die diversen Mitglieder der Src-Familie nach Inhibition der FAK-Familienmitglieder auf Proteomebene zu analysieren, um die Mechanismen, die hinter der eindeutig erkennbaren Inhibition der Geschwindigkeit und Motilität von MKN1, nicht aber von Hs746T Zellen stehen, zu verstehen.

PF431396 zeigte in diesem Projekt eine inhibierende Wirkung auf die Motilität und Geschwindigkeit von MKN1 Zellen. Überraschenderweise wurde jedoch kaum eine inhibierende Wirkung auf die Aktivierung von FAK und PTK2B auf Proteinebene detektiert. Han und Kollegen [281] zeigten, dass PF431396 in höheren Konzentrationen (3 μ M) die Aktivität von PTK2B und FAK zu fast 100 % inhibierte. Außerdem wurde gezeigt, dass 10 μ M des Kinase-Inhibitors PF431396 weitere Kinasen, wie z.B. MAPK (ERK2) und JAK3 zu ca. 90 % und EGFR um ca. 40 - 50 % inhibierte. Die in diesem Projekt gezeigten Untersuchungen müssen in weiteren Projekten auf Proteomebene um proteomische Analysen der EGFR- und MAPK-Aktivität unter PF431396-Behandlung erweitert werden, um detaillierte Hinweise zu bekommen, welche Proteine in den untersuchten Magenkarzinom-Zelllinien für die Reduktion der Bewegung unter PF431396-Behandlung verantwortlich sind.

Durch die Genexpressionsanalyse wurden viele differenziell exprimierte Gene und miRNAs identifiziert. In dieser Arbeit wurde nur eines der Gene stichpunktartig auf dessen Qualitäten als mögliches Therapieziel überprüft. Die Genexpressionsdaten bieten viel Potential um weitere potentielle Biomarker für das Therapieansprechen von Magenkarzinompatienten auf eine Cetuximab-Therapie durch Überprüfung und erweiterte Analysen zu identifizieren.

4.4.2 Einfluss von E-Cadherin auf intrazelluläre Vorgänge in Magenkarzinom-Zelllinien

In diesem Projekt wurde E-Cadherin als möglicher Biomarker für eine Cetuximab-Therapie in Magenkarzinom-Zellen untersucht. Hierfür wurden der Zusammenhang zwischen E-Cadherin und dem EGFR und dessen Signalweg, sowie der modulierende Effekt von E-Cadherin auf den EGFR analysiert. Dazu wurden drei E-Cadherin exprimierende Magenkarzinom-Zelllinien umfassend untersucht. Die untersuchten Zelllinien unterschieden sich stark in ihrem Differenzierungsgrad und der E-Cadherin-Expression. Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, exprimieren MKN28 Zellen WT E-Cadherin, wohingegen die beiden Zelllinien des diffusen Typs, MKN45 und KATOIII, Mutationen in *CDH1* aufweisen [196]. In beiden Zelllinien liegen die Mutationen nah an der Exon/Intron Grenze und betreffen somit die regulären *splice sites*, wodurch anormale mRNAs gebildet werden. In MKN45 Zellen führt dies zu einer Aminosäuren Deletion, die die Calciumbindestelle beeinträchtigt. In KATOIII Zellen führt die G zu A Substitution der letzten 3' Nukleotide auf Exon 7 von *CDH1* zu einer Verkürzung des Proteins [196].

In ca. 50 % der diffusen Magenkarzinome treten inaktivierende Mutationen in *CDH1* auf [176]. Hauptsächlich sind diese Mutationen in einer sogenannten *Hotspot*-Region, in diesem Fall Exon 8-10, lokalisiert und betreffen oft die extrazellulären Calciumbindestellen [176, 177]. Diese Mutationen führen schließlich zu verminderter Adhäsion und zellulärer Beweglichkeit [177, 179-182], außerdem reduzieren sie die Wirkung von E-Cadherin als Tumorsuppressorgen [183]. Ein Mangel an E-Cadherin initiiert Magen-Siegelringzellkarzinome in Menschen und Mäusen [282].

In diesem Projekt wurde in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN28 die Expression des funktionellen E-Cadherin durch RNAi herunterreguliert und in zwei weiteren Zelllinien mit mutiertem funktionslosem E-Cadherin (MKN45 und KATO III) intaktes E-Cadherin eingeschleust. Die durch diese Modulation ergebnen Änderungen wurden hinsichtlich proteomischer Veränderungen im EGFR-Signalweg der Zelllinien charakterisiert um Schlussfolgerungen über E-Cadherin als potentiellen Biomarker für Cetuximab-Sensitivität von Magenkarzinom-Zelllinien zu ziehen.

4.4.2.1 Modulation der Zelllinien

Um den Einfluss von E-Cadherin zu untersuchen, mussten im ersten Schritt die Zelllinien modifiziert werden. Für die Transfektion der siRNA bzw. des *wt*-EcadEGFP-Plasmids wurde die Standard-Methode der transienten Lipo-Transfektion gewählt. Diese kann bei einer großen Anzahl an Zelllinien angewandt werden, weist eine hohe Transfektionseffizienz auf und die Zellen werden, im Gegensatz zu einer stabilen Transfektion, weniger stark beeinflusst [283, 284].

Die Überprüfung der Transfektionseffizienz ergab, dass transiente Transfektionen mit gegen E-Cadherin gerichteter siRNA in MKN28 Zellen nach 96 h eine maximale Expressionsminderung des

E-Cadherin-Proteins von durchschnittlich ca. 90 % erzielten. Trotz der Detektion einer geringen Expressionsminderung von E-Cadherin nach der Kontroll-Transfektion mit Negativkontroll-siRNA ist die Effizienz des *Knock-Downs* von E-Cadherin nach Subtraktion der Expressionsminderung der Kontrolle stark ausgeprägt. Weitere Analysen der Effizienz des *Knock-Downs* von E-Cadherin durch transiente Transfektion von siRNA in MKN28 ergaben nach 168 h siRNA-Inkubationszeit einen immer noch sehr deutlichen *Knock-Down* von ca. 90 % (Masterarbeit Marina Krummhaar, [285]).

In Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden keine morphologischen Veränderungen der für 48 h transfizierten Zellen detektiert. Transfizierte und nicht transfizierte Zellen wuchsen nach wie vor in großen Zellverbänden. Es zeigte sich lediglich eine verringerte Expression von E-Cadherin an Zell-Zell-Kontakten.

Die Effizienz der E-Cadherin Einschleusung durch Transfektion des *wt*-EcadEGFP-Plasmids in MKN45 und KATOIII wurde über 48 h Inkubationszeit analysiert und konnte über den gesamten Zeitraum nachgewiesen werden. In Immunfluoreszenz-Analysen wurde in transfizierten MKN45 und KATOIII Zellen das transfizierte an EGFP-gekoppelte E-Cadherin in ca. 90 % der Zellen detektiert.

Beim Nachweis der E-Cadherin-Expression in den Zelllinien MKN45 und KATOIII wurden bereits beschriebene Abbauprodukte von E-Cadherin mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa detektiert [286, 287].

Die Expression des Referenzproteins α -Tubulin wurde in mit *wt*-EcadEGFP-Plasmid transfizierten Zellen stark reguliert. Je länger die Transfektionszeit, desto schwächer wurde α -Tubulin exprimiert. Die Expression von GAPDH, einem weiteren *Housekeeping*-Protein, wurde hingegen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Als Bestandteil der Mikrotubuli ist α -Tubulin in das Zytoskelett eingebunden und für die Stabilität mitverantwortlich. E-Cadherin hingegen ist über die Bindung von β - und α -Catenin an das Aktinfilament an der Stabilität des Zytoskeletts beteiligt. Eventuell gibt es über diese Verbindung von α -Tubulin und E-Cadherin einen Regulationsmechanismus, der bei sehr starker, durch *wt*-EcadEGFP-Transfektion-bedingter, E-Cadherin-Überexpression die Expression von α -Tubulin reguliert. In weiteren Versuchen muss statt α -Tubulin GAPDH als Standard-*Housekeeping*-Protein verwendet werden. Die intrazellulären Vorgänge, die diese Regulation von α -Tubulin beeinflussen sind, meinem Wissen nach, noch unbekannt.

4.4.2.2 Proteomische Veränderungen in EGFR-Signalweg durch E-Cadherin

E-Cadherin spielt neben der Zelladhäsion auch eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung [288] und ist in der Lage die Aktivität von Tyrosinkinaserzeptoren von Epithelzellen zu modulieren. Es ist bekannt, dass E-Cadherin mit EGFR in einem Mehrkomponenten-Komplex interagiert, wobei es die Aktivierung des EGFR negativ beeinflusst [159]. Somatische Mutationen von E-Cadherin sind hingegen mit einer verstärkten EGFR-Aktivität assoziiert [208]. Die Interaktionen zwischen EGFR und E-Cadherin sind somit möglicherweise für die Tumorprogression und das Ansprechen auf

molekulare Therapien wichtig. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von E-Cadherin auf die Expression und Aktivierung des EGFR und nachgeschalteter Signalwegsmoleküle untersucht.

In MKN28 Zellen wurde funktionelles E-Cadherin durch RNAi herunterreguliert. Entgegen der Erwartung [159] konnte keine erhöhte Aktivierung des EGFR detektiert werden. Die Expression von pEGFR (Y1068) lag vielmehr an der Detektionsgrenze und konnte somit nicht analysiert werden. Die Zellen wurden 96 h mit siRNA transfiziert, was zu einem E-Cadherin *Knock-Down* um 90 % führte. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Phosphorylierungsstelle Y1068 des EGFR untersucht. Neben dieser gibt es noch weitere knapp 20 Tyrosinbindestellen, die nach Phosphorylierung und Bindung eines Adaptorproteins spezifische Signalwege regulieren [95].

In den Zelllinien MKN45 und KATOIII, die mit *wt*-EcadEGFP transfiziert wurden und die dadurch eine signifikant höhere E-Cadherin-Expression (gekoppelt an EGFP) aufwiesen, wurde der EGFR, wie erwartet [159, 208], weniger stark aktiviert. In der Zelllinie KATOIII war diese Differenz signifikant. Es zeigte sich, dass sich mutiertes E-Cadherin in Bezug auf die Aktivierung von EGFR anders verhält als herunterreguliertes WT E-Cadherin.

Während sich die Expression von pAKT (S473) in KATOIII Zellen nicht durch E-Cadherin-Expression beeinflussen ließ, stieg sie sowohl in MKN28 Zellen mit herunterreguliertem E-Cadherin als auch in MKN45 Zellen mit transfiziertem WT E-Cadherin leicht an. In der Annahme, dass herunterreguliertes bzw. mutiertes E-Cadherin in der Zelle zu einer erhöhten Aktivierung des EGFR führt, wodurch die nachgeschalteten Signalwege stärker aktiviert würden, wäre eine stärkere AKT-Aktivierung zu erwarten gewesen. Andererseits konnte bereits eine Aktivierung von AKT und MAPK durch die E-Cadherin-bedingte Zell-Zell-Adhäsion in der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR-3 nachgewiesen werden [289]. Außerdem ist bekannt, dass die E-Cadherin-vermittelte Bildung von *Adherens Junctions* zur schnellen PI3K-abhängigen Aktivierung von AKT führt [163]. Somit kann nicht alleine durch die Expression von E-Cadherin oder durch Mutationen in E-Cadherin auf die Aktivierung von AKT geschlossen werden.

4.4.2.3 Einfluss von E-Cadherin auf das Ansprechen auf Cetuximab

Eine Cetuximab-Behandlung führt in Cetuximab-sensitiven Zellen zur Internalisierung des EGFR und somit zu einer verminderten Proliferation [290]. In unterschiedlichen Zellkultur-Experimenten wurde gezeigt, dass die Expression von E-Cadherin für das Ansprechen auf eine Therapie, die gegen den EGFR gerichtet ist, wichtig ist.

In einer retrospektiven Untersuchung wurde eine E-Cadherin-Expression als Biomarker für die klinische Aktivität von Erlotinib in NSCLC-Patienten detektiert [291].

In NSCLC-Zelllinien waren sowohl eine geringe Expression von E-Cadherin sowie eine hohe Expression von Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor (u-PAR) mit einer Cetuximab-Resistenz assoziiert. Es wurde keine Assoziation mit EGFR detektiert [167]. Die Expression von

E-Cadherin diente als Prädiktor und beeinflusste das Ansprechen von NSCLC-Zelllinien auf den EGFR-Inhibitor Gefitinib [168]. NSCLC-Zelllinien mit geringer ErbB3- und E-Cadherin-Expression, die mit HDAC und EGFR-TKIs behandelt wurden, gingen in Apoptose [292]. Eine Analyse von zwölf humanen Hepatom-Zelllinien zeigte, dass epitheliale Zelllinien, die eine hohe E-Cadherin- und Vimentin-Expression aufwiesen, ein besseres Ansprechen auf Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab zeigten als mesenchymale Zelllinien [293]. In einer Studie mit elf Urothelialekarzinom-Zelllinien wurde gezeigt, dass eine E-Cadherin-Expression für das Ansprechen auf Cetuximab erforderlich war [166]. Die Expression von E-Cadherin, detektiert über Immunhistologie, scheint ein positiver Prädiktor einer Cetuximab-basierten Therapie in metastatischen Kolorektalkarzinomen zu sein. Außerdem wiesen die Autoren darauf hin, dass die Kombination von E-Cadherin-Immunhistologie mit einer *KRAS*-Analyse einen sensitiveren Biomarker darstellte als die alleinige *KRAS*-Analyse [169].

In der Arbeitsgruppe wurde die Cetuximab-Sensitivität von MKN28, MKN45 und KATOIII Zellen untersucht (Daten nicht gezeigt, Masterarbeit Bernadette Mühlthaler [209]). Dabei wurde die Cetuximab-Sensitivität von MKN28 Zellen sowie die Cetuximab-Resistenz von KATOIII und MKN45 Zellen bestätigt [170]. Zusätzlich wurde der Einfluss von E-Cadherin auf die Cetuximab-Sensitivität der Zelllinien analysiert. Dafür wurden MKN28 Zellen für 24 h mit gegen *CDH1*-gerichteter siRNA und MKN45 und KATOIII Zellen mit dem *wt*-EcadEGFP-Konstrukt transfiziert. Es konnten jedoch keine Rückschlüsse auf den Einfluss von E-Cadherin gezogen werden. Somit konnte die Assoziation von E-Cadherin-Expression mit dem therapeutischen Ansprechen auf EGFR-Inhibitoren [166-168, 291-293] in diversen Tumoren, für mit Cetuximab-behandelte Magenkarzinom-Zellen nicht bestätigt werden. Nichtsdestotrotz bleibt E-Cadherin, aufgrund der hohen Mutationsrate in Magenkarzinomen, ein potentieller Biomarker für die Therapie mit EGFR-Inhibitoren in Magenkarzinomen.

4.4.3 Zusammenfassung und Konklusion 4

Für die Validierung potentieller Biomarker wurde einerseits ein potentieller Biomarker, der aus Genexpressionsanalysen hervorging, untersucht: PTK2B aus der FAK-Familie; andererseits wurde ein aus Literatur und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe präselektierter potentieller Biomarker analysiert: E-Cadherin.

In den hier gezeigten Untersuchungen wird deutlich, dass in MKN1 Zellen durch Cetuximab und den Inhibitor von Mitgliedern der FAK-Familie PF431396 eine Inhibition der Motilität und Geschwindigkeit möglich war. Hs746T Zellen sprachen in Bezug auf die Motilität nicht auf den Inhibitor an. Dies liegt vermutlich an der *MET*-Amplifikation, so wird vermutet, dass die alleinige Inhibition von FAK-Familienmitgliedern aufgrund der starken Überexpression von *MET* nicht erfolgreich ist. Jedoch wurde in der *Proteome Profiler* Analyse ein deutlicher Anstieg der PTK2B-Phosphorylierung durch

Cetuximab-Behandlung in Hs746T Zellen, ebenso wie ein Anstieg der Phosphorylierung mancher Src-Familienmitglieder, detektiert. Durch andere Studien gibt es Hinweise darauf, dass Cetuximab-resistente Zellen eine erhöhte Aktivierung von Src-Proteinen aufweisen und durch Dasatinib resensitiviert werden. Aus diesen Gründen könnte die Aktivierung unterschiedlicher Src-Kinasen infolge einer Cetuximab-Behandlung auch in Magenkarzinom-Zellen einen Resistenzfaktor gegen Cetuximab darstellen. Eine Kombinationsbehandlung mit Src-Kinase-Inhibitoren und Cetuximab könnte somit als Therapie von Magenkarzinomen eine vielversprechende Möglichkeit bieten.

