

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der  
Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

**In vitro-Untersuchungen zur Wirksamkeit von Erlotinib, Gefitinib und  
Cetuximab bei der Behandlung des Kopf-Hals-Karzinoms**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Norbert Bruno Neckel  
aus Schweinfurt

Würzburg, November 2016

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Urs Müller-Richter

Korreferentin: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

17.03.2017

Der Promovend ist Zahnarzt

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1. Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich.....                     | 1         |
| 1.1. Epidemiologie.....  | 2         |
| 1.2. Ätiologie .....   | 3         |
| 1.3. Klassifikationen .....  | 4         |
| 1.4. Therapie .....  | 6         |
| 2. Der epidermal growth factor receptor und das Kopf-Hals-Karzinom ..... | 9         |
| 2.1. Der monoklonale Antikörper Cetuximab .....                          | 14        |
| 2.2. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib und Gefitinib.....           | 15        |
| 3. Fragestellung und Zielsetzung.....                                    | 17        |
| <b>II. Material und Methoden</b> .....                                   | <b>18</b> |
| 1. Chemikalien, Materialien und Geräte.....                              | 18        |
| 2. Zelllinien .....  | 22        |
| 3. Zellkultur .....  | 23        |
| 3.1. Zellzählung .....   | 24        |
| 3.2. Versuchsaufbau.....   | 24        |
| 3.3. Kristallviolett-Assay .....   | 25        |
| 4. Western Blot .....  | 26        |
| 5. Statistik.....  | 28        |
| <b>III. Ergebnisse</b> .....   | <b>29</b> |
| 1. Cetuximab Einzeltherapie .....  | 29        |
| 2. Einzeltherapien mit Erlotinib und Gefitinib .....                     | 34        |
| 3. Kombination 1.....  | 48        |
| 4. Kombination 2.....  | 51        |
| 5. Vergleich der relevanter Serumkonzentrationen .....                   | 55        |
| 6. Western Blot Analyse.....   | 57        |
| 7. Zusammenfassung der Ergebnisse.....                                   | 59        |
| <b>V. Diskussion</b> .....   | <b>61</b> |
| 1. Grundlegendes zu den verwendeten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien .....  | 62        |
| 2. Vergleich der Einzeltherapien .....                                   | 63        |
| 3. Analyse der Kombinationstherapien.....                                | 69        |
| 4. Western Blot-Analyse.....   | 70        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5. Schlussfolgerungen .....                         | 72        |
| 5.1    Ausblick .....                               | 73        |
| <b>VI. Zusammenfassung .....</b>                    | <b>75</b> |
| <b>VII. Abkürzungsverzeichnis .....</b>             | <b>77</b> |
| <b>VIII. Literaturverzeichnis.....</b>              | <b>80</b> |
| <b>IX. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b> | <b>91</b> |
| 1.    Tabellenverzeichnis.....                      | 91        |
| 2.    Abbildungsverzeichnis.....                    | 91        |

# I. Einleitung

## 1. Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Kopf-Hals-Tumore sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien verschiedener anatomischer Strukturen und Gewebe. Da über 90 % dieser jedoch auf Plattenepithelkarzinome entfallen, werden sie in der Literatur häufig stellvertretend mit dem Begriff Kopf-Hals-Karzinom assoziiert, welcher im englischen Sprachgebrauch als Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) übersetzt wird [1, 2]. Diese Karzinome entstehen durch Entartung ihres Ursprungsgewebes in der mukosalen Epithelschicht des oberen Aerodigestivtrakts [1]. Knapp über 5 % der Karzinome hingegen entfallen auf Adenokarzinome, welche sich insbesondere im Bereich der Kopfspeicheldrüsen finden und Drüsengewebe entspringen [2]. Neben der Art des Karzinoms bzw. Tumors spielt auch die anatomische Lage eine Rolle für die Einteilung von Kopf-Hals-Tumoren. Tumorentitäten aus dem Bereich der Nasennebenhöhlen, des Mittelohrs sowie der Speicheldrüsen erfordern aufgrund anatomischer und biologischer Gesichtspunkte eine getrennte Betrachtung. Sie werden zwar zu den Kopf-Hals-Tumoren gezählt, jedoch in der Regel separat beschrieben [3-5]. Nach der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme können die Kopf-Hals-Malignome nach ICD-10 unterteilt werden [6]:

|             |  |
|-------------|--|
| C 00 – C 14 | Bösartige Neubildungen der Lippe, der Mundhöhle und des Pharynx                                  |
| C 30 – C 32 | Bösartige Neubildungen der Nasenhöhle und des Mittelohres, der Nasennebenhöhlen sowie des Larynx |

## 1.1. Epidemiologie

Kopf-Hals Karzinome stellen ein globales Gesundheitsproblem dar. In Europa findet sich zahlenmäßig mit ca. 20 % der Neuerkrankungen die zweithöchste Inzidenz weltweit. Nur Asien verzeichnet mit etwa 60 % deutlich mehr Fälle [7]. Die höchste Inzidenzrate ist hingegen in Melanesien mit einer altersstandardisierten Rate (ASR) von 26,7 pro 100.000 Einwohner zu beobachten, gefolgt von Süd-Zentral-Asien und der WHO-Region Süd-Ost-Asien mit einer ASR von jeweils 16,7 [7]. Westeuropa liegt mit einer ASR von 15,9 an 4. Stelle [7]. Deutschland liegt, gefolgt von Tschechien, innerhalb des Kontinents bei Männern hinter Frankreich, Belgien und Dänemark an 4. Stelle [2]. Gemäß aktueller Hochrechnungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) erkrankten 2011 etwa 14.000 Menschen an Mund- und Rachenkrebs (C 00 – 14). Der überwiegende Teil waren hierbei Männer, bei welchen dies sogar die 7. häufigste maligne Erkrankung darstellt, mit einer Rate von 19,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, im Vergleich zu nur 6,4 pro 100.000 Einwohner bei Frauen [5, 8]. Das altersspezifische Erkrankungsmaximum lag bei Männern in den Jahren 2009 bis 2010 zwischen dem 60. und 64. Lebensjahr. Neben diesem Zeitraum wird bei Frauen in der Altersgruppe über 85 Jahren ein zweiter Erkrankungsgipfel beschrieben [2].

Die altersstandardisierte Inzidenzrate ist laut der Datenbank „GLOBOCAN“ in Regionen mit sehr hohem Entwicklungsstand am größten. Niedriger liegt diese in Gegenden mit hohem und mittlerem Entwicklungsgrad. Bei niedrigem Entwicklungsniveau allerdings findet sich eine nahezu ebenso hohe Inzidenzrate wie in sehr hoch entwickelten Regionen, welche nur leicht unter dem dortigen Höchstwert liegt [7]. Dennoch ist die Mortalitätsrate bei Tumoren der Lippen, Mundhöhle und des Pharynx in Ländern mit nach Human Development Index hohem Wohlstand nach altersstandardisierter Mortalitätsrate deutlich geringer [7]. Nichtsdestotrotz starben in den Jahren 2009 bis 2010 rund 10.000 Menschen in Deutschland an den Folgen des Mund- und Rachenkrebses. Wie bei den Neuerkrankungen variieren auch bei der Mortalitätsrate die Zahlen zwischen den

Geschlechtern sehr stark. Diese liegt in Deutschland bei Männern mit 7,2 pro 100.000 Einwohnern vierfach höher als bei Frauen. Auch die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist beim männlichen Geschlecht mit 44 bis 50 % deutlich unter der weiblichen mit im Schnitt 61 %, welche dennoch nicht als günstig bezeichnet werden kann [2].