Ein weiteres Molekül, das auf seine Nutzung als Biomarker hin untersucht wurde, war E-Cadherin. Die Expression von E-Cadherin wurde in den Zelllinien MKN28, MKN45 und KATOIII erfolgreich moduliert. So konnte mit Zelllinien mit WT und mutiertem E-Cadherin sowie herunterreguliertem E-Cadherin gearbeitet werden. In den Zelllinien MKN45 und KATOIII, die beide eine Mutation in *CDH1* aufweisen, konnte die E-Cadherin-Expression durch Transfektion eines WT E-Cadherins deutlich gesteigert werden, gleichzeitig wurde die Aktivierung des EGFR reduziert. Diese Abschwächung der Aktivierung wurde auch in der nachgeschalteten MAPK detektiert, wohingegen E-Cadherin keinen Einfluss auf die Aktivierung von AKT zeigte. Der Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion ist Voraussetzung für die Tumorzellinvasion und somit für die Metastasenbildung [294]. Insgesamt zeigte sich, dass die Auswirkungen von mutiertem E-Cadherin nicht unbedingt denen von herunterreguliertem WT E-Cadherin entsprechen. Der Verlust von E-Cadherin wird in Tumorzellen mit der Überexpression mesenchymaler Cadherine assoziiert [295]. Dies resultiert in gesteigerter Motilität sowie Invasions- und Metastasierungsfähigkeit [296]. Für weitere Versuche soll ein größeres Panel an Magenkarzinom-Zelllinien verwendet werden um neben dem Einfluss von mutiertem und herunterreguliertem E-Cadherin auch eventuelle Unterschiede unterschiedlicher Mutationen analysieren zu können. Außerdem sollen neben weiteren proteomischen Analysen, in denen neben dem EGFR-Signalweg auch die Schlüsselmoleküle der Zelladhäsion und Zellbewegung untersucht werden, auch funktionelle Analysen, die die Bewegungs- und Invasionsfähigkeit der Zellen betreffen, detailliert analysiert werden.

Zusammenfassend wurde geschlossen, dass sowohl PTK2B als auch E-Cadherin als Biomarker für die Cetuximab-Sensitivität vielversprechend sind. Um die ersten Analysen und Hinweise dieser Arbeit zu stärken, sind weitere proteomische Analysen sowie funktionelle Analysen nötig.

5 SUMMARY und ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Summary

Gastric cancer is the fourth most frequent cancer and second most common cause of cancer-related mortality worldwide. In addition to surgical, chemotherapeutical and radiological therapy, molecular therapeutics are applied increasingly. For gastric cancer a monoclonal antibody that is directed against ErbB2, trastuzumab, is used for therapy of ErbB2-positive patients. Another monoclonal antibody that is directed against a further member of the ErbB-receptor family, the epidermal growth factor receptor (EGFR), is cetuximab. EGFR is a key regulator of cell proliferation and cell migration. Because of its tumor-specific overexpression EGFR constitutes an ideal target structure for selective tumor-intervention. EGFR-inhibitors are approved for the treatment of tumor-patients. In the first-line treatment of patients with advanced gastric tumors cetuximab in combination with chemotherapy did not show an additional benefit compared to chemotherapy alone. To select patients who may benefit from a cetuximab-therapy, biomarkers have to be identified.

In the present study the importance of EGFR-signaling for tumor cell migration and tumor therapy were analyzed on the proteomic and phenotypic levels in a cell culture model. The response to cetuximab was analyzed and biomarkers were defined to predict the response of gastric cancer cell lines to cetuximab therapy.

In the first part of the study five gastric cancer cell lines were characterized comprehensively with regard to the expression and activation of EGFR and downstream signaling components to determine the effect of cetuximab. Additional to determination of the sensitivity on the proliferation level the response was also analyzed via motility analyses. The cell line MKN1 turned out to be cetuximab-responsive in all proteomic and phenotypic analyses; in contrast, AGS, AZ521, Hs746T and LMSU cells were defined as cetuximab-resistant cell lines.

In the second part of the study different biomarkers were analyzed to predict cetuximab response in gastric cancer cell lines. A hierarchical model was established to predict cetuximab-response of eight gastric cancer cell lines. Thereby, mutations in the Kirsten-Ras gene (*KRAS*) and MET activation were associated with cetuximab resistance, whereas high expression and secretion levels of amphiregulin (AREG), an EGFR-binding ligand, were associated with cetuximab responsiveness.

Furthermore, two additional potential biomarkers for cetuximab-response were analyzed. PTK2B was identified by gene expression analyses as a potential biomarker and E-cadherin was selected as an interesting marker candidate on literature data and preliminary data of the group. First results show that PTK2B as well as E-cadherin are promising biomarker candidates. To characterize these molecules in detail, further proteomic and phenotypic analyses should be carried out in future projects.

5.2 Zusammenfassung

Das Magenkarzinom ist weltweit die vierthäufigste Krebsart und zweithäufigste krebsbedingte Todesursache. Neben der chirurgischen, chemotherapeutischen und strahlenbasierten Therapie, werden vermehrt molekulare Therapeutika wie beispielsweise Trastuzumab, ein gegen ErbB2-gerichteter Antikörper, eingesetzt. Ein anderer monoklonaler Antikörper der gegen ein weiteres ErbB-Rezeptor-Familien-Mitglied, den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR, gerichtet ist, ist Cetuximab. EGFR ist ein zentraler Regulator der Zellproliferation und Zellmigration und stellt aufgrund seiner tumorspezifischen Überexpression beim Magenkarzinom eine ideale Zielstruktur für eine selektive Tumorintervention dar. Inhibitoren des EGFR sind bereits für die Behandlung von Tumorpatienten zugelassen. In der Erstlinienbehandlung von Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen des Magens zeigte Cetuximab mit Chemotherapie in einer Phase III Studie keinen zusätzlichen Nutzen im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie. Um Patienten zu selektieren, die von einer Cetuximab-Therapie profitieren können, müssen Biomarker identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des EGFR-Signalwegs für Tumorzellmigration und Tumortherapie im Zellkultursystem auf proteomischer und phänotypischer Ebene analysiert. Es sollte das therapeutische Ansprechen auf Cetuximab untersucht werden sowie Biomarker, die ein Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie in Magenkarzinom-Zelllinien vorhersagen, identifiziert werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden fünf Magenkarzinom-Zelllinien umfassend hinsichtlich der Expression und Aktivierung von Signalkomponenten des EGFR-Signalwegs charakterisiert, um die Wirkung von Cetuximab zu beurteilen. Neben dieser proteomischen Charakterisierung wurden auf phänotypischer Ebene die Cetuximab-Sensitivität bzw. -Resistenz mittels Proliferationsanalysen sowie mittels umfangreicher Motilitätsanalysen untersucht. Die Zelllinie MKN1 stellte sich dabei sowohl in allen proteomischen als auch phänotypischen Analysen als Cetuximab-sensitive Zelllinie heraus; AGS, AZ521, Hs746T und LMSU Zellen zeigten hingegen eine Cetuximab-Resistenz.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden unterschiedliche Biomarker untersucht, die das Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie in Magenkarzinom-Zelllinien, vorhersagen könnten. Einerseits wurde ein hierarchisches Modell entwickelt, mit dem die Cetuximab-Sensitivität aller acht analysierten Magenkarzinom-Zelllinien vorhergesagt werden konnte. Dabei wurden Mutationen im Kirsten-Ras Gen (*KRAS*) und eine Aktivierung des Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptors MET mit einer Cetuximab-Resistenz assoziiert, wohingegen hohe Expressions- und Sekretionslevel des EGFR-Liganden Amphiregulin (AREG) mit Cetuximab-Sensitivität assoziiert wurden.

Außerdem wurden in dieser Arbeit zwei weitere potentielle Biomarker analysiert, die zur Vorhersage der Cetuximab-Sensitivität von Magenkarzinom-Zelllinien beitragen sollen. Hierbei wurde einerseits ein durch Genexpressionsanalysen identifizierter potentieller Biomarker, die Proteintyrosinkinase 2B (PTK2B), andererseits auch ein durch Literatur und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe präselektierter

potentieller Biomarker, das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, untersucht. Erste in dieser Arbeit durchgeführte Analysen zeigten, dass sowohl PTK2B als auch E-Cadherin als prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf Cetuximab vielversprechend sind. Damit diese potentiellen Biomarker später in klinischen Studien eingesetzt werden können, müssen sie in zukünftigen Projekten auf proteomischer sowie funktioneller Ebene weiter charakterisiert werden.

6 VERZEICHNISSE

6.1 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bundesamt S: **Todesursachen in Deutschland**; https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400117004.pdf?__blob=publicationFile. In., vol. 12. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt 2012.
2. Weinberg RA: **The biology of cancer** 2013.
3. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
4. Kinzler KW, Vogelstein B: **Lessons from hereditary colorectal cancer**. *Cell* 1996, **87**(2):159-170.
5. Vogelstein B, Kinzler KW: **The multistep nature of cancer**. *Trends Genet* 1993, **9**(4):138-141.
6. Boyd JA, Barrett JC: **Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis**. *Pharmacology & Therapeutics* 1990, **46**(3):469-486.
7. Pitot HC: **The molecular biology of carcinogenesis**. *Cancer* 1993, **72**(3 Suppl):962-970.
8. Knudson AG, Jr.: **Mutagenesis and embryonal carcinogenesis**. *Natl Cancer Inst Monogr* 1979(51):19-24.
9. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
10. Kassis J, Lauffenburger DA, Turner T, Wells A: **Tumor invasion as dysregulated cell motility**. *Semin Cancer Biol* 2001, **11**(2):105-117.
11. Gupta GP, Massague J: **Cancer metastasis: building a framework**. *Cell* 2006, **127**(4):679-695.
12. Hanahan D, Folkman J: **Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis**. *Cell* 1996, **86**(3):353-364.
13. Ridley AJ: **Rho GTPases and cell migration**. *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 15):2713-2722.
14. Coopman PJ, Bracke ME, Lissitzky JC, De Bruyne GK, Van Roy FM, Foidart JM, Mareel MM: **Influence of basement membrane molecules on directional migration of human breast cell lines in vitro**. *J Cell Sci* 1991, **98** (Pt 3):395-401.
15. Wells A, Grahovac J, Wheeler S, Ma B, Lauffenburger D: **Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis**. *Trends Pharmacol Sci* 2013, **34**(5):283-289.
16. Lauffenburger DA, Horwitz AF: **Cell migration: a physically integrated molecular process**. *Cell* 1996, **84**(3):359-369.
17. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J: **Endothelial cell migration during angiogenesis**. *Circ Res* 2007, **100**(6):782-794.
18. Wagener C, Müller O: **Molekulare Onkologie. Entstehung, progression, klinische Aspekte**, 3 edn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010.
19. Wells A, Kassis J, Solava J, Turner T, Lauffenburger DA: **Growth factor-induced cell motility in tumor invasion**. *Acta Oncol* 2002, **41**(2):124-130.
20. Friedl P, Wolf K: **Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms**. *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(5):362-374.
21. Condeelis J, Segall JE: **Intravital imaging of cell movement in tumours**. *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(12):921-930.
22. Friedl P, Alexander S: **Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity**. *Cell* 2011, **147**(5):992-1009.
23. Wells A: **Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility**. *Adv Cancer Res* 2000, **78**:31-101.
24. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P: **Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion**. *Nat Cell Biol* 2007, **9**(8):893-904.
25. Friedl P, Wolf K: **Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process**. *Cancer Metastasis Rev* 2009, **28**(1-2):129-135.
26. Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, Tahara E:

- Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas.** *Cancer Res* 1988, **48**(1):137-141.
27. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *Int J Cancer* 2010, **127**(12):2893-2917.
 28. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2011, **61**(2):69-90.
 29. RKI: **Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes Krebs in Deutschland 2007/2008.** Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV (Hrsg) 2012(8).
 30. Power DG, Kelsen DP, Shah MA: **Advanced gastric cancer--slow but steady progress.** *Cancer Treat Rev* 2010, **36**(5):384-392.
 31. Wang XQ, Terry PD, Yan H: **Review of salt consumption and stomach cancer risk: epidemiological and biological evidence.** *World J Gastroenterol* 2009, **15**(18):2204-2213.
 32. Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, Guilford P, Lambert R, Megraud F, Muñoz N, Powell SM, Rugge M, Sasako M *et al*: **Gastric Carcinoma.** Lyon Oxford: IARC Press ; Oxford University Press (distributor); 2000.
 33. Guggenheim DE, Shah MA: **Gastric cancer epidemiology and risk factors.** *J Surg Oncol* 2013, **107**(3):230-236.
 34. Marshall BJ, Warren JR: **Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.** *Lancet* 1984, **1**(8390):1311-1315.
 35. Warren RJ, Marshall B: **Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis** *The Lancet* 1983, **321**(8336):1273-1275.
 36. IARC WG: **Infection with Helicobacter pylori.** *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994, **61**:177-240.
 37. IARC WG: **Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens.** *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2012, **100**(Pt B):1-441.
 38. Bornschein J, Malfertheiner P: **Gastric carcinogenesis.** *Langenbecks Arch Surg* 2011, **396**(6):729-742.
 39. Correa P, Chen VW: **Gastric cancer.** *Cancer Surv* 1994, **19-20**:55-76.
 40. Junginger T, Hermanek P, Klimpfinger M: **Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts I;** 2002.
 41. Lamb A, Chen LF: **Role of the Helicobacter pylori-induced inflammatory response in the development of gastric cancer.** *J Cell Biochem* 2013, **114**(3):491-497.
 42. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T: **Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis.** *J Physiol Pharmacol* 2009, **60**(3):3-21.
 43. Gonzalez CA, Agudo A: **Carcinogenesis, prevention and early detection of gastric cancer: where we are and where we should go.** *Int J Cancer* 2012, **130**(4):745-753.
 44. Hatakeyama M: **SagA of CagA in Helicobacter pylori pathogenesis.** *Current Opinion in Microbiology* 2008, **11**(1):30-37.
 45. Peek RM, Jr.: **Orchestration of aberrant epithelial signaling by Helicobacter pylori CagA.** *Sci STKE* 2005, **2005**(277):pe14.
 46. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A: **Family history and the risk of stomach and colorectal cancer.** *Cancer* 1992, **70**(1):50-55.
 47. Vogiatzi P, Vindigni C, Roviello F, Renieri A, Giordano A: **Deciphering the underlying genetic and epigenetic events leading to gastric carcinogenesis.** *J Cell Physiol* 2007, **211**(2):287-295.
 48. Ebert MS, W.Engel, J., Janetschek M, Adam M, Schulz C, Vogelsang H, Schlitter AM, Esposito I, Schuhmacher C: **Magenkarzinom.** *Manual Gastrointestinale Tumoren* 2010, **8**.
 49. Ushijima T, Sasako M: **Focus on gastric cancer.** *Cancer Cell* 2004, **5**(2):121-125.

50. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Tricker KJ, Teare MD, Santibanez-Koref MF, Martin J, Birch JM, Evans DG: **An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53.** *J Med Genet* 1995, **32**(12):942-945.
51. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavitigian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE: **A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes.** *Nat Genet* 1996, **13**(1):117-119.
52. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE: **E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer.** *Nature* 1998, **392**(6674):402-405.
53. Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, Pinto E, Seruca R, Halling K *et al*: **Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin.** *Cancer Res* 1998, **58**(18):4086-4089.
54. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, Rajput A, Wiesner GL, Lindor NM, Burgart LJ *et al*: **E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer.** *Hum Mutat* 1999, **14**(3):249-255.
55. Oberhuber G, Stolte M: **Gastric polyps: an update of their pathology and biological significance.** *Virchows Arch* 2000, **437**(6):581-590.
56. Panani AD: **Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications.** *Cancer Lett* 2008, **266**(2):99-115.
57. Tahara E: **Genetic pathways of two types of gastric cancer.** *IARC Sci Publ* 2004(157):327-349.
58. Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Quintanilla-Martinez L, Reyes-Gutierrez E, Green D, Angeles-Angeles A, Busch R, Hermannstadter C, Nahrig J, Becker KF *et al*: **Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system.** *Mod Pathol* 2004, **17**(5):579-587.
59. Keller G, Hofler H, Becker KF: **Molecular medicine of gastric adenocarcinomas.** *Expert Rev Mol Med* 2005, **7**(17):1-13.
60. Lauren P: **The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification.** *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965, **64**:31-49.
61. Kelley JR, Duggan JM: **Gastric cancer epidemiology and risk factors.** *J Clin Epidemiol* 2003, **56**(1):1-9.
62. Ott K, Sendler A, Becker K, Dittler HJ, Helmberger H, Busch R, Kollmannsberger C, Siewert JR, Fink U: **Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, 5-FU, and leucovorin (PLF) in locally advanced gastric cancer: a prospective phase II study.** *Gastric Cancer* 2003, **6**(3):159-167.
63. Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de Braud F, Van Cutsem E: **Gastric cancer.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2009, **71**(2):127-164.
64. Rocken C: **[Ways to personalized medicine for gastric cancer].** *Pathologe* 2013, **34**(5):403-412.
65. Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder JD: **Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study.** *Ann Surg* 1998, **228**(4):449-461.
66. EMEA: http://www.emea.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf
67. Kelsen DP: **Adjuvant and neoadjuvant therapy for gastric cancer.** *Semin Oncol* 1996, **23**(3):379-389.
68. Lordick F, Siewert JR: **Recent advances in multimodal treatment**

- for gastric cancer: a review.** *Gastric Cancer* 2005, **8**(2):78-85.
69. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ *et al*: **Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer.** *N Engl J Med* 2006, **355**(1):11-20.
 70. Kang YK, Kang WK, Shin DB, Chen J, Xiong J, Wang J, Lichinitser M, Guan Z, Khasanov R, Zheng L *et al*: **Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial.** *Ann Oncol* 2009, **20**(4):666-673.
 71. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE: **Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(18):2903-2909.
 72. Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Pazdur R, Dumas P, Ajani JA: **Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer.** *Ann Surg* 1999, **229**(3):303-308.
 73. Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E *et al*: **Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(31):4991-4997.
 74. Kim JG, Chung HY, Yu W: **Recent advances in chemotherapy for advanced gastric cancer.** *World J Gastrointest Oncol* 2010, **2**(7):287-294.
 75. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T *et al*: **Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial.** *The Lancet* 2010, **376**(9742):687-697.
 76. Kim MA, Jung EJ, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH: **Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction.** *Hum Pathol* 2007, **38**(9):1386-1393.
 77. AMB: **Trastuzumab: Erweiterung der Zulassung für metastasiertes HER2-positives Magenkarzinom.** *Arzneimittelbrief* 2010, **44**(58).
 78. Lordick F, Kang YK, Chung HC, Salman P, Oh SC, Bodoky G, Kurteva G, Volovat C, Moiseyenko VM, Gorbunova V *et al*: **Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial.** *Lancet Oncol* 2013, **14**(6):490-499.
 79. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW: **Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling.** *Exp Cell Res* 2003, **284**(1):31-53.
 80. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd: **Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(17):8132-8136.
 81. Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW *et al*: **The Crystal Structure of a Truncated ErbB2 Ectodomain Reveals an Active Conformation, Poised to Interact with Other ErbB Receptors.** *Molecular Cell* 2003, **11**(2):495-505.
 82. Yarden Y, Sliwkowski MX: **Untangling the ErbB signalling network.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**(2):127-137.