## 1.2. Ätiologie

Tumorwachstum und -entstehung beruhen auf einer Vielzahl von molekularbiologischen Veränderungen. Daher kann es oft Jahre bis Jahrzehnte dauern, bis sich makroskopisch sichtbare Dysplasien und letztlich Tumoren entwickeln. Zellen durchlaufen hierbei verschiedene Stadien histopathologischer Veränderungen, welche auf einer Akkumulation genetischer und epigenetischer Alterationen beruhen [9]. Entscheidenden Einfluss hierauf haben Risikofaktoren, welche mit der jeweiligen Tumorentität assoziiert sind.

Für das Kopf-Hals-Karzinom sind zwei Risikofaktoren von herausragender Bedeutung: Tabakrauch und übermäßiger Alkoholgenuss [5]. Diese beiden Einflussgrößen alleine erhöhen das Risiko für ein Plattenepithelkarzinom, doch der Konsum beider Stoffe in Kombination ist aufgrund potenzierender Effekte umso gefährlicher [10-14]. Unabhängig von diesen beiden klassischen Faktoren sind humane Papillomaviren, insbesondere Typ 16, als Risikofaktor anerkannt [5, 15]. Dieser Umstand bedingt auch einen tendenziellen demographischen Wandel von Patienten mit klassischem Risikoprofil hin zu jüngeren Patienten [1]. Entsprechend der sexuellen Übertragbarkeit dieser Viren können ungeschützter Geschlechtsverkehr bzw. oral-genitale oder oral-anale Praktiken zum Risikoprofil beitragen [16]. Es scheint molekularbiologische Unterschiede zwischen HPV-positiven und -negativen Kopf-Hals-Karzinomen zu geben, welche sich auch in einer besseren Prognose ersterer niederschlagen scheinen [1, 17].

Neben diesen können schlechte Mundhygiene, übermäßige mechanische Belastung, Sonnenexposition im Bereich der Lippen, Vitamin- und Eisenmangel oder ein kompromittiertes Immunsystem gefährdend sein [2, 18].

In Bezug auf das Nasopharynxkarzinom sind EBV-Viren und berufliche Exposition durch Chemikalien oder Stäube als Risikofaktoren charakteristisch [19-21].

Risikofaktoren alleine führen nicht zwangsweise zu einer Krebserkrankung, begünstigen diese jedoch. So scheint eine gewisse genetische Prädisposition eine Rolle zu spielen, damit es zur Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms des oberen Aerodigestivtraktes kommen kann [22-24].

### 1.3. Klassifikationen

Die Tatsache, dass sich mit fortschreitendem Tumorwachstum auch die Prognose von malignen Erkrankungen verschlechtert, führte ab Mitte der 1940er Jahre zur Entwicklung der anatomisch orientierten TNM-Klassifikation maligner Tumoren durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC), welche als Grundlage zur Einteilung bösartiger Tumore in Stadien dient. Dies erleichtert die Behandlungsplanung, die Einschätzung von Prognose sowie Behandlungserfolg und fungiert als Vergleichs- und Kommunikationshilfsmittel in Klinik und Forschung. Man unterscheidet zwischen klinischer (cTNM) und pathologischer (pTNM) TNM-Klassifikation, je nachdem ob diese durch klinische Untersuchung und Bildgebung, oder auf Grundlage feingeweblicher Analysen erhoben wurde [25-27]. Aufgrund anatomischer Gegebenheiten existieren im Kopf-Hals-Bereich, je nach Lokalisation, Unterschiede in der genauen Klassifizierung. Dies findet besondere Berücksichtigung bei der Infiltration von Nachbarstrukturen [25-27]. Die folgende Tabelle fasst lediglich die TNM-Klassifikation von Lippe und Mundhöhle sowie des Oro- und Hypopharynx zusammen und soll der Übersicht dienen:

Tabelle 1: Zusammenfassung der TNM-Klassifikation des Plattenepithelkarzinoms der Lippe, Mundhöhle (blau hinterlegt) sowie des Oro- und Hypopharynx (gelb hinterlegt)

| <b>T</b>                                      | <b>Primärtumor</b>   |                      |
|---|--|----------------------|
|   | Lippe und Mundhöhle  | Oro- und Hypopharynx |
| <b>(p)TX</b>                                  | Primärtumor nicht beurteilbar  |                      |
| <b>(p)T0</b>                                  | Kein Nachweis des Primärtumors   |                      |
| <b>(p)Tis</b>                                 | Carcinoma in situ  |                      |
| <b>(p)T1</b>                                  | Tumordurchmesser < 2cm   |                      |
| <b>(p)T2</b>                                  | Tumordurchmesser > 2 bis 4 cm  |                      |
| <b>(p)T3</b>                                  | Tumordurchmesser > 4 cm  |                      |
| <b>(p)T4 a</b>                                | Tumorinfiltration von direkten Nachbarstrukturen   |                      |
|   | ➤ Durchbruch der Kortikalis, N. alveolaris inf., Mundboden, Haut, Zungenmuskulatur oder Nasennebenhöhlen   |                      |
|   | ➤ Pharynx: Larynx, Muskulatur der Zunge, mediales Pterygoid, harter Gaumen oder Mandibula<br>➤ Hypopharynx: Cartilago thyroidea/cricoidea, Os hyoideum, Glandula thyroidea, Ösophagus, zentrales Bindegewebe |                      |
| <b>(p)T4 b</b>                                | Tumorinfiltration von umgebenden Nachbarstrukturen   |                      |
|   | ➤ Spatium masticatorium, Schädelbasis oder A. carotis interna  |                      |
|   | ➤ Pharynx: M. pterygoideus lat., Lam. lat. des Os pterygoideum, lat. Nasopharynx, Schädelbasis oder A. carotis interna<br>➤ Hypopharynx: Paravertebrale Faszien, A. carotis interna, Mediastinum             |                      |
| <b>N</b>                                      | <b>Regionale Lymphknoten</b>   |                      |
| <b>NX</b>                                     | Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar  |                      |
| <b>N0</b>                                     | Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar   |                      |
| <b>(p) N1</b>                                 | Einzelner betroffener Lymphknoten ipsilateral befallen ≤ 3cm Durchmesser   |                      |
| <b>(p) N2 a</b>                               | Einzelner betroffener Lymphknoten > 3 bis 6 cm Durchmesser   |                      |
| <b>(p) N2 b</b>                               | Mehrere ipsilaterale Lymphknoten ≤ 6 cm  |                      |
| <b>(p) N2 c</b>                               | Bilateral oder kontralateral betroffene Lymphknoten ≤ 6 cm   |                      |
| <b>(p) N3</b>                                 | Betroffene(r) Lymphknoten > 6cm  |                      |
| <b>M</b>                                      | <b>Fernmetastasen</b>  |                      |
| <b>M0</b>                                     | Kein Nachweis für Fernmetastasen   |                      |
| <b>M1</b>                                     | Fernmetastasen   |                      |
| Modifiziert nach Sobin und Wittekind [25, 26] |  |                      |

Ein weiterer entscheidender Wert, mit Hilfe dessen eine bessere Einschätzung zur Malignität eines Tumors erfolgen kann, ist das Grading. Es handelt sich hierbei um eine histopathologische Beurteilung des Differenzierungsgrades von Tumorzellen. Die Klassifikation reicht von gut differenzierten (Stadium G1) bis hin zu undifferenzierten Zellen (Stadium G4), welche jegliche spezifische Morphologie und Funktion ihres Ursprungsgewebes verloren haben [25, 28]. Der C(ertainty)-Faktor gibt Auskunft über die Aussagekraft der Untersuchungen welche zur Evaluierung des Tumorstadiums herangezogen wurden. Standarduntersuchungen werden hier mit C1 bewertet. Den höchsten C-Faktor haben die pathohistologische Untersuchung resezierter Gewebe (C4) sowie der Nachweis durch Autopsie (C5) [25-27].