83. Massague J, Pandiella A: **Membrane-anchored growth factors**. *Annu Rev Biochem* 1993, **62**:515-541.
84. Kochupurakkal BS, Harari D, Di-Segni A, Maik-Rachline G, Lyass L, Gur G, Kerber G, Citri A, Lavi S, Eilam R *et al*: **Epigen, the last ligand of ErbB receptors, reveals intricate relationships between affinity and mitogenicity**. *J Biol Chem* 2005, **280**(9):8503-8512.
85. Schlessinger J: **Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor**. *Cell* 2002, **110**(6):669-672.
86. Carpenter G, Cohen S: **Epidermal growth factor**. *Annu Rev Biochem* 1979, **48**:193-216.
87. Herbst RS: **Review of epidermal growth factor receptor biology**. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, **59**(2 Suppl):21-26.
88. Fiske WH, Threadgill D, Coffey RJ: **ERBBs in the gastrointestinal tract: recent progress and new perspectives**. *Exp Cell Res* 2009, **315**(4):583-601.
89. Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS: **Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor**. *Cell Signal* 2007, **19**(10):2013-2023.
90. Singh AB, Harris RC: **Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands**. *Cell Signal* 2005, **17**(10):1183-1193.
91. Lax I, Johnson A, Howk R, Sap J, Bellot F, Winkler M, Ullrich A, Vennstrom B, Schlessinger J, Givol D: **Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor alpha**. *Mol Cell Biol* 1988, **8**(5):1970-1978.
92. Lax I, Burgess WH, Bellot F, Ullrich A, Schlessinger J, Givol D: **Localization of a major receptor-binding domain for epidermal growth factor by affinity labeling**. *Mol Cell Biol* 1988, **8**(4):1831-1834.
93. Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ: **Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer**. *J Clin Oncol* 2008, **26**(10):1742-1751.
94. Ferguson KM: **Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation**. *Annu Rev Biophys* 2008, **37**:353-373.
95. Morandell S, Stasyk T, Skvortsov S, Ascher S, Huber LA: **Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network**. *Proteomics* 2008, **8**(21):4383-4401.
96. Casaletto JB, McClatchey AI: **Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer**. *Nat Rev Cancer* 2012, **12**(6):387-400.
97. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G: **All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired**. *J Biol Chem* 1996, **271**(9):5251-5257.
98. Waterman H, Yarden Y: **Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases**. *FEBS Lett* 2001, **490**(3):142-152.
99. Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y: **Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency**. *J Biol Chem* 1998, **273**(22):13819-13827.
100. Köstler WJ, Yarden Y: **Chapter 61 - The Epidermal Growth Factor Receptor Family**. In: *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*. edn. Edited by Ralph AB, Edward AD. San Diego: Academic Press; 2010: 435-441.
101. Harris RC, Chung E, Coffey RJ: **EGF receptor ligands**. *Experimental Cell Research* 2003, **284**(1):2-13.
102. Anklesaria P, Teixido J, Laiho M, Pierce JH, Greenberger JS, Massague J: **Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(9):3289-3293.
103. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE: **The ErbB signaling network: receptor heterodimeri-**

- zation in development and cancer. *EMBO J* 2000, **19**(13):3159-3167.
104. Roepstorff K, Grovdal L, Grandal M, Lerdrup M, van Deurs B: **Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer.** *Histochem Cell Biol* 2008, **129**(5):563-578.
 105. Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SL, Lerdrup M, Grovdal L, Willumsen BM, van Deurs B: **Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor.** *Traffic* 2009, **10**(8):1115-1127.
 106. Hynes NE, Lane HA: **ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(5):341-354.
 107. Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, Santiago Josef B, Todo FR, Baselga J, Arribas J: **Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation.** *EMBO J* 2006, **25**(13):3234-3244.
 108. Liu D, Ghiso JAA, Estrada Y, Ossowski L: **EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma.** *Cancer Cell* 2002, **1**(5):445-457.
 109. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM: **Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab.** *Cancer Cell* 2005, **7**(4):301-311.
 110. Lemmon MA, Schlessinger J: **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** *Cell* 2010, **141**(7):1117-1134.
 111. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y: **Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, **58**(3):903-913.
 112. Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ: **Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation.** *EMBO J* 1995, **14**(13):3136-3145.
 113. Schlessinger J, Bar-Sagi D: **Activation of Ras and other signaling pathways by receptor tyrosine kinases.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994, **59**:173-179.
 114. Soltoff SP, Cantley LC: **p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells.** *J Biol Chem* 1996, **271**(1):563-567.
 115. Dillon RL, White DE, Muller WJ: **The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer.** *Oncogene* 2007, **26**(9):1338-1345.
 116. Schlessinger J: **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** *Cell* 2000, **103**(2):211-225.
 117. Harari PM, Allen GW, Bonner JA: **Biology of interactions: anti-epidermal growth factor receptor agents.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(26):4057-4065.
 118. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A: **The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification.** *Endocr Relat Cancer* 2001, **8**(1):11-31.
 119. Arteaga CL: **Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?** *Oncologist* 2002, **7** Suppl 4:31-39.
 120. Holbro T, Civenni G, Hynes NE: **The ErbB receptors and their role in cancer progression.** *Exp Cell Res* 2003, **284**(1):99-110.
 121. Capdevila J, Elez E, Macarulla T, Ramos FJ, Ruiz-Echarri M, Tabernero J: **Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment.** *Cancer Treat Rev* 2009, **35**(4):354-363.
 122. Yamaguchi H, Chang SS, Hsu JL, Hung MC: **Signaling cross-talk in the resistance to HER family receptor targeted therapy.** *Oncogene* 2013.
 123. Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC: **Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells.** *J Biol Chem* 2000, **275**(12):8806-8811.
 124. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG: **Targeting MET as a strategy to overcome**

- crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors.** *Lancet Oncol* 2009, **10**(7):709-717.
125. Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F: **Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy.** *Clin Exp Immunol* 2009, **158**(1):1-9.
126. Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S: **Cetuximab: from bench to bedside.** *Curr Cancer Drug Targets* 2010, **10**(1):80-95.
127. Humblet Y: **Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours.** *Expert Opin Pharmacother* 2004, **5**(7):1621-1633.
128. Merck
<http://news.merck.de/N/0/0CC40FF7A26B9BF3C1257C470076B0E5/>
129. Ciardiello F, Tortora G: **EGFR antagonists in cancer treatment.** *N Engl J Med* 2008, **358**(11):1160-1174.
130. Lordick F, Luber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Woll E, Decker T, Endlicher E, Rothling N, Schuster T *et al*: **Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO).** *Br J Cancer* 2010, **102**(3):500-505.
131. Pinto C, Di Fabio F, Siena S, Cascinu S, Rojas Llimpe FL, Ceccarelli C, Mutri V, Giannetta L, Giaquinta S, Funaioli C *et al*: **Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study).** *Ann Oncol* 2007, **18**(3):510-517.
132. Pinto C, Di Fabio F, Barone C, Siena S, Falcone A, Cascinu S, Rojas Llimpe FL, Stella G, Schinzari G, Artale S *et al*: **Phase II study of cetuximab in combination with cisplatin and docetaxel in patients with untreated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (DOCETUX study).** *Br J Cancer* 2009, **101**(8):1261-1268.
133. Moehler M, Mueller A, Trarbach T, Lordick F, Seufferlein T, Kubicka S, Geissler M, Schwarz S, Galle PR, Kanzler S: **Cetuximab with irinotecan, folinic acid and 5-fluorouracil as first-line treatment in advanced gastroesophageal cancer: a prospective multi-center biomarker-oriented phase II study.** *Ann Oncol* 2011, **22**(6):1358-1366.
134. Kim C, Lee JL, Ryu MH, Chang HM, Kim TW, Lim HY, Kang HJ, Park YS, Ryoo BY, Kang YK: **A prospective phase II study of cetuximab in combination with XELOX (capecitabine and oxaliplatin) in patients with metastatic and/or recurrent advanced gastric cancer.** *Invest New Drugs* 2011, **29**(2):366-373.
135. Han SW, Oh DY, Im SA, Park SR, Lee KW, Song HS, Lee NS, Lee KH, Choi IS, Lee MH *et al*: **Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer.** *Br J Cancer* 2009, **100**(2):298-304.
136. Cavallaro U, Christofori G: **Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(2):118-132.
137. Gumbiner BM: **Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.** *Cell* 1996, **84**(3):345-357.
138. Nollet F, Kools P, van Roy F: **Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members.** *J Mol Biol* 2000, **299**(3):551-572.
139. Rojas AI, Ahmed AR: **Adhesion receptors in health and disease.** *Crit Rev Oral Biol Med* 1999, **10**(3):337-358.
140. Saito M, Tucker DK, Kohlhorst D, Niessen CM, Kowalczyk AP: **Classical and desmosomal cadherins at a glance.** *J Cell Sci* 2012, **125**(Pt 11):2547-2552.

141. Hulpiau P, van Roy F: **Molecular evolution of the cadherin superfamily.** *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**(2):349-369.
142. Takeichi M: **Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion.** *Annu Rev Biochem* 1990, **59**:237-252.
143. Nollet F, Berx G, van Roy F: **The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer.** *Mol Cell Biol Res Commun* 1999, **2**(2):77-85.
144. Grunwald GB, Bromberg RE, Crowley NJ, Lilien J: **Enzymatic dissection of embryonic cell adhesive mechanisms. II. Developmental regulation of an endogenous adhesive system in the chick neural retina.** *Dev Biol* 1981, **86**(2):327-338.
145. Takeichi M: **The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis.** *Development* 1988, **102**(4):639-655.
146. Cailliez F, Lavery R: **Cadherin mechanics and complexation: the importance of calcium binding.** *Biophys J* 2005, **89**(6):3895-3903.
147. Troyanovsky S: **Cadherin dimers in cell-cell adhesion.** *Eur J Cell Biol* 2005, **84**(2-3):225-233.
148. Gumbiner BM: **Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(8):622-634.
149. Cavallaro U, Dejana E: **Adhesion molecule signalling: not always a sticky business.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(3):189-197.
150. Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F: **Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**(20):6274-6277.
151. Gallin WJ, Edelman GM, Cunningham BA: **Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**(4):1038-1042.
152. Hyafil F, Morello D, Babinet C, Jacob F: **A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos.** *Cell* 1980, **21**(3):927-934.
153. Takeichi M: **Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins.** *J Cell Biol* 1977, **75**(2 Pt 1):464-474.
154. Bertolotti R, Rutishauser U, Edelman GM: **A cell surface molecule involved in aggregation of embryonic liver cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**(8):4831-4835.
155. Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS: **Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(19):8813-8817.
156. Meng W, Takeichi M: **Adherens junction: molecular architecture and regulation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, **1**(6):a002899.
157. Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR: **p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo.** *Oncogene* 1992, **7**(12):2439-2445.
158. Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R: **Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor.** *J Cell Biol* 1994, **127**(5):1375-1380.
159. Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR: **E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases.** *EMBO J* 2004, **23**(8):1739-1748.
160. Andl CD, Rustgi AK: **No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity.** *Cancer Biol Ther* 2005, **4**(1):28-31.
161. Fedor-Chaiken M, Hein PW, Stewart JC, Brackenbury R, Kinch MS: **E-cadherin binding modulates EGF receptor activation.** *Cell Commun Adhes* 2003, **10**(2):105-118.
162. Pece S, Gutkind JS: **Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors**

- upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* 2000, **275**(52):41227-41233.
163. Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS: **Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex.** *J Biol Chem* 1999, **274**(27):19347-19351.
164. Shen X, Kramer RH: **Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor.** *Am J Pathol* 2004, **165**(4):1315-1329.
165. Bryant DM, Stow JL: **The ins and outs of E-cadherin trafficking.** *Trends Cell Biol* 2004, **14**(8):427-434.
166. Black PC, Brown GA, Inamoto T, Shrader M, Arora A, Siefker-Radtke AO, Adam L, Theodorescu D, Wu X, Munsell MF *et al*: **Sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitor requires E-cadherin expression in urothelial carcinoma cells.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(5):1478-1486.
167. Nikolova DA, Asangani IA, Nelson LD, Hughes DP, Siwak DR, Mills GB, Harms A, Buchholz E, Pilz LR, Manegold C *et al*: **Cetuximab attenuates metastasis and u-PAR expression in non-small cell lung cancer: u-PAR and E-cadherin are novel biomarkers of cetuximab sensitivity.** *Cancer Res* 2009, **69**(6):2461-2470.
168. Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, Coldren CD, Hedman K, Ravdel L, Helfrich B, Dziadziuszko R, Chan DC, Sugita M *et al*: **Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines.** *Cancer Res* 2006, **66**(2):944-950.
169. Nakamoto K, Nagahara H, Maeda K, Noda E, Inoue T, Yashiro M, Nishiguchi Y, Ohira M, Hirakawa K: **Expression of E-cadherin and KRAS mutation may serve as biomarkers of cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer.** *Oncol Lett* 2013, **5**(4):1295-1300.
170. Heindl S, Eggenstein E, Keller S, Kneissl J, Keller G, Mutze K, Rauser S, Gasteiger G, Drexler I, Hapfelmeier A *et al*: **Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2012.
171. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: **A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.** *Nature* 1998, **392**(6672):190-193.
172. Beavon IR: **The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation.** *Eur J Cancer* 2000, **36**(13 Spec No):1607-1620.
173. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F: **E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers.** *EMBO J* 1995, **14**(24):6107-6115.
174. Berx G, Van Roy F: **The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression.** *Breast Cancer Res* 2001, **3**(5):289-293.
175. Takeichi M: **Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis.** *Curr Opin Cell Biol* 1993, **5**(5):806-811.
176. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H: **E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas.** *Cancer Res* 1994, **54**(14):3845-3852.
177. Handschuh G, Candidus S, Lubert B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Hofler H *et al*: **Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility.** *Oncogene* 1999, **18**(30):4301-4312.
178. Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F: **Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene.** *Hum Mutat* 1998, **12**(4):226-237.