Anhand dieser und weiterer Nebenfaktoren kann letztlich eine Einteilung in Tumorstadien von 0 bis IV erfolgen. Diese wiederum sind charakteristisch für das zugrunde liegende Malignom [25]. Die Einstufung ermöglicht es dann, adäquate Therapiestrategien zu entwickeln.

#### 1.4. Therapie

Die Therapie von Kopf-Hals-Tumoren stützt sich auf drei unterschiedliche Therapieverfahren: Die Operation, die Radiotherapie sowie die Chemotherapie.

Das genaue Vorgehen wird interdisziplinär, unter Berücksichtigung des individuellen Falls, durch die Abstimmung von MKG-Chirurgen, HNO-Ärzten, Strahlentherapeuten, Onkologen, Pathologen und Radiologen geplant und durchgeführt. Zur konkreten Therapieempfehlung sind außerdem entsprechende Staginguntersuchungen notwendig.

Entscheidend für die Wahl der Behandlung sind dann unterschiedliche Faktoren, wie Resektabilität des Tumors, Wahrscheinlichkeit funktioneller

Beeinträchtigungen, Wünsche des Patienten sowie dessen allgemeiner Gesundheitszustand bzw. biologisches Alter [5, 27].

Aufgrund der großen Varianz und Heterogenität dieser Tumoren sind die Therapieansätze nicht in allen Belangen einheitlich. So konnte zwar für T1 und T2 Tumore keine Überlegenheit der Operation gegenüber der alleinigen Strahlentherapie nachgewiesen werden, wohl aber für fortgeschrittene Stadien (T3, T4), bei denen es zu einer erhöhten Rezidivrate unter alleiniger Strahlentherapie kam [29-32].

Nach aktueller Leitlinie wird für diese die Kombination von Radiotherapie und Operation empfohlen [31]. Angestrebt wird hierbei immer die R0-Resektion, das heißt die vollständige Entfernung, ohne Nachweis mikroskopischer Tumorreste. Wird dieses Ziel verfehlt, sollte eine Nachresektion durchgeführt werden [33]. Aufgrund einer Wahrscheinlichkeit von 20 % bis 40 % für das Auftreten okkultter Metastasen wird weiterhin eine sogenannte elektive Lymphknotenausräumung (sog. Neck Dissection) empfohlen, selbst wenn diese bei Befunderhebung unauffällig sind [34]. Bei nachgewiesenem Befall der Lymphknoten hingegen handelt es sich um eine kurative Neck Dissection, mit dem Ziel sämtliche Metastasen sowie Lymphknoten und weiteres Gewebe im Halsbereich zu entfernen [5].

Die Strahlentherapie stellt neben der Operation den zweiten großen Pfeiler der Versorgung von Kopf-Hals-Karzinomen dar. Diese kann sowohl als Einzeltherapie, als auch in Kombination mit operativen, wie auch chemotherapeutischen Maßnahmen angewendet werden.

Wie bereits erwähnt beschränkt sich die alleinige Radiatio bei Pharynx- und Mundhöhlenkarzinomen auf kleine Tumoren. Hier ist aufgrund der Nebenwirkungen jedoch vorrangig die Operation als Alternative zu erwägen. Beim Larynxkarzinom und stellenweise bei Hypopharynxkarzinomen hingegen kann auch bei höhergradigen Tumoren eine Radiochemotherapie mit gegebenenfalls anschließender alleiniger Radiotherapie Anwendung finden [35]. In Kombination mit einer Operation findet die Bestrahlung in der Regel als adjuvante Therapie

postoperativ statt. Indikationen hierfür sind große Tumoren (T3 und T4), knappe (<5mm) oder nicht freie Resektionsgrenzen (R+), Lymphknotenmetastasen, perineurales Wachstum oder lymphovaskuläre Infiltration. Bestrahlung vor der eigentlichen Tumorentfernung beschränkt sich vor allem auf primär nicht resektable Kopf-Hals-Karzinome. Die Gesamtdosis der Bestrahlung beträgt je nach Indikation etwa 50 bis 70 Gy, wobei der das Tumorbett ca. 65-70 Gy aufweisen sollte. Diese kann konventionell fraktioniert (ca. 2 Gy tgl. 5 x pro Woche), aber auch hyperfraktioniert (1,1 bis 1,2 Gy 2x tgl.) oder akzeleriert (mehr als 10 Gy pro Woche) verabreicht werden [5, 27].