179. Fuchs M, Hutzler P, Brunner I, Schlegel J, Mages J, Reuning U, Hapke S, Duyster J, Hirohashi S, Genda T *et al*: **Motility enhancement by tumor-derived mutant E-cadherin is sensitive to treatment with epidermal growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors.** *Exp Cell Res* 2002, **276**(2):129-141.
180. Fuchs M, Hutzler P, Handschuh G, Hermannstadter C, Brunner I, Hofler H, Lubber B: **Dynamics of cell adhesion and motility in living cells is altered by a single amino acid change in E-cadherin fused to enhanced green fluorescent protein.** *Cell Motil Cytoskeleton* 2004, **59**(1):50-61.
181. Fuchs M, Hermannstadter C, Specht K, Knyazev P, Ullrich A, Rosivatz E, Busch R, Hutzler P, Hofler H, Lubber B: **Effect of tumor-associated mutant E-cadherin variants with defects in exons 8 or 9 on matrix metalloproteinase 3.** *J Cell Physiol* 2005, **202**(3):805-813.
182. Handschuh G, Lubber B, Hutzler P, Hofler H, Becker KF: **Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences.** *J Mol Biol* 2001, **314**(3):445-454.
183. Kremer M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs M, Gamboa-Dominguez A, Haye S, Kalthoff H, Rosivatz E, Hermannstadter C, Busch R, Hofler H *et al*: **Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis.** *Carcinogenesis* 2003, **24**(12):1879-1886.
184. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.
185. Kneissl J, Keller S, Lorber T, Heindl S, Keller G, Drexler I, Hapfelmeier A, Hofler H, Lubber B: **Association of amphiregulin with the cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines.** *Int J Oncol* 2012, **41**(2):733-744.
186. **AGS (ATCC® CRL-1739™)** [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1739.aspx?geo_country=de&slp=1]
187. Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Futreal PA, Stratton MR *et al*: **The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website.** *Br J Cancer* 2004, **91**(2):355-358.
188. Taki T, Ishikawa H, Imai K, Yachi A, Matsumoto M: **Immunological analysis of glycolipids on cell surfaces of cultured human tumor cell lines: expression of lactoneotetraosylceramide on tumor cell surfaces.** *J Biochem* 1985, **98**(4):887-895.
189. **Cell Information: JCRB0061 AZ-521: the problem of origin;** [http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?RNO=jcrb0061#]
190. Smith HS: **In vitro properties of epithelial cell lines established from human carcinomas and nonmalignant tissue.** *J Natl Cancer Inst* 1979, **62**(2):225-230.
191. **Datenblatt LMSU** [http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/detail.cgi?cell_no=RCB1062]
192. Motoyama T, Hojo H, Watanabe H: **Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas.** *Acta pathologica japonica* 1986, **36**(1):65-83.
193. Sekiguchi M, Sakakibara K, Fujii G: **Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma.** *The Japanese journal of experimental medicine* 1978, **48**(1):61-68.
194. Yanagihara K, Seyama T, Tsumuraya M, Kamada N, Yokoro K: **Establishment and characterization of human signet ring cell gastric carcinoma cell lines with amplification of the c-myc oncogene.** *Cancer Res* 1991, **51**(1):381-386.
195. Hojo K, Hiramane C: **Dissociation of blastogenic factor production and lymphocyte transformation of guinea pig lymphocytes stimulated with tuberculin PPD.** *International archives of allergy and applied immunology* 1977, **53**(5):474-478.

196. Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T, Hirohashi S: **E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(5):1858-1862.
197. Uemori TA, K., Kato I, Harasawa R: **Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of mycoplasmas by the polymerase chain reaction** *Syst Appl Microbiol* 1992, **15**:181-186.
198. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
199. Joh T, Itoh M, Katsumi K, Yokoyama Y, Takeuchi T, Kato T, Wada Y, Tanaka R: **Physiological concentrations of human epidermal growth factor in biological fluids: use of a sensitive enzyme immunoassay.** *Clin Chim Acta* 1986, **158**(1):81-90.
200. Finke U, Barbera L, Zumtobel V: **Die Wirkung von Epidermal Growth Factor (EGF) und Indomethacin auf die stimulierte Magensäuresekretion in Vitro.** In: *Chirurgisches Forum '91 für experimentelle und klinische Forschung. Volume 91*, edn. Edited by Herfarth C, Betzler M, Quentmeier A, Raute M, Hartel W, Beger HG, Ungeheuer E: Springer Berlin Heidelberg; 1991: 277-280.
201. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J *et al*: **MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling.** *Science* 2007, **316**(5827):1039-1043.
202. Agarwal S, Zerillo C, Kolmakova J, Christensen JG, Harris LN, Rimm DL, Digiovanna MP, Stern DF: **Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells.** *Br J Cancer* 2009, **100**(6):941-949.
203. Guo A, Villen J, Kornhauser J, Lee KA, Stokes MP, Rikova K, Possemato A, Nardone J, Innocenti G, Wetzel R *et al*: **Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(2):692-697.
204. Alexander S, Friedl P: **Cancer invasion and resistance: inter-connected processes of disease progression and therapy failure.** *Trends Mol Med* 2012, **18**(1):13-26.
205. Matsumura H, Ito A, Saitoh H, Winter P, Kahl G, Reuter M, Kruger DH, Terauchi R: **SuperSAGE.** *Cell Microbiol* 2005, **7**(1):11-18.
206. Matsumura H, Kruger DH, Kahl G, Terauchi R: **SuperSAGE: a modern platform for genome-wide quantitative transcript profiling.** *Curr Pharm Biotechnol* 2008, **9**(5):368-374.
207. Chan AO: **E-cadherin in gastric cancer.** *World J Gastroenterol* 2006, **12**(2):199-203.
208. Bremm A, Walch A, Fuchs M, Mages J, Duyster J, Keller G, Hermannstadter C, Becker KF, Rauser S, Langer R *et al*: **Enhanced activation of epidermal growth factor receptor caused by tumor-derived E-cadherin mutations.** *Cancer Res* 2008, **68**(3):707-714.
209. Mühlthaler B: **Einfluss von E-Cadherin auf den EGF-Rezeptor in Magenkarzinom-Zelllinien.** *Master Thesis.* TU München; 2013.
210. Luber B, Deplazes J, Keller G, Walch A, Rauser S, Eichmann M, Langer R, Hofler H, Hegewisch-Becker S, Folprecht G *et al*: **Biomarker analysis of cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric and oesophago-gastric junction cancer: results from a phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO).** *BMC Cancer* 2011, **11**:509.
211. Gong J, Morishita A, Kurokohchi K, Tani J, Kato K, Miyoshi H, Inoue H, Kobayashi M, Liu S, Murota M *et al*: **Use of protein array to investigate receptor tyrosine kinases activated in gastric cancer.** *Int J Oncol* 2010, **36**(1):101-106.

212. Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH: **EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number.** *Histopathology* 2008, **52**(6):738-746.
213. Wang Y, CF G, T Y, Z C, XW Z, XX L, NL M, WZ Z: **Assessment of ERBB2 and EGFR gene amplification and protein expression in gastric carcinoma by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization.** *Molecular Cytogenetics* 2011, **4**(1):14.
214. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME: **EGFR and cancer prognosis.** *Eur J Cancer* 2001, **37 Suppl 4**:S9-15.
215. Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Benedetti JK, Baker AF, Hackett CB, Urba SG, Zaner KS, Blanke CD *et al*: **Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(30):4922-4927.
216. Tokunaga A, Onda M, Okuda T, Teramoto T, Fujita I, Mizutani T, Kiyama T, Yoshiyuki T, Nishi K, Matsukura N: **Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer.** *Cancer* 1995, **75**(6 Suppl):1418-1425.
217. Zang ZJ, Ong CK, Cutcutache I, Yu W, Zhang SL, Huang D, Ler LD, Dykema K, Gan A, Tao J *et al*: **Genetic and structural variation in the gastric cancer kinome revealed through targeted deep sequencing.** *Cancer Res* 2011, **71**(1):29-39.
218. Corso S, Ghiso E, Cepero V, Sierra JR, Migliore C, Bertotti A, Trusolino L, Comoglio PM, Giordano S: **Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition.** *Mol Cancer* 2010, **9**:121.
219. Felkl M, Tomas K, Smid M, Mattes J, Windoffer R, Leube RE: **Monitoring the cytoskeletal EGF response in live gastric carcinoma cells.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e45280.
220. Jiang L, Lan T, Chen Y, Sang J, Li Y, Wu M, Tao Y, Wang Y, Qian H, Gu L: **PKG II inhibits EGF/EGFR-induced migration of gastric cancer cells.** *PLoS One* 2013, **8**(4):e61674.
221. Osborne CK, Hamilton B, Titus G, Livingston RB: **Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture.** *Cancer Res* 1980, **40**(7):2361-2366.
222. Dan L, Jian D, Na L, Xiaozhong W: **Crosstalk between EGFR and integrin affects invasion and proliferation of gastric cancer cell line, SGC7901.** *Oncotargets and therapy* 2012, **5**:271-277.
223. Baek MK, Kim MH, Jang HJ, Park JS, Chung IJ, Shin BA, Ahn BW, Jung YD: **EGF stimulates uPAR expression and cell invasiveness through ERK, AP-1, and NF-kappaB signaling in human gastric carcinoma cells.** *Oncol Rep* 2008, **20**(6):1569-1575.
224. Wang LY, Liu YP, Chen LG, Chen YL, Tan L, Liu JJ, Jazag A, Ren JL, Guleng B: **Pyruvate kinase M2 plays a dual role on regulation of the EGF/EGFR signaling via E-cadherin-dependent manner in gastric cancer cells.** *PLoS One* 2013, **8**(6):e67542.
225. Lyros O, Mueller A, Heidel F, Schimanski CC, Gockel I, Galle PR, Lang H, Moehler M: **Analysis of anti-proliferative and chemosensitizing effects of sunitinib on human esophagogastric cancer cells: Synergistic interaction with vandetanib via inhibition of multi-receptor tyrosine kinase pathways.** *Int J Cancer* 2010, **127**(5):1197-1208.
226. Rocher-Ros V, Marco S, Mao JH, Gines S, Metzger D, Chambon P, Balmain A, Saura CA: **Presenilin modulates EGFR signaling and cell transformation by regulating the ubiquitin ligase Fbw7.** *Oncogene* 2010, **29**(20):2950-2961.
227. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtness B, Bos M, D'Andrea G, Seidman A, Norton L, Gunnett K *et al*: **Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin.** *J Clin Oncol* 2000, **18**(4):904-914.

228. Luo FR, Yang Z, Dong H, Camuso A, McGlinchey K, Fager K, Flefleh C, Kan D, Inigo I, Castaneda S *et al*: **Correlation of pharmacokinetics with the antitumor activity of Cetuximab in nude mice bearing the GEO human colon carcinoma xenograft.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, **56**(5):455-464.
229. Hotz B, Keilholz U, Fusi A, Buhr HJ, Hotz HG: **In vitro and in vivo antitumor activity of cetuximab in human gastric cancer cell lines in relation to epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutational phenotype.** *Gastric Cancer* 2012, **15**(3):252-264.
230. Hara M, Nakanishi H, Tsujimura K, Matsui M, Yatabe Y, Manabe T, Tatematsu M: **Interleukin-2 potentiation of cetuximab antitumor activity for epidermal growth factor receptor-overexpressing gastric cancer xenografts through antibody-dependent cellular cytotoxicity.** *Cancer Sci* 2008, **99**(7):1471-1478.
231. Takeuchi K, Shibamoto S, Hayakawa M, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Ito F: **Hepatocyte growth factor (HGF)-induced cell migration is negatively modulated by epidermal growth factor through tyrosine phosphorylation of the HGF receptor.** *Exp Cell Res* 1996, **223**(2):420-425.
232. Gan Y, Shi C, Inge L, Hibner M, Balducci J, Huang Y: **Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells.** *Oncogene* 2010, **29**(35):4947-4958.
233. Brusevold IJ, Aasrum M, Bryne M, Christoffersen T: **Migration induced by epidermal and hepatocyte growth factors in oral squamous carcinoma cells in vitro: role of MEK/ERK, p38 and PI-3 kinase/Akt.** *J Oral Pathol Med* 2012, **41**(7):547-558.
234. Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Han EH, Kim HG, Song GY, Kwon KI, Jeong TC, Jeong HG: **Suppression of EGF-induced tumor cell migration and matrix metalloproteinase-9 expression by capsaicin via the inhibition of EGFR-mediated FAK/Akt, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK, and AP-1 signaling.** *Mol Nutr Food Res* 2011, **55**(4):594-605.
235. Parker JJ, Dionne KR, Massarwa R, Klaassen M, Foreman NK, Niswander L, Canoll P, Kleinschmidt-Demasters BK, Waziri A: **Gefitinib selectively inhibits tumor cell migration in EGFR-amplified human glioblastoma.** *Neuro Oncol* 2013, **15**(8):1048-1057.
236. Bley K, Boorman G, Mohammad B, McKenzie D, Babbar S: **A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin.** *Toxicologic pathology* 2012, **40**(6):847-873.
237. Shin DY, Kim GY, Li W, Choi BT, Kim ND, Kang HS, Choi YH: **Implication of intracellular ROS formation, caspase-3 activation and Egr-1 induction in platycodon D-induced apoptosis of U937 human leukemia cells.** *Biomed Pharmacother* 2009, **63**(2):86-94.
238. Chun J, Kim YS: **Platycodin D inhibits migration, invasion, and growth of MDA-MB-231 human breast cancer cells via suppression of EGFR-mediated Akt and MAPK pathways.** *Chem Biol Interact* 2013.
239. Huang SM, Li J, Harari PM: **Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade.** *Mol Cancer Ther* 2002, **1**(7):507-514.
240. Jiang WG: **Membrane ruffling of cancer cells: a parameter of tumour cell motility and invasion.** *Eur J Surg Oncol* 1995, **21**(3):307-309.
241. Hartmann-Petersen R, Walmod PS, Berezin A, Berezin V, Bock E: **Individual cell motility studied by time-lapse video recording: influence of experimental conditions.** *Cytometry* 2000, **40**(4):260-270.
242. Bardelli A, Siena S: **Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(7):1254-1261.

243. Jhaver M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L *et al*: **PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab.** *Cancer Res* 2008, **68**(6):1953-1961.
244. van Grieken NC, Aoyama T, Chambers PA, Bottomley D, Ward LC, Inam I, Buffart TE, Das K, Lim T, Pang B *et al*: **KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study.** *Br J Cancer* 2013, **108**(7):1495-1501.
245. Krumbach R, Schuler J, Hofmann M, Giesemann T, Fiebig HH, Beckers T: **Primary resistance to cetuximab in a panel of patient-derived tumour xenograft models: activation of MET as one mechanism for drug resistance.** *Eur J Cancer* 2011, **47**(8):1231-1243.
246. Liska D, Chen CT, Bachleitner-Hofmann T, Christensen JG, Weiser MR: **HGF rescues colorectal cancer cells from EGFR inhibition via MET activation.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(3):472-482.
247. Dong J, Opresko LK, Chrisler W, Orr G, Quesenberry RD, Lauffenburger DA, Wiley HS: **The membrane-anchoring domain of epidermal growth factor receptor ligands dictates their ability to operate in juxtacrine mode.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**(6):2984-2998.
248. Inno A, Di Salvatore M, Cenci T, Martini M, Orlandi A, Strippoli A, Ferrara AM, Bagala C, Cassano A, Larocca LM *et al*: **Is there a role for IGF1R and c-MET pathways in resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer?** *Clin Colorectal Cancer* 2011, **10**(4):325-332.
249. Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Kudo Y, Mohri D *et al*: **Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **394**(4):1042-1046.
250. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, Stegh AH, Bradner JE, Ligon KL, Brennan C *et al*: **Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies.** *Science* 2007, **318**(5848):287-290.
251. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, Fieuw S, Vandesompele J, Peeters M, Van Laethem JL *et al*: **Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(30):5068-5074.
252. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK *et al*: **Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(22):3230-3237.
253. Tinhofer I, Klinghammer K, Weichert W, Knodler M, Stenzinger A, Gauler T, Budach V, Keilholz U: **Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(15):5197-5204.
254. Yonesaka K, Zejnullahu K, Lindeman N, Homes AJ, Jackman DM, Zhao F, Rogers AM, Johnson BE, Janne PA: **Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(21):6963-6973.
255. Kitadai Y, Yasui W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Ayhan A, Haruma K, Kajiyama G, Johnson GR, Tahara E: **Expression of amphiregulin, a novel gene of the epidermal growth factor family, in human gastric**

- carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1993, **84**(8):879-884.
256. Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A, Wang W, Li Q, Donev IS, Tacheuchi S, Mouri H, Yamashita K, Ohtsubo K *et al*: **The EGFR ligands amphiregulin and heparin-binding egf-like growth factor promote peritoneal carcinomatosis in CXCR4-expressing gastric cancer.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(11):3619-3630.
257. Kang S, Bader AG, Vogt PK: **Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(3):802-807.
258. Schaller MD: **Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 7):1007-1013.
259. Brown MC, Turner CE: **Paxillin: adapting to change.** *Physiological reviews* 2004, **84**(4):1315-1339.
260. Guarino M: **Src signaling in cancer invasion.** *J Cell Physiol* 2010, **223**(1):14-26.
261. Eke I, Schneider L, Forster C, Zips D, Kunz-Schughart LA, Cordes N: **EGFR/JIP-4/JNK2 signaling attenuates cetuximab-mediated radiosensitization of squamous cell carcinoma cells.** *Cancer Res* 2013, **73**(1):297-306.
262. Mita H, Toyota M, Aoki F, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Suzuki H, Idogawa M, Kashima L, Yanagihara K *et al*: **A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers: involvement of overexpressed wild-type KRAS in downstream signaling and cancer cell growth.** *BMC Cancer* 2009, **9**:198.
263. Kim IJ, Park JH, Kang HC, Shin Y, Park HW, Park HR, Ku JL, Lim SB, Park JG: **Mutational analysis of BRAF and K-ras in gastric cancers: absence of BRAF mutations in gastric cancers.** *Hum Genet* 2003, **114**(1):118-120.
264. Deng N, Goh LK, Wang H, Das K, Tao J, Tan IB, Zhang S, Lee M, Wu J, Lim KH *et al*: **A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets.** *Gut* 2012, **61**(5):673-684.
265. Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, Nagtegaal ID, Paraf F, Lauricella C, Dimartino V, Hobor S, Jacobs B, Ercolani C *et al*: **KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy.** *Int J Cancer* 2013, **133**(5):1259-1265.
266. Al Moustafa AE, Yansouni C, Alaoui-Jamali MA, O'Connor-McCourt M: **Up-regulation of E-cadherin by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in lung cancer cell lines.** *Clin Cancer Res* 1999, **5**(3):681-686.
267. Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Becker I, Handschuh G, Schuhmacher C, Muller W, Gabbert HE, Ochiai A, Hirohashi S *et al*: **Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody.** *Am J Pathol* 1999, **155**(6):1803-1809.
268. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC: **The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(7):505-515.
269. Fujii T, Koshikawa K, Nomoto S, Okochi O, Kaneko T, Inoue S, Yatabe Y, Takeda S, Nakao A: **Focal adhesion kinase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and can be served as an independent prognostic factor.** *Journal of hepatology* 2004, **41**(1):104-111.
270. Imaizumi M, Nishimura M, Takeuchi S, Murase M, Hamaguchi M: **Role of tyrosine specific phosphorylation of cellular proteins, especially EGF receptor and p125FAK in human lung cancer cells.** *Lung Cancer* 1997, **17**(1):69-84.
271. Itoh S, Maeda T, Shimada M, Aishima S, Shirabe K, Tanaka S, Maehara Y: **Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(8):2812-2817.

272. Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, Sohda M, Fukai Y, Masuda N, Manda R, Fukuchi M, Tsukada K, Kuwano H: **FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma.** *Br J Cancer* 2003, **89**(1):140-145.
273. Sood AK, Armaiz-Pena GN, Halder J, Nick AM, Stone RL, Hu W, Carroll AR, Spannuth WA, Deavers MT, Allen JK *et al*: **Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis.** *J Clin Invest* 2010, **120**(5):1515-1523.
274. Sun CK, Ng KT, Sun BS, Ho JW, Lee TK, Ng I, Poon RT, Lo CM, Liu CL, Man K *et al*: **The significance of proline-rich tyrosine kinase2 (Pyk2) on hepatocellular carcinoma progression and recurrence.** *Br J Cancer* 2007, **97**(1):50-57.
275. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD: **Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(1):56-68.
276. Sun CK, Man K, Ng KT, Ho JW, Lim ZX, Cheng Q, Lo CM, Poon RT, Fan ST: **Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells through c-Src/ERK activation.** *Carcinogenesis* 2008, **29**(11):2096-2105.
277. Guessous F, Yang Y, Johnson E, Marcinkiewicz L, Smith M, Zhang Y, Kofman A, Schiff D, Christensen J, Abounader R: **Cooperation between c-Met and focal adhesion kinase family members in medulloblastoma and implications for therapy.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(2):288-297.
278. Wheeler DL, Iida M, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Dunn EF, Armstrong EA, Huang S, Harari PM: **Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab.** *Cancer Biol Ther* 2009, **8**(8):696-703.
279. Nagaraj NS, Washington MK, Merchant NB: **Combined blockade of Src kinase and epidermal growth factor receptor with gemcitabine overcomes STAT3-mediated resistance of inhibition of pancreatic tumor growth.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(3):483-493.
280. Infante JR, Camidge DR, Mileskin LR, Chen EX, Hicks RJ, Rischin D, Fingert H, Pierce KJ, Xu H, Roberts WG *et al*: **Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic phase I dose-escalation trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors.** *J Clin Oncol* 2012, **30**(13):1527-1533.
281. Han S, Mistry A, Chang JS, Cunningham D, Griffor M, Bonnette PC, Wang H, Chrnyk BA, Aspnes GE, Walker DP *et al*: **Structural characterization of proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) reveals a unique (DFG-out) conformation and enables inhibitor design.** *J Biol Chem* 2009, **284**(19):13193-13201.
282. Humar B, Guilford P: **Hereditary diffuse gastric cancer: a manifestation of lost cell polarity.** *Cancer Sci* 2009, **100**(7):1151-1157.
283. Kurreck J: **RNA interference: from basic research to therapeutic applications.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2009, **48**(8):1378-1398.
284. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC: **Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications.** *Methods* 2004, **33**(2):95-103.
285. Krummhaar M: **Analyse des Effekts von E-Cadherin auf die Expression und Aktivierung des EGF-Rezeptors in Magenkarzinomzellen.** *Master Thesis.* TU München; 2014.
286. Jawhari AU, Noda M, Farthing MJ, Pignatelli M: **Abnormal expression and function of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma cell lines.** *Br J Cancer* 1999, **80**(3-4):322-330.
287. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W: **E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.** *J Cell Biol* 1991, **113**(1):173-185.

288. Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ: **E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1826**(1):23-31.
289. Reddy P, Liu L, Ren C, Lindgren P, Boman K, Shen Y, Lundin E, Ottander U, Rytinki M, Liu K: **Formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion activates AKT and mitogen activated protein kinase via phosphatidylinositol 3 kinase and ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(10):2564-2578.
290. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS: **Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment.** *Endocr Relat Cancer* 2003, **10**(1):1-21.
291. Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, Pham TQ, Soriano R, Stinson J, Seshagiri S *et al*: **Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(24 Pt 1):8686-8698.
292. Witta SE, Dziadziuszko R, Yoshida K, Hedman K, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Hirsch FR: **ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC).** *Ann Oncol* 2009, **20**(4):689-695.
293. Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK: **Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells.** *Cancer Res* 2008, **68**(7):2391-2399.
294. Birchmeier W, Behrens J: **Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1198**(1):11-26.
295. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K: **Cadherin switch in tumor progression.** *Ann N Y Acad Sci* 2004, **1014**:155-163.
296. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA: **Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis.** *J Cell Biol* 2000, **148**(4):779-790.

6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Skizzierung der Zellmigration in sechs Schritten	5
Abbildung 2: Inzidenz und Mortalitätsraten.	7
Abbildung 3: Genetische Alterationen des Magenkarzinoms.....	10
Abbildung 4: Anatomie des Magens.	11
Abbildung 5: Die Mitglieder der ErbB-Familie und deren Liganden.	15
Abbildung 6: Aktivierung und Inhibierung des EGFR.	17
Abbildung 7: E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion.....	23
Abbildung 8: Bestimmung der Parameter, die das Migrationsverhalten beschreiben.	53
Abbildung 9: Morphologie der Magenkarzinom-Zelllinien A) AGS, B) AZ521, C) Hs746T, D) LMSU, E) MKN1, F) MKN28, G) MKN45, H) KATOIII.	57
Abbildung 10: EGFR-Expression und -Aktivierung in Magenkarzinom-Zelllinien.....	58
Abbildung 11: Kinetische Aktivierung von EGFR, MAPK und AKT durch EGF in den Magenkarzinom-Zelllinien (A) AGS, (B) AZ521, (C) Hs746T, (D) LMSU und (E) MKN1.	60
Abbildung 12: Einfluss von EGF und Cetuximab auf die EGFR-Aktivierung und -Expression in den Magenkarzinom-Zelllinien (A) AGS, (B) AZ521, (C) Hs746T, (D) LMSU, (E) MKN1.	63
Abbildung 13: Auswirkungen von EGF und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die Aktivierung von (A) EGFR, (B) MAPK und (C) AKT in MKN1 Zellen.	66
Abbildung 14: Auswirkungen von EGF und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die Aktivierung von EGFR in MKN1 Zellen, die in (A) Vollmedium sowie (B) unter Serumdeprivation kultiviert wurden.	67
Abbildung 15: Auswirkungen von EGF und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die Aktivierung von (A) EGFR, (B) MAPK und (C) AKT in Hs746T Zellen.	69
Abbildung 16: Auswirkungen von EGF und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die Aktivierung von (A) EGFR, (B) MAPK und (C) AKT in serumdeprivierten Hs746T Zellen.	70
Abbildung 17: (A) Aktivierung und (B) Expression von MET in den Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1.	71
Abbildung 18: Der Effekt einer Cetuximab-Behandlung auf die metabolische Aktivität von Magenkarzinom-Zelllinien.	72
Abbildung 19: Morphologische Unterschiede in MKN1 Zellen nach Behandlung mit EGF und/oder Cetuximab während einer siebenstündigen Filmaufnahme.	73
Abbildung 20: Durchschnittliche Geschwindigkeit von Magenkarzinom-Zelllinien nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung.	77
Abbildung 21: Motilität der Magenkarzinom-Zelllinien nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung	78
Abbildung 22: Motilität und durchschnittliche Geschwindigkeit der Magenkarzinom-Zelllinie MKN1 in FKS-freiem Medium und FKS-haltigem Medium nach EGF- und/oder Cetuximab-Behandlung.	81
Abbildung 23: Einfaches Schema einer SuperSAGE Analyse.	83
Abbildung 24: Motilität und durchschnittliche Geschwindigkeit der Magenkarzinom-Zelllinien Hs746T und MKN1 nach PF431396- und/oder Cetuximab-Behandlung.	86
Abbildung 25: Auswirkungen von PF431396 und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die (A) FAK-Aktivierung und (B) FAK-Expression in MKN1 Zellen.....	87

Abbildung 26: Auswirkungen von PF431396 und/oder Cetuximab-Behandlungen auf die (A) PTK2B-Aktivierung und (B) PTK2B-Expression in MKN1 Zellen.	88
Abbildung 27: Effizienzbestimmung der Transfektion von gegen E-Cadherin gerichteter siRNA in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN28.	90
Abbildung 28: Effizienzbestimmung der Transfektion von WT E-Cadherin in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN45.	92
Abbildung 29: Effizienzbestimmung der Transfektion von WT E-Cadherin in der Magenkarzinom-Zelllinie KATOIII.	92
Abbildung 30: Einfluss von funktionellem E-Cadherin auf die Expression von (A) und (B) E-Cadherin, (D) EGFR, (F) MAPK und (H) AKT sowie die Aktivierung von (C) EGFR, (E) MAPK und (G) AKT in den Zelllinien MKN28, MKN45 und KATOIII.....	94
Abbildung 31: Modell für die Vorhersage der Cetuximab-Sensitivität in Magenkarzinom-Zelllinien.....	110

6.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen	35
Tabelle 2: Antikörper, die in Western Blot Analysen verwendet wurden.....	35
Tabelle 3: Verwendete Zellkultur-Medien und deren Zusammensetzung.....	42
Tabelle 4: Zusammensetzung des Mastermix für die Mykoplasmen-PCR	43
Tabelle 5: Programme für die Amplifizierung möglicher Mykoplasmen	43
Tabelle 6: Sequenzen der Primer für den Nachweis von Mykoplasmen.....	44
Tabelle 7: Produktlänge der durch die PCR nachweisbaren Mykoplasmenstämme.....	44
Tabelle 8: Transfektionsbedingungen der Zelllinien MKN28, MKN45 und KATOIII.	45
Tabelle 9: Auflistung der Parameter Motilität und durchschnittliche Geschwindigkeit von AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1 Zellen nach Behandlung mit EGF und/oder Cetuximab.	78
Tabelle 10: Angaben zu den Parametern Motilität und Geschwindigkeit von gehungerten MKN1 Zellen nach Behandlung mit EGF und/oder Cetuximab.	80
Tabelle 11: Angaben zu den Parametern Motilität und Geschwindigkeit von Hs746T und MKN1 Zellen nach Behandlung mit PF431396 und/oder Cetuximab.	85

6.4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	%
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2D	zweidimensional
5-FU	5-Fluorouracil
A	Adenin
A	Alanin
AA	Acrylamid
AMB	Arzneimittelbuch
APC	<i>adenomatous poyposis coli</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AREG	Amphiregulin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAD	BCL2 Antagonist des Zelltodes
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
<i>BRCA2</i>	<i>Breast Cancer Gene 2</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
BTC	Betacellulin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAD-Domäne	extrazelluläre E-Cadherin Domäne
CagA	Virulenzfaktor Zytotoxin-assoziiertes Gen A
<i>cagPAI</i>	Zytotoxin-assoziierte Gen-Pathogenitätsinsel
CCC	zytoplasmatischer Kern Komplex
<i>CDH1</i>	Gen, das für E-Cadherin kodiert
c-erbB2, v-erb-b2	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homologue 2</i>
Cet	Cetuximab
cm	Zentimeter
<i>c-Met</i>	<i>Met</i> Proto-Onkogen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Asparaginsäure
d.h.	das heißt
DAG	Sekundärtransporter Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukelinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Nukleosidtriphosphat
E	Glutaminsäure
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	erhöhte Chemilumineszenz (<i>Enhanced chemiluminescence</i>)
ECM	extrazelluläre Matrix
ECR	Elektronenkupplerreagenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor

EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ErbB	<i>avian erythroblastosis oncogen B</i>
EREG	Epiregulin
Erk1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> (= MAPK)
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FOXO	<i>Forkhead-Box-Proteine</i>
Fw	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G	Glycin
GDP	Guanosindiphosphat
GRB2	Wachstumsfaktor-gebundenes Protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H ₂ O	Wasser
HAV	Histidin-Alanin-Valin
HB-EGF	Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor
HDGC	<i>hereditary diffuse gastric carcinoma</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
<i>hMLH1, hMSH2</i>	<i>Mismatch Repair Gene</i>
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horse Radish Peroxidase</i>)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositol Trisphosphat
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
K-ras, v-Kiras2	<i>Kirsten rat sarcoma viral Onkogene homologue</i>
K-sam	kodiert für Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 2
LB Agar	Lennox B Agar
L-CAM	Leberzell Adhäsionsmolekül
M	molar
mAb/mAK	monoklonale Antikörper
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK1/2	MAPK Kinase
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
MET	Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
miRNA	mikro RNA

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRI	Klinikum rechts der Isar, TU München
MSI	Mikrosatelliten Instabilität
MW	Mittelwert
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	Natrium Monohydrogen Phosphat Heptahydrat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
Na ₄ P ₂ O ₇	Tetranatriumpyrophosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NRG	Neuregulin
OD	optische Dichte
p.a.	per analysis
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pEGFR	phosphoryliertes epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
PET	Polyethylen Terephthalat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<i>PIK3CA</i>	Gen, das für PI3K codiert
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PLC γ	Phosphoinositid-Phospholipase C γ
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	Phosphotyrosinbindedomänen
PTK2B	Protein Tyrosinkinase 2 Beta
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	Signifikanzwert
Pyk2	Prolin-reiche Tyrosinkinase 2
Ras-MAPK	<i>Ras-mitogen-activated protein kinase</i>
Rev	<i>reverse</i>
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Institute</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
S	Serin
SCCH	Software Competence Center Hagenberg
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SHC	<i>Src homology and collagen protein</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SNV	<i>single nucleotide variation</i>
Sos	<i>Son of Sevenless</i> -Protein
STAT	Signaltransduktions- und Transkriptionsaktivator-Protein
STK11	Serin-Threonin Protein-Kinase 11

T	Threonin
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transfektionsreagenz
TGF- α	Transformierender Wachstumsfaktor α
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
TP53	Tumorsuppressorgen 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUM	Technische Universität München
u.a.	unter anderem
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
ÜN	über Nacht
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen-aktivierender Rezeptor
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumenprozent
VEGFR2	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 2
VM	Vollmedium
vol	Volumen
WHO	<i>World Health Organization</i>
WST-1	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(2,4-Disulfophenyl)-2H-Tetrazolium Natriumsalz
WT	Wildtyp
WZW	Wissenschaftszentrum Weihenstephan
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid Salz
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

7 ANHANG

Tabelle S1

EGFR-Expression in unbehandelten Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. P-Werte $\leq 0,050$ sind signifikant.
(Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert
X	Y			
AGS	AZ521	0,262 \pm 0,209	0,169 \pm 0,037	0,520
	Hs746T		0,886 \pm 0,083	0,023
	LMSU		1,022 \pm 0,162	0,009
	MKN1		2,547 \pm 0,067	0,001
AZ521	Hs746T	0,169 \pm 0,037	0,886 \pm 0,083	0,001
	LMSU		1,022 \pm 0,162	0,009
	MKN1		2,547 \pm 0,067	<0,001
Hs746T	LMSU	0,886 \pm 0,083	1,022 \pm 0,162	0,286
	MKN1		2,547 \pm 0,067	<0,001
LMSU	MKN1	1,022 \pm 0,162	2,547 \pm 0,067	0,001

Tabelle S2

EGFR-Aktivierung in unbehandelten Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. P-Werte $\leq 0,050$ sind signifikant.
(Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert
X	Y			
AGS	AZ521	0,088 \pm 0,080	0,302 \pm 0,117	0,067
	Hs746T		4,146 \pm 0,516	0,005
	LMSU		0,103 \pm 0,070	0,819
	MKN1		0,427 \pm 0,237	0,121
AZ521	Hs746T	0,302 \pm 0,117	4,146 \pm 0,516	0,004
	LMSU		0,103 \pm 0,070	0,079
	MKN1		0,427 \pm 0,237	0,474
Hs746T	LMSU	4,146 \pm 0,516	0,103 \pm 0,070	0,005
	MKN1		0,427 \pm 0,237	0,002
LMSU	MKN1	0,103 \pm 0,070	0,427 \pm 0,237	0,133

Tabelle S3

Kinetische Analyse der Aktivierung von EGFR, MAPK und AKT in gehungerten Magenkarzinom-Zellen.								
Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen. Die Gruppennamen spiegeln die Behandlungszeit mit EGF (100 ng/ml) wider. (Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)								
Zelllinie	Aktiviertes Protein	Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert		
		X	Y					
AGS	EGFR	0	1	0,450 \pm 0,253	1,504 \pm 0,481	0,043		
			2	0,450 \pm 0,253	1,340 \pm 0,103	0,015		
			3	0,450 \pm 0,253	1,278 \pm 0,368	0,039		
			5	0,450 \pm 0,253	1,396 \pm 0,253	0,010		
		1	60	1,504 \pm 0,481	0,468 \pm 0,190	0,050		
			2	7,5	1,340 \pm 0,103	1,042 \pm 0,048	0,023	
			30	1,340 \pm 0,103	0,762 \pm 0,137	0,005		
			60	1,340 \pm 0,103	0,468 \pm 0,190	0,005		
		3	60	1,278 \pm 0,368	0,468 \pm 0,190	0,043		
			5	30	1,396 \pm 0,253	0,762 \pm 0,137	0,030	
			60	1,396 \pm 0,253	0,468 \pm 0,190	0,009		
			7,5	60	1,042 \pm 0,048	0,468 \pm 0,190	0,028	
		AZ521	EGFR	1	60	1,013 \pm 0,220	0,202 \pm 0,175	0,008
					3	30	1,212 \pm 0,099	0,574 \pm 0,228
	60			1,212 \pm 0,099	0,202 \pm 0,175	0,003		
	5			30	1,268 \pm 0,148	0,574 \pm 0,228	0,016	
	60			1,268 \pm 0,148	0,202 \pm 0,175	0,001		
	7,5			30	1,298 \pm 0,034	0,574 \pm 0,228	0,029	
	60			1,298 \pm 0,034	0,202 \pm 0,175	0,007		
	15			30	1,259 \pm 0,188	0,574 \pm 0,228	0,017	
	60			1,259 \pm 0,188	0,202 \pm 0,175	0,002		
	MAPK			2	15	0,983 \pm 0,597	1,365 \pm 0,281	0,050
3				5	0,983 \pm 0,597	0,828 \pm 0,448	0,026	
AKT	AKT			2	15	1,667 \pm 0,338	0,858 \pm 0,203	0,033
					30	1,667 \pm 0,338	0,565 \pm 0,495	0,040
					60	1,667 \pm 0,338	0,803 \pm 0,111	0,037
		3	15	1,283 \pm 0,118	0,858 \pm 0,203	0,047		
			60	1,283 \pm 0,118	0,803 \pm 0,111	0,007		
		7,5	60	1,128 \pm 0,129	0,803 \pm 0,111	0,031		
		Hs746T	EGFR	0	1	0,275 \pm 0,061	1,586 \pm 0,271	0,011
2	0,275 \pm 0,061				1,481 \pm 0,320	0,020		

		3	0,275 ± 0,061	1,608 ± 0,355	0,020		
		5	0,275 ± 0,061	1,365 ± 0,082	<0,001		
		7,5	0,275 ± 0,061	1,245 ± 0,803	<0,001		
		15	0,275 ± 0,061	0,825 ± 0,200	0,032		
	1	15	1,586 ± 0,271	0,825 ± 0,200	0,021		
		30	1,586 ± 0,271	0,518 ± 0,213	0,007		
		60	1,586 ± 0,271	0,320 ± 0,188	0,004		
	2	15	1,608 ± 0,355	0,825 ± 0,200	0,050		
		30	1,608 ± 0,355	0,518 ± 0,213	0,017		
		60	1,608 ± 0,355	0,320 ± 0,188	0,010		
	3	15	1,608 ± 0,355	0,825 ± 0,200	0,042		
		30	1,608 ± 0,355	0,518 ± 0,213	0,016		
		60	1,608 ± 0,355	0,320 ± 0,188	0,011		
	5	15	1,365 ± 0,082	0,825 ± 0,200	0,029		
		30	1,365 ± 0,082	0,518 ± 0,213	0,012		
		60	1,365 ± 0,082	0,320 ± 0,188	0,004		
	7,5	30	1,245 ± 0,803	0,518 ± 0,213	0,018		
		60	1,245 ± 0,803	0,320 ± 0,188	0,006		
	15	60	0,825 ± 0,200	0,320 ± 0,188	0,033		
	MAPK	3	30	1,232 ± 0,089	0,871 ± 0,144	0,029	
	AKT	0	2	0,717 ± 0,235	1,349 ± 0,227	0,029	
		2	15	1,349 ± 0,227	0,760 ± 0,114	0,029	
			60	1,349 ± 0,227	0,819 ± 0,113	0,038	
LMSU	EGFR	0	5	0,440 ± 0,333	1,271 ± 0,310	0,034	
			7,5	0,440 ± 0,333	1,354 ± 0,279	0,023	
			15	0,440 ± 0,333	1,215 ± 0,193	0,036	
	MAPK	1	7,5	0,720 ± 0,305	1,708 ± 0,114	0,019	
			15	0,720 ± 0,305	1,418 ± 0,193	0,037	
			30	0,720 ± 0,305	1,376 ± 0,220	0,044	
		2	7,5	0,836 ± 0,110	1,708 ± 0,114	0,010	
			15	0,836 ± 0,110	1,418 ± 0,193	0,018	
			30	0,836 ± 0,110	1,376 ± 0,220	0,033	
		5	7,5	0,921 ± 0,096	1,708 ± 0,114	0,016	
			15	0,921 ± 0,096	1,418 ± 0,193	0,029	
		7,5	60	1,708 ± 0,114	0,837 ± 0,183	0,007	
			15	60	1,418 ± 0,193	0,837 ± 0,183	0,020
			30	60	1,376 ± 0,220	0,837 ± 0,183	0,032
	AKT	1	7,5	0,620 ± 0,103	1,485 ± 0,355	0,043	
		5	7,5	0,702 ± 0,302	1,485 ± 0,355	0,045	

MKN1	EGFR	0	2	0,407 ± 0,125	1,467 ± 0,284	0,012	
			3	0,407 ± 0,125	1,492 ± 0,377	0,028	
			5	0,407 ± 0,125	1,180 ± 0,176	0,005	
			7,5	0,407 ± 0,125	1,326 ± 0,323	0,027	
			15	0,407 ± 0,125	0,878 ± 0,192	0,030	
		2	15	1,467 ± 0,284	0,878 ± 0,192	0,048	
			30	1,467 ± 0,284	0,623 ± 0,137	0,020	
			60	1,467 ± 0,284	0,422 ± 0,577	0,020	
			3	30	1,492 ± 0,377	0,623 ± 0,137	0,044
				60	1,492 ± 0,377	0,422 ± 0,577	0,036
		5	30	1,180 ± 0,176	0,623 ± 0,137	0,014	
			60	1,180 ± 0,176	0,422 ± 0,577	0,011	
		7,5	30	1,326 ± 0,323	0,623 ± 0,137	0,047	
			60	1,326 ± 0,323	0,422 ± 0,577	0,036	
		15	60	0,878 ± 0,192	0,422 ± 0,577	0,044	
	MAPK	0	3	0,490 ± 0,231	1,082 ± 0,111	0,030	
			5	0,490 ± 0,231	1,198 ± 0,097	0,021	
			7,5	0,490 ± 0,231	1,160 ± 0,053	0,032	
			15	0,490 ± 0,231	1,115 ± 0,182	0,023	
			30	0,490 ± 0,231	1,194 ± 0,172	0,016	
2		60	0,490 ± 0,231	1,247 ± 0,004	0,030		
		5	0,881 ± 0,145	1,198 ± 0,097	0,042		
		60	0,881 ± 0,145	1,247 ± 0,004	0,048		
		AKT	0	7,5	0,424 ± 0,114	1,190 ± 0,263	0,024
				15	0,424 ± 0,114	0,935 ± 0,218	0,043

Tabelle S4

Einfluss von Cetuximab und/oder EGF auf die EGFR-Aktivierung in den Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen. (Abkürzungen: E: 5 ng/ml EGF; C 0,1: 0,1 µg/ml Cetuximab; C 1: 1 µg/ml Cetuximab; C 50: 50 µg/ml Cetuximab; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Zelllinie	Gruppe (X vs. Y)		MW ± SD (X)	MW ± SD (Y)	p-Wert
	X	Y			
AGS	0	E	0,376 ± 0,171	2,587 ± 0,438	0,006
		E + C 1		1,604 ± 0,48	0,035
	C 1	E	0,419 ± 0,187	2,587 ± 0,438	0,006
		E + C 1		1,604 ± 0,48	0,037
	C 50	E	0,494 ± 0,188	2,587 ± 0,438	0,007
		E + C 1		1,604 ± 0,48	0,043
	E	E + C 50	2,587 ± 0,438	0,463 ± 0,145	0,008

AZ521	E + C 1	E + C 50	1,604 ± 0,48	0,463 ± 0,145	0,044
	0	E + C 1	0,395 ± 0,068	1,085 ± 0,245	0,032
	C 0,1	C 1	0,357 ± 0,091	0,366 ± 0,084	0,906
		E		2,582 ± 0,895	0,049
	C 1	E + C 1		1,085 ± 0,245	0,025
E		0,366 ± 0,084	2,582 ± 0,895	0,049	
Hs746T		E + C 1		1,085 ± 0,245	0,026
	0	E	0,896 ± 0,064	1,239 ± 0,093	0,009
	C 1	E	0,856 ± 0,031	1,239 ± 0,093	0,012
		E + C 50		0,974 ± 0,017	0,010
	E	E + C 1	1,239 ± 0,093	1,02 ± 0,082	0,038
LMSU		E + C 50		0,974 ± 0,017	0,035
	0	E	0,283 ± 0,122	3,795 ± 0,795	0,015
	C 1	E + C 1		1,463 ± 0,352	0,019
		E	0,231 ± 0,078	3,795 ± 0,795	0,015
	C 50	E + C 1		1,463 ± 0,352	0,022
E		0,305 ± 0,078	3,795 ± 0,795	0,016	
MKN1		E + C 1		1,463 ± 0,352	0,025
	E	E + C 1	3,795 ± 0,795	1,463 ± 0,352	0,023
		E + C 50		0,337 ± 0,061	0,017
	E + C 1	E + C 50	1,463 ± 0,352	0,337 ± 0,061	0,028
	AZ521	0	E	0,355 ± 0,144	2,125 ± 0,225
C 0,1		E + C 0,1		1,755 ± 0,386	0,015
		E + C 1		1,136 ± 0,246	0,015
		E	0,297 ± 0,039	2,125 ± 0,225	0,004
C 1		E + C 0,1		1,755 ± 0,386	0,022
		E + C 1		1,136 ± 0,246	0,025
		E	0,328 ± 0,085	2,125 ± 0,225	0,002
E		E + C 0,1		1,755 ± 0,386	0,020
		E + C 1		1,136 ± 0,246	0,020
E		E + C 1	2,125 ± 0,225	1,136 ± 0,246	0,007

Einfluss von Cetuximab und/oder EGF auf die EGFR-Expression in den Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen. Für AGS, Hs746T, LMSU und MKN1 gibt es keine Signifikanzwerte. (Abkürzungen: E: 5 ng/ml EGF; C 0,1: 0,1 μ g/ml Cetuximab; C 1: 1 μ g/ml Cetuximab; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Zelllinie	Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert
	X	Y			
AZ521	C 0,1	E + C 1	0,715 \pm 0,183	1,324 \pm 0,192	0,017

Tabelle S5

Analyse der EGFR-, MAPK- und AKT-Aktivierung in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN1. Die Zellen wurden in Medium mit FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen. In der Tabelle sind nur die statistischen Daten der relevanten Vergleiche eingetragen.

(Abkürzungen: EGF 5: 5 ng/ml EGF; Cet 0,05: 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 0,1: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 1: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 10: 10 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Aktiviertes Protein	Behandlungsdauer	Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert		
		X	Y					
EGFR	1 min	EGF 5 +	EGF 5 +					
		Cet 0,05	Cet 10	1,991 \pm 0,196	0,669 \pm 0,326	0,007		
			Cet 0,05	1,991 \pm 0,196	0,263 \pm 0,056	0,002		
		EGF 5 +	EGF 5 +					
		Cet 0,1	Cet 10	2,219 \pm 0,345	0,669 \pm 0,326	0,005		
			Cet 0,1	2,219 \pm 0,345	0,236 \pm 0,053	0,009		
	3 min	EGF 5	EGF 5 +	EGF 5 +				
			Cet 1	Cet 10	2,478 \pm 0,449	1,056 \pm 0,317	0,014	
				EGF 5 +				
				Cet 10	2,478 \pm 0,449	0,472 \pm 0,126	0,012	
				Cet 10	2,478 \pm 0,449	0,118 \pm 0,066	0,011	
				EGF 5 +				
		EGF 5 +	Cet 0,05	Cet 1	3,137 \pm 0,763	1,056 \pm 0,317	0,028	
				EGF 5 +				
				Cet 10	3,137 \pm 0,763	0,472 \pm 0,126	0,024	
				Cet 0,05	3,137 \pm 0,763	0,175 \pm 0,0418	0,021	
				EGF 5 +				
				Cet 0,1	Cet 10	1,991 \pm 0,530	0,472 \pm 0,126	0,032
		EGF 5 +	Cet 0,1		Cet 0,1	1,991 \pm 0,530	0,149 \pm 0,050	0,026
					EGF 5 +			
					Cet 1	1,056 \pm 0,317	0,149 \pm 0,050	0,036
			EGF 5 +	Cet 10	Cet 10	0,472 \pm 0,126	0,118 \pm 0,066	0,023
					EGF 5 +			
					Cet 10	Cet 10	0,472 \pm 0,126	0,118 \pm 0,066
15 min	EGF 5	EGF 5 +	Cet 1	2,808 \pm 0,250	0,860 \pm 0,492	0,009		
			EGF 5 +					
			Cet 10	2,808 \pm 0,250	0,376 \pm 0,076	0,002		
			EGF 5 +					
	EGF 5 +	Cet 0,05	Cet 1	2,293 \pm 0,407	0,860 \pm 0,492	0,019		
			EGF 5 +					
			Cet 10	2,293 \pm 0,407	0,376 \pm 0,076	0,012		
			Cet 0,05	2,293 \pm 0,407	0,154 \pm 0,025	0,012		
EGF 5 +	EGF 5 +							
Cet 0,1	Cet 10	1,939 \pm 0,607	0,376 \pm 0,076	0,045				

			Cet 0,1	1,939 ± 0,607	0,128 ± 0,049	0,035
		EGF 5 +				
		Cet 10	Cet 10	0,376 ± 0,076	0,163 ± 0,095	0,041
		EGF 5 +				
	4 h	Cet 0,05	Cet 0,05	2,249 ± 0,801	0,311 ± 0,167	0,047
		EGF 5 +				
MAPK	3 min	Cet 10	Cet 10	1,113 ± 0,166	0,619 ± 0,184	0,026
		EGF 5 +				
	15 min	Cet 0,05	Cet 0,05	1,549 ± 0,377	0,727 ± 0,316	0,046
		EGF 5 +				
		Cet 0,1	Cet 0,1	1,544 ± 0,215	0,491 ± 0,089	0,007
		EGF 5 +				
		Cet 1	Cet 1	1,503 ± 0,448	0,315 ± 0,207	0,028
		EGF 5 +				
		Cet 10	Cet 10	1,263 ± 0,186	0,372 ± 0,389	0,040
		EGF 5 +				
	4 h	Cet 0,1	Cet 0,1	1,467 ± 0,435	0,274 ± 0,205	0,026
		EGF 5 +				
		Cet 1	Cet 1	1,438 ± 0,257	0,223 ± 0,137	0,005
AKT	1 min	0	Cet 10	0,881 ± 0,014	1,056 ± 0,067	0,040
		EGF 5 +				
	3 min	Cet 0,05	Cet 0,05	1,361 ± 0,189	0,779 ± 0,088	0,019
		EGF 5 +				
	15 min	Cet 0,05	Cet 0,05	1,578 ± 0,453	0,549 ± 0,335	0,038
		EGF 5 +	EGF 5 +			
		Cet 0,1	Cet 10	1,379 ± 0,185	0,913 ± 0,151	0,029
			Cet 0,1	1,379 ± 0,185	0,502 ± 0,152	0,004
		EGF 5 +				
		Cet 1	Cet 1	1,333 ± 0,333	0,516 ± 0,147	0,035

Tabelle S6

Analyse der Aktivierung von EGFR, MAPK und AKT in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN1 nach Serumdeprivation. Die Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen. In der Tabelle sind nur die statistischen Daten der relevanten Vergleiche eingetragen.
(Abkürzungen: EGF 30: 30 ng/ml EGF; Cet 0,05: 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 0,1: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 1: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 10: 10 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Aktiviertes Protein	Behandlungsdauer	Gruppe (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert	
		X	Y				
EGFR	1 min	0	EGF 30	0,171 \pm 0,132	1,914 \pm 0,412	0,012	
		EGF 30 + Cet 0,05	Cet 0,05	2,349 \pm 0,342	0,162 \pm 0,059	0,007	
		EGF 30 + Cet 0,1	Cet 0,1	1,877 \pm 0,534	0,091 \pm 0,058	0,027	
		EGF 30 + Cet 1	Cet 1	2,134 \pm 0,236	0,111 \pm 0,093	0,002	
		3 min	0	EGF 30	0,142 \pm 0,053	2,652 \pm 0,619	0,019
			EGF 30 + Cet 10	Cet 10	2,652 \pm 0,619	0,913 \pm 0,068	0,038
	EGF 30 + Cet 0,05		Cet 0,05	1,954 \pm 0,714	0,087 \pm 0,042	0,045	
	EGF 30 + Cet 0,1		EGF 30 + Cet 1	2,329 \pm 0,110	1,907 \pm 0,128	0,013	
	EGF 30 + Cet 10		Cet 10	2,329 \pm 0,110	0,913 \pm 0,068	<0,001	
	EGF 30 + Cet 0,1		Cet 0,1	2,329 \pm 0,110	0,056 \pm 0,030	<0,001	
	EGF 30 + Cet 1		EGF 30 + Cet 10	1,907 \pm 0,128	0,913 \pm 0,068	0,001	
	EGF 30 + Cet 1		Cet 1	1,907 \pm 0,128	0,035 \pm 0,015	0,001	
	EGF 30 + Cet 10		Cet 10	0,913 \pm 0,068	0,025 \pm 0,016	0,001	
	15 min		0	EGF 30	0,093 \pm 0,002	2,283 \pm 0,362	0,009
			EGF 30 + Cet 10	Cet 10	2,283 \pm 0,362	0,649 \pm 0,132	0,009
			EGF 30 + Cet 0,05	EGF 30 + Cet 1	2,567 \pm 0,153	1,621 \pm 0,126	0,001
		EGF 30 + Cet 10	Cet 10	2,567 \pm 0,153	0,649 \pm 0,132	<0,001	
		EGF 30 + Cet 0,05	Cet 0,05	2,567 \pm 0,153	0,075 \pm 0,043	0,001	
		EGF 30 + Cet 0,1	EGF 30 + Cet 1	2,667 \pm 0,157	1,621 \pm 0,126	0,001	
			EGF 30 + Cet 10	2,667 \pm 0,157	0,649 \pm 0,132	<0,001	
			Cet 0,1	2,667 \pm 0,157	0,043 \pm 0,032	0,001	

4 h	EGF 30 + Cet 1	EGF 30 + Cet 10	1,621 ± 0,126	0,649 ± 0,132	0,001
		Cet 1	1,621 ± 0,126	0,046 ± 0,051	0,001
	EGF 30 + Cet 10	Cet 10	0,649 ± 0,132	0,034 ± 0,041	0,010
	0	EGF 30	0,395 ± 0,099	2,117 ± 0,365	0,010
		EGF 30 + Cet 10	2,117 ± 0,365	0,964 ± 0,065	0,029
	EGF 30 + Cet 0,05	EGF 30 + Cet 10	1,923 ± 0,023	0,964 ± 0,065	<0,001
		Cet 0,05	1,923 ± 0,023	0,316 ± 0,087	<0,001
	EGF 30 + Cet 0,1	EGF 30 + Cet 10	1,827 ± 0,148	0,964 ± 0,065	0,004
		Cet 0,1	1,827 ± 0,148	0,270 ± 0,095	<0,001
	EGF 30 + Cet 1	Cet 1	1,704 ± 0,340	0,276 ± 0,084	0,014
	EGF 30 + Cet 10	Cet 10	0,964 ± 0,065	0,235 ± 0,117	0,002

Tabelle S7

Analyse der Aktivierung von EGFR, MAPK und AKT in der Magenkarzinom-Zelllinie Hs746T. Die Zellen wurden in Medium mit FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen. Es sind nur statistische Daten relevanter Vergleiche eingetragen.

(Abkürzungen: EGF 5: 5 ng/ml EGF; Cet 1: 1 µg/ml Cetuximab; Cet 50: 50 µg/ml Cetuximab; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Aktiviertes Protein	Behandlungsdauer	Gruppe (X vs. Y)		MW ± SD (X)	MW ± SD (Y)	p-Wert
		X	Y			
AKT	3 min	EGF 5	EGF 5 + Cet 1	1,169 ± 0,050	0,950 ± 0,088	0,030
			EGF 5 + Cet 50	1,169 ± 0,050	0,971 ± 0,026	0,008
			0	EGF 5	0,812 ± 0,059	1,113 ± 0,038
	4 h	0	Cet 1	0,812 ± 0,059	0,961 ± 0,051	0,031

Tabelle S8

Analyse der EGFR-, MAPK- und AKT-Aktivierung in der Magenkarzinom-Zelllinie Hs746T nach Hungern der Zellen. Die Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ relevanter Vergleiche eingetragen. (Abkürzungen: EGF 30: 30 ng/ml EGF; Cet 1: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 50: 50 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Aktiviertes Protein	Behandlungsdauer	Gruppe (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert
		X	Y			
EGFR	1 min	0	EGF 30	0,745 \pm 0,056	1,123 \pm 0,081	0,004
		0	EGF 30	0,709 \pm 0,092	1,478 \pm 0,172	0,006
	3 min	EGF 30 + EGF 30	Cet 50	1,478 \pm 0,172	0,910 \pm 0,100	0,013
		EGF 30 + Cet 1	EGF 30 + Cet 50	1,247 \pm 0,077	0,910 \pm 0,100	0,011
MAPK	1 min	0	Cet 50	0,820 \pm 0,054	1,073 \pm 0,063	0,007
		EGF 30	EGF 30 + Cet 1	0,873 \pm 0,088	1,106 \pm 0,092	0,034
			EGF 30 + Cet 50	0,873 \pm 0,088	1,156 \pm 0,067	0,013
	4 h	EGF 30 + Cet 1	EGF 30 + Cet 50	1,114 \pm 0,056	0,955 \pm 0,053	0,023

Tabelle S9

Aktivierung von MET in den Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Die Zellen wurden in Medium mit FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen. Die Aktivierung von MET in AGS, AZ521, LMSU und MKN1 war nicht detektierbar. (Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Gruppe	MW \pm SD
Hs746T	5,585 \pm 1,179

Tabelle S10

Expression von MET in den Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Die Zellen wurden in Medium mit FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen.
(Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert
X	Y			
AGS	Hs746T	0,287 \pm 0,100	3,748 \pm 0,470	0,005
	LMSU		0,776 \pm 0,130	0,008
AZ521	Hs746T	0,186 \pm 0,094	3,748 \pm 0,470	0,004
	LMSU		0,776 \pm 0,130	0,004
Hs746T	LMSU	3,748 \pm 0,470	0,776 \pm 0,130	0,005
	MKN1		0,246 \pm 0,246	0,005

Tabelle S11

Cetuximab-Sensitivität der Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. P-Werte $\leq 0,050$ sind signifikant. Die Gruppennamen spiegeln die eingesetzte Cetuximabkonzentration wider.
(Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Zelllinie	Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert	
	X	Y				
AGS	0,1	1	108,532 \pm 12,754	93,759 \pm 4,909	0,059	
		10		115,925 \pm 19,938	0,508	
		100		93,759 \pm 4,909	0,059	
		200		107,261 \pm 28,797	0,931	
	1	10	93,759 \pm 4,909	115,925 \pm 19,938	0,066	
		100		93,759 \pm 4,909	1,000	
		200		107,261 \pm 28,797	0,357	
	10	100	115,925 \pm 19,938	93,759 \pm 4,909	0,066	
		200		107,261 \pm 28,797	0,597	
	100	200	93,759 \pm 4,909	107,261 \pm 28,797	0,357	
	AZ521	0,1	1	117,821 \pm 25,922	102,942 \pm 25,104	0,384
			10		90,454 \pm 38,046	0,225
100			59,530 \pm 27,389		0,009	
200			24,494 \pm 15,589		<0,001	
1		10	102,942 \pm 25,104	90,454 \pm 38,046	0,560	
		100		59,530 \pm 27,389	0,031	
		200		24,494 \pm 15,589	0,001	
10		100	90,454 \pm 38,046	59,530 \pm 27,389	0,182	
		200		24,494 \pm 15,589	0,014	

	100	200	59,530 ± 27,389	24,494 ± 15,589	0,045
Hs746T	0,1	1	107,085 ± 18,062	118,125 ± 23,037	0,551
		10		130,587 ± 32,702	0,353
		100		110,697 ± 27,736	0,861
		200		101,744 ± 14,001	0,708
	1	10	118,125 ± 23,037	130,587 ± 32,702	0,621
		100		110,697 ± 27,736	0,740
		200		101,744 ± 14,001	0,363
	10	100	130,587 ± 32,702	110,697 ± 27,736	0,468
		200		101,744 ± 14,001	0,264
	100	200	110,697 ± 27,736	101,744 ± 14,001	0,652
LMSU	0,1	1	113,672 ± 22,440	96,803 ± 16,134	0,213
		10		108,961 ± 13,530	0,700
		100		104,192 ± 15,498	0,462
		200		86,416 ± 16,213	0,062
	1	10	96,803 ± 16,134	108,961 ± 13,530	0,234
		100		104,192 ± 15,498	0,481
		200		86,416 ± 16,213	0,340
	10	100	108,961 ± 13,530	104,192 ± 15,498	0,619
		200		86,416 ± 16,213	0,045
	100	200	104,192 ± 15,498	86,416 ± 16,213	0,114
MKN1	0,1	1	83,550 ± 15,648	82,422 ± 6,110	0,900
		10		70,916 ± 9,959	0,230
		100		66,308 ± 22,811	0,265
		200		38,109 ± 15,042	0,006
	1	10	82,422 ± 6,110	70,916 ± 9,959	0,106
		100		66,308 ± 22,811	0,255
		200		38,109 ± 15,042	0,006
	10	100	70,916 ± 9,959	66,308 ± 22,811	0,729
		200		38,109 ± 15,042	0,014
	100	200	66,308 ± 22,811	38,109 ± 15,042	0,092

Tabelle S12

Cetuximab-Sensitivität der Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Einstichproben t-Test verwendet. Getestet wurde gegen den festen Wert 100. P-Werte $\leq 0,050$ sind signifikant. Die Gruppennamen spiegeln die eingesetzte Cetuximabkonzentration wider.

(Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Zelllinie	Gruppe	MW \pm SD	p-Wert gegen 100
AGS	200	107,261 \pm 28,797	0,603
	100	93,759 \pm 4,909	0,047
	10	115,925 \pm 19,938	0,149
	1	93,759 \pm 4,909	0,047
	0,1	108,532 \pm 12,754	0,209
AZ521	200	24,494 \pm 15,589	<0,001
	100	59,530 \pm 27,389	0,030
	10	90,454 \pm 38,046	0,605
	1	102,942 \pm 25,104	0,806
	0,1	117,821 \pm 25,922	0,199
Hs746T	200	101,744 \pm 14,001	0,849
	100	110,697 \pm 27,736	0,573
	10	130,587 \pm 32,702	0,247
	1	118,125 \pm 23,037	0,306
	0,1	107,085 \pm 18,062	0,567
LMSU	200	86,416 \pm 16,213	0,134
	100	104,192 \pm 15,498	0,578
	10	108,961 \pm 13,530	0,213
	1	96,803 \pm 16,134	0,681
	0,1	113,672 \pm 22,440	0,245
MKN1	200	38,109 \pm 15,042	0,004
	100	66,308 \pm 22,811	0,060
	10	70,916 \pm 9,959	0,010
	1	82,422 \pm 6,110	0,010
	0,1	83,550 \pm 15,648	0,126

Tabelle S13

Durchschnittliche Geschwindigkeit der Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1, die in FKS-haltigem Medium kultiviert wurden. Es sind alle signifikanten Werte $\leq 0,050$ aufgelistet. Zur Berechnung der Signifikanzwerte wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. (Abkürzungen: EGF 5: 5 ng/ml EGF; Cet 0,05: 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 0,1: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 1: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 50: 50 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; p-Wert: Signifikanzwert)								
Zelllinie	Gruppen (X vs. Y)		Median (X)	Minimum/ Maximum (X)	Median (Y)	Minimum/ Maximum (Y)	p-Wert	
	X	Y						
AGS	-	EGF 5	43,38	3,11 / 96,03	62,12	11,65 / 114,63	<0,001	
		EGF 5 +						
	-	Cet 1	43,38	3,11 / 96,03	47,48	8,72 / 88,03	0,007	
		EGF 5 +						
	EGF 5	Cet 1	62,12	11,65 / 114,63	47,48	8,72 / 88,03	<0,001	
		EGF 5 +						
	EGF 5	Cet 50	62,12	11,65 / 114,63	45,77	5,71 / 107,00	<0,001	
	EGF 5	Cet 1	62,12	11,65 / 114,63	40,77	7,16 / 105,51	<0,001	
		EGF 5 +						
	Cet 1	Cet 1	47,48	8,72 / 88,03	40,77	7,16 / 105,51	<0,001	
		EGF 5 +						
	Cet 50	Cet 1	45,77	5,71 / 107,00	40,77	7,16 / 105,51	0,024	
AZ521	-	EGF 5	9,72	2,90 / 75,74	10,35	4,96 / 39,61	0,031	
		EGF 5 +						
	EGF 5	Cet 0,1	10,35	4,96 / 39,61	9,47	3,38 / 23,25	0,020	
	EGF 5	Cet 1	10,35	4,96 / 39,61	10,09	4,89 / 29,76	0,037	
Hs746T		EGF 5 +						
	-	Cet 1	38,65	4,08 / 94,22	34,09	3,38 / 85,96	0,037	
		EGF 5 +						
	EGF 5	Cet 50	38,98	4,81 / 102,36	41,15	6,91 / 112,35	0,042	
		EGF 5 +						
	Cet 1	Cet 50	34,09	3,38 / 85,96	41,15	6,91 / 112,35	<0,001	
		EGF 5 +						
	Cet 1	Cet 1	34,09	3,38 / 85,96	39,22	2,89 / 141,18	0,004	
LMSU	-	EGF 5	33,54	8,99 / 82,52	36,44	8,42 / 80,46	0,046	
		EGF 5 +						
	-	Cet 50	34,55	8,99 / 82,52	38,27	10,30 / 93,21	<0,001	
	-	Cet 1	34,55	8,99 / 82,52	36,58	10,93 / 74,62	0,007	
		EGF 5 +						
		Cet 1	Cet 50	32,82	11,36 / 79,46	38,27	10,30 / 93,21	<0,001
			EGF 5 +					
	Cet 1	Cet 1	32,82	11,36 / 79,46	36,58	10,93 / 74,62	0,010	

MKN1	-	EGF 5	12,60	0,00 / 64,02	15,45	0,55 / 66,63	<0,001
		EGF 5 +					
	-	Cet 0,05	12,60	0,00 / 64,02	13,75	2,26 / 38,30	0,034
		EGF 5 +					
	EGF 5	Cet 0,1	15,45	0,55 / 66,63	12,63	1,26 / 54,91	0,004
		EGF 5 +					
	EGF 5	Cet 1	15,45	0,55 / 66,63	12,87	0,81 / 47,61	0,001
	EGF 5	Cet 1	15,45	0,55 / 66,63	11,78	1,44 / 54,00	<0,001
	EGF 5 +						
	Cet 0,05	Cet 1	13,75	2,26 / 38,30	11,78	1,44 / 54,00	0,010

Tabelle S14

Anteil motiler Zellen der Magenkarzinom-Zelllinien AGS, AZ521, Hs746T, LMSU und MKN1.					
Die Zellen wurden in Medium mit FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Chi Quadrat Test und falls nicht möglich der exakte t-Test nach Fisher verwendet. Es sind alle Signifikanzwerte ≤ 0,050 eingetragen.					
(Abkürzungen: EGF 5: 5 ng/ml EGF; Cet 0,05: 0,05 µg/ml Cetuximab; Cet 0,1: 0,1 µg/ml Cetuximab; Cet 1: 1 µg/ml Cetuximab; Cet 50: 50 µg/ml Cetuximab; p-Wert: Signifikanzwert)					
Zelllinie	Gruppen (X vs. Y)		Relative (absolute) Häufigkeit (X)	Relative (absolute) Häufigkeit (Y)	p-Wert
	X	Y			
AGS	-	EGF 5	220/227 (96,92 %)	228/229 (99,56 %)	0,037 ^a
		EGF 5 +			
	EGF 5	Cet 50	228/229 (99,56 %)	182/189 (96,30 %)	0,025 ^a
	EGF 5	Cet 1	228/229 (99,56 %)	231/239 (96,65 %)	0,038 ^a
Hs746T	-	Cet 1	221/254 (87,01 %)	226/290 (77,93 %)	0,006
	EGF 5 +	Cet 1	189/215 (87,91 %)	226/290 (77,93 %)	0,004
LMSU	-	EGF 5	101/146 (69,18 %)	143/179 (79,89 %)	0,026
		EGF 5 +			
	-	Cet 1	101/146 (69,18 %)	97/166 (58,43 %)	0,049
		EGF 5 +			
	EGF 5	Cet 1	143/179 (79,89 %)	97/166 (58,43 %)	<0,001
		EGF 5 +			
	EGF 5	Cet 50	143/179 (79,89 %)	114/163 (69,94 %)	0,033
	EGF 5	Cet 1	143/179 (79,89 %)	131/189 (69,31 %)	0,020
	EGF 5 +	EGF 5 +			
	Cet 1	Cet 50	97/166 (58,43 %)	114/163 (69,94 %)	0,030
	EGF 5 +				
	Cet 1	Cet 1	97/166 (58,43 %)	131/189 (69,31 %)	0,033
MKN1	-	EGF 5 +	112/222 (50,45 %)	93/241 (38,59 %)	0,010

		Cet 1			
-		Cet 1	112/222 (50,45 %)	65/200 (32,50 %)	<0,001
		EGF 5 +			
EGF 5		Cet 0,05	156/291 (53,61 %)	90/211 (42,65 %)	0,014
		EGF 5 +			
EGF 5		Cet 0,1	156/291 (53,61 %)	108/254 (42,52 %)	0,009
		EGF 5 +			
EGF 5		Cet 1	156/291 (53,61 %)	93/241 (38,59 %)	<0,001
EGF 5		Cet 1	156/291 (53,61 %)	65/200 (32,50 %)	<0,001
EGF 5 +					
Cet 0,05		Cet 1	90/211 (42,65 %)	65/200 (32,50 %)	0,034
EGF 5 +					
Cet 0,1		Cet 1	108/254 (42,52 %)	65/200 (32,50 %)	0,029

Tabelle S15

Motilität der gehungerten Magenkarzinom-Zelllinie MKN1					
Die Zellen wurden in Medium ohne FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Chi Quadrat Test verwendet. Es sind alle Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen. (Abkürzungen: EGF 30: 30 ng/ml EGF; Cet 0,1: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 1: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; p-Wert: Signifikanzwert)					
Zelllinie	Gruppen (X vs. Y)		Relative (absolute) Häufigkeit (X)	Relative (absolute) Häufigkeit (Y)	p-Wert
	X	Y			
MKN1	-	EGF 30	20/107 (18,69 %)	57/102 (55,88 %)	<0,001
	-	EGF 30 + Cet 0,1	20/107 (18,69 %)	20/141 (14,18 %)	0,005
	EGF 30	EGF 30 + Cet 0,1	57/102 (55,88 %)	20/141 (14,18 %)	<0,001
	EGF 30	EGF 30 + Cet 1	57/102 (55,88 %)	43/121 (35,54 %)	0,002
	EGF 30 +				
	Cet 0,1	EGF 30 + Cet 1	20/141 (14,18 %)	43/121 (35,54 %)	<0,001

Tabelle S16

Durchschnittliche Geschwindigkeit der gehungerten Magenkarzinom-Zelllinie MKN1. Zur Berechnung der Signifikanzwerte wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Es sind alle signifikanten Werte $\leq 0,050$ aufgelistet. (Abkürzungen: EGF 30: 30 ng/ml EGF; Cet 0,1: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; Cet 1: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; p-Wert: Signifikanzwert)

Zelllinie	Gruppe (X vs. Y)		Median (X)	Minimum/ Maximum (X)	Median (Y)	Minimum/ Maximum (Y)	p-Wert
	X	Y					
MKN1	-	EGF 30 EGF 30 +	9,60	1,56 / 40,66	16,29	4,84 / 73,79	<0,001
	-	Cet 1 EGF 30 +	9,60	1,56 / 40,66	14,28	2,20 / 44,62	<0,001
	EGF 30	Cet 0,1 EGF 30 +	16,29	4,84 / 73,79	7,54	0,54 / 35,87	<0,001
	EGF 30	Cet 1	16,29	4,84 / 73,79	14,28	2,20 / 44,62	0,012
	EGF 30 +	EGF 30 +					
	Cet 0,1	Cet 1	7,54	0,54 / 35,87	14,28	2,20 / 44,62	<0,001

Tabelle S17

Motilität der Magenkarzinom-Zelllinien Hs746T und MKN1, die mit dem PTK2B- und FAK-Inhibitor PF431396 und/oder Cetuximab behandelt wurden. Die Zellen wurden in Medium mit FKS kultiviert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Chi Quadrat Test verwendet. Es sind alle Signifikanzwerte $\leq 0,050$ aufgelistet. Für Hs746T existieren keine signifikanten Unterschiede. (Gruppen: 1: unbehandelt; 2: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; 3: 100 nMPF431396; 4: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab + 100 nMPF431396; 5: 500 nMPF431396; 6: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab + 500 nMPF431396; Abkürzung: p-Wert: Signifikanzwert)

Zelllinie	Gruppen (X vs. Y)		Relative (absolute) Häufigkeit (X)	Relative (absolute) Häufigkeit (Y)	p-Wert
	X	Y			
MKN1	1	3	46/105 (43,81 %)	52/174 (29,89 %)	0,018
	1	4	46/105 (43,81 %)	23/97 (23,71 %)	0,003
	1	5	46/105 (43,81 %)	45/156 (28,85 %)	0,013
	1	6	46/105 (43,81 %)	20/91 (21,98 %)	0,001
	2	4	43/109 (39,45 %)	23/97 (23,71 %)	0,016
	2	6	43/109 (39,45 %)	20/91 (21,98 %)	0,008

Tabelle S18

Durchschnittliche Geschwindigkeit der Magenkarzinom-Zelllinien Hs746T und MKN1, behandelt mit dem PTK2B- und FAK-Inhibitor PF431396 und/oder Cetuximab. Zur Berechnung der Signifikanzwerte wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Es sind alle signifikanten Werte $\leq 0,050$ aufgelistet. (Gruppen: 1: unbehandelt; 2: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab; 3: 100 nMPF431396; 4: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab + 100 nMPF431396; 5: 500 nMPF431396; 6: 1 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab + 500 nMPF431396; Abkürzung: p-Wert: Signifikanzwert)

Zelllinie	Gruppen (X vs. Y)		Median (X)	Minimum/ Maximum (X)	Median (Y)	Minimum/ Maximum (Y)	p-Wert
	X	Y					
Hs746T	1	3	36,79	4,92 / 102,79	32,15	0,00 / 73,24	0,013
	1	4	36,79	4,92 / 102,79	30,40	3,45 / 69,57	0,019
	1	6	36,79	4,92 / 102,79	27,81	1,20 / 82,89	<0,001
	2	6	32,62	2,80 / 100,46	27,81	1,20 / 82,89	0,038
	5	6	32,67	5,12 / 83,68	27,81	1,20 / 82,89	0,007
MKN1	1	3	13,46	2,15 / 58,12	8,25	1,18 / 27,51	<0,001
	1	4	13,46	2,15 / 58,12	7,87	1,77 / 40,16	<0,001
	1	5	13,46	2,15 / 58,12	9,97	0,72 / 44,68	<0,001
	1	6	13,46	2,15 / 58,12	7,32	1,99 / 33,13	<0,001
	2	3	12,48	1,93 / 62,22	8,25	1,18 / 27,51	<0,001
	2	4	12,48	1,93 / 62,22	7,87	1,77 / 40,16	<0,001
	2	5	12,48	1,93 / 62,22	9,97	0,72 / 44,68	0,003
	2	6	12,48	1,93 / 62,22	7,32	1,99 / 33,13	<0,001
	5	6	9,97	0,72 / 44,68	7,32	1,99 / 33,13	0,046

Tabelle S19

FAK- und PTK2B-Aktivierung und Expression in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN1, behandelt mit dem PTK2B- und FAK-Inhibitor PF431396 und/oder Cetuximab. Die Zellen wurden in FKS-haltigem Medium kultiviert. Zur Berechnung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind alle signifikanten Werte $\leq 0,050$ aufgelistet.

(Gruppen: 1: unbehandelt; 2: 10 nM PF431396. 4 h; 3: 100 nM PF431396. 4 h; 4: 500 nM PF431396. 4 h; 5: 1 μ M PF431396. 4 h. 6: 500 nM PF431396 + 1 μ g/ml Cetuximab. 4 h; 7: 1 μ M PF431396 + 1 μ g/ml Cetuximab. 4 h; 8: 1 μ g/ml Cetuximab. 4 h; 9: 10 nM PF431396. 7 h; 10: 100 nM PF431396. 7 h; 11: 500 nM PF431396. 7 h; 12: 1 μ M PF431396. 7 h; 13: 500 nM PF431396 + 1 μ g/ml Cetuximab. 7 h; 14: 1 μ M PF431396 + 1 μ g/ml Cetuximab. 7 h; Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Zelllinie	Protein-Expression	Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert
		X	Y			
MKN1	pPTK2B	1	8	0,712 \pm 0,225	1,223 \pm 0,149	0,038
		2	8	0,828 \pm 0,104	1,223 \pm 0,149	0,024
			10	0,828 \pm 0,104	1,198 \pm 0,071	0,010
		5	10	0,948 \pm 0,108	1,198 \pm 0,071	0,036
		7	8	0,876 \pm 0,139	1,223 \pm 0,149	0,042
			10	0,876 \pm 0,139	1,198 \pm 0,071	0,037
		8	14	1,223 \pm 0,149	0,719 \pm 0,166	0,018
		10	14	1,198 \pm 0,071	0,719 \pm 0,166	0,024
		11	14	1,101 \pm 0,161	0,719 \pm 0,166	0,046
	FAK	6	14	1,450 \pm 0,378	0,477 \pm 0,086	0,041
		8	12	1,349 \pm 0,189	0,714 \pm 0,223	0,021
			13	1,349 \pm 0,189	0,634 \pm 0,346	0,050
			14	1,349 \pm 0,189	0,477 \pm 0,086	0,007
		9	14	1,083 \pm 0,104	0,477 \pm 0,086	0,002
	pFAK	2	9	0,935 \pm 0,114	1,360 \pm 0,063	0,010
		4	9	0,494 \pm 0,304	1,360 \pm 0,063	0,034
			10	0,494 \pm 0,304	1,305 \pm 0,213	0,024
			12	0,494 \pm 0,304	1,177 \pm 0,178	0,039
		9	11	1,360 \pm 0,063	1,059 \pm 0,081	0,008

Tabelle S20

Einfluss von funktionellem E-Cadherin auf die Expression von E-Cadherin, sowie die Expression und Aktivierung von EGFR, MAPK und AKT in den Zelllinien MKN28, MKN45 und KATOIII. MKN28 wurden mit siRNA, die gegen E-Cadherin gerichtet ist, transfiziert. MKN45 und KATOIII wurden mit einem E-Cadherin-WT-DNA-Plasmid transfiziert. Zur statistischen Auswertung der Signifikanzwerte wurde der Welch t-Test verwendet. Es sind Signifikanzwerte $\leq 0,050$ eingetragen.
(Abkürzungen: MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; p-Wert: Signifikanzwert)

Expression von	Gruppen (X vs. Y)		MW \pm SD (X)	MW \pm SD (Y)	p-Wert
	X	Y			
E-Cadherin	MKN28	MKN45			
		untransfiziert	untransfiziert	1,890 \pm 0,209	1,380 \pm 0,174
	MKN45	KATOIII			
		untransfiziert	untransfiziert	1,890 \pm 0,209	0,583 \pm 0,130
E-Cadherin	MKN28	MKN45			
		transfiziert	transfiziert	1,890 \pm 0,209	0,173 \pm 0,086
E-Cadherin	MKN45	KATOIII			
		untransfiziert	untransfiziert	1,380 \pm 0,174	0,583 \pm 0,130
E-Cadherin	+ KATOIII	KATOIII			
pEGFP	untransfiziert	transfiziert	0,380 \pm 0,095	1,367 \pm 0,332	0,029
EGFR	MKN28	MKN45			
		untransfiziert	untransfiziert	1,467 \pm 0,325	0,603 \pm 0,055
	KATOIII	MKN28			
transfiziert		transfiziert	1,467 \pm 0,325	0,543 \pm 0,326	0,025
pEGFR (Y1068)	untransfiziert	transfiziert	1,420 \pm 0,221	0,693 \pm 0,210	0,015
AKT	MKN45	KATOIII			
		untransfiziert	untransfiziert	1,837 \pm 0,225	0,837 \pm 0,237

8 PUBLIKATIONEN

8.1 Artikel

*Kneissl J, *Keller S, Lorber T, Heindl S, Keller G, Drexler I, Hapfelmeier A, Höfler H, Lubner B. *Association of amphiregulin with the cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines*. Int J Oncol. 2012 Aug;41(2):733-44. *equally contributed

Heindl S, Eggenstein E, Keller S, Kneissl J, Keller G, Mutze K, Rauser S, Gasteiger G, Drexler I, Hapfelmeier A, Höfler H, Lubner B. *Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines*. J Cancer Res Clin Oncol. 2012 Jan 31. [Epub ahead of print]

8.2 Poster

Keller S, Mühlthaler B, Krummhaar M, Kneißl J, Höfler H, Lubner B. *The role of the cell adhesion molecule E-cadherin in cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines*; 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 05.07.2014 - 08.07.2014, München (Abstract angenommen)

Kneißl J, Hartmann A, Keller S, Lorber T, Höfler H, Lubner B. *Her-receptor ligands and their role in cetuximab sensitivity in gastric cancer*; 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 05.07.2014 - 08.07.2014, München (Abstract angenommen)

Keller S, Mühlthaler B, Kneißl J, Heindl S, Höfler H, Lubner B. *Analysis of E-cadherin as a biomarker for individual molecular therapy in gastric carcinoma*; 17th International AEK Cancer Congress, 20.03.2013 - 22.03.2013, Heidelberg

Lubner B, Kneißl J, Keller S, Lorber T, Höfler H. *CANCERMOTISYS – Imaging, Motility Analysis and Characterization of Cell Lines*; Evaluation conference - BMBF funding Medical Systems Biology, 01.06.2010 - 02.06.2010, Freiburg

8.3 Vortrag

Heindl S, Eggenstein E, Keller S, Kneissl J, Keller G, Mutze K, Rauser S, Gasteiger G, Drexler I, Hapfelmeier A, Höfler H, Lubner B. *Relevanz der MET-Aktivierung und genetischer Alterationen von KRAS und E-Cadherin für die Cetuximab-Sensitivität von Magenkarzinom-Zelllinien*; 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., 31.05.2012, Berlin (präsentiert von S. Keller)

9 FÖRDERUNG

Diese Dissertation wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sowie die Anton & Petra Ehrmann Stiftung ermöglicht.

BMBF:

Verbundprojekt Medizinische Systembiologie – MedSys

Systembiologische Untersuchungen der Wirksamkeit eines Krebstherapeutikums auf die Zellbeweglichkeit als Indikator der Metastasierung beim Magenkarzinom (CANCERMOTISYS)

Förderperiode: 15.10.2010 - 31.05.2012

Anton & Petra Ehrmann Stiftung:

Analyse von E-Cadherin als Biomarker für eine individuelle molekulare Krebstherapie beim Magenkarzinom

1. Förderperiode: 01.06.2012 - 31.05.2013

2. Förderperiode plus 1 Verlängerungsmonat: 01.06.2013 - 31.01.2014

BMBF:

Verbundprojekt Maßnahmen zur Etablierung der Systemmedizin – e:Med

Identification of predictive response and resistance factors to targeted therapy in gastric cancer using a systems medicine approach (SYS-Stomach)

Förderperiode: seit 01.02.2014

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Birgit Luber, die es mir ermöglicht hat diese Arbeit zu erstellen. Ich danke ihr besonders für die fachkompetente Betreuung, die wissenschaftliche Unterstützung sowie die Möglichkeit viele Kongresse zu besuchen und Teile meiner Arbeit dort zu präsentieren.

Herrn Prof. Martin Klingenspor danke ich an dieser Stelle für seine Bereitschaft, diese Doktorarbeit als Erstprüfer zu bewerten. Frau Prof. Hannelore Daniel danke ich für ihr Einverständnis den Vorsitz meiner Prüfungskommission zu übernehmen.

Herrn Prof. Heinz Höfler möchte ich für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München durchführen zu dürfen, danken.

Meiner Arbeitsgruppe (Dr. Julia Kneißl, und Dr. Stefan Heindl) danke ich für wissenschaftliche Diskussionen, die freundliche und hilfsbereite Unterstützung im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre. An dieser Stelle möchte ich auch allen Masterstudenten (Thomas Lorber, Verena Grabher-Meier, Bernadette Mühlthaler und Marina Krummhaar), die zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben, danken.

Für die Beratung und Erklärungen bei statistischen Fragen danke ich Dr. Alexander Hapfelmeier.

Ein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Pathologie, ehemaligen wie aktuellen, für ihre große Hilfsbereitschaft und Kollegialität. Besonders danke ich Lukas, Stefan, Katharina, Claudia und Kathrin für diverse fachliche und „über-den-Tellerrand-blickende“ Diskussionen und für all den Spaß bei und nach der Arbeit.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, die mir immer wieder gezeigt haben, dass eine ausgeglichene *Work-Life-Balance* wichtig und auch machbar ist.

Zum Schluss danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und mir das Studium und die Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

DANKESCHÖN!!