Im Gegensatz zu den beiden anderen Therapieformen gibt es für die Chemotherapie keinen Nachweis der Effektivität einer Monotherapie, wohingegen sich für bestimmte Indikationen aus der kombinierten Radiochemotherapie auch gegenüber der alleinigen Strahlentherapie Vorteile ergeben [36-38].

Gemäß der aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (DGMKG) findet die Radio- oder Polychemotherapie derzeit nur in folgenden Fällen Anwendung [39]: Vorteile einer primären Radiochemotherapie ergeben sich hiernach bei unter 70-jährigen Patienten mit nicht operablem Mundhöhlenkarzinom ohne Metastasen [36, 37]. Besonders unter 60-jährige profitieren dabei mit einem relativen Überlebensvorteil von 22-24 %, wobei Cisplatin hier eine herausragende Rolle zukommt [36, 37, 40, 41]. Hierbei kommen insbesondere die chemosensitivierenden Eigenschaften Cisplatins zum tragen, welche das betroffene Gewebe empfänglicher für eine Bestrahlung machen [42, 43]. Beim palliativen Einsatz der Chemotherapie hingegen kommt es zwar zu klinisch relevanten Ansprechraten, eine Verlängerung der Überlebenszeit konnte jedoch nicht gezeigt werden [44]. Es gibt außerdem auch Hinweise darauf, dass sich bei der Kombination konventioneller Therapie mit Chemotherapie ein Vorteil zugunsten einer Kombinationstherapie ergeben kann [45].

Neue Ansätze der generellen Tumorthherapie finden sich besonders im Bereich der zielgerichteten Chemotherapeutika (= medikamentöse Tumorthherapie), von denen Imatinib, welches die Therapie der chronisch myeloischen Leukämie revolutionierte,

wohl am deutlichsten das Potential dieser Medikamentengruppe unterstreicht [46, 47]. Als Angriffspunkt einer solchen „targeted therapy“ dienen besonders Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, insbesondere der epidermal growth factor receptor (EGFR) [48].

## 2. Der epidermal growth factor receptor und das Kopf-Hals-Karzinom

Wachstumsfaktoren dienen als Signalmoleküle dem Informationsaustausch von Zellen mit ihren Nachbarzellen sowie dem umliegenden Gewebe. Um diese Signale zu verstehen ist jede Zelle mit einer Reihe von Rezeptoren ausgestattet, welche diese Information entschlüsseln und in Form von intrazellulären Signalkaskaden in die Sprache der Zelle übersetzen. Dies ermöglicht es, Signale und Stimuli, welche von außen an die Zelle herangetragen werden, durch die normalerweise als Barriere fungierende Zellmembran hindurch ins Zellinnere weiterzuleiten und somit eine adäquate Reaktion dieser hervorzurufen. So kann durch interzelluläre Koordination des Wachstums unter anderem vermieden werden, dass Zellen ihrem Umgebungsgewebe Schaden zufügen [9].

1962 beschrieb Stanley Cohen erstmals ein Phänomen, welches die Schneidezahneruption und die Augenöffnung neugeborener Mäuse zu beschleunigen vermochte und erhielt später, aufgrund der Bedeutung seines Fundes, 1986 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für die Entdeckung des bedeutenden EGF-Rezeptors [106-108]. Fortschritte im Bereich der Tumorbilogie führten im Laufe der Zeit zu der Erkenntnis, dass der EGF-Rezeptor eine wichtige Rolle bei verschiedenen Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom, dem Glioblastoma multiforme oder dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom spielt [109-111]. Es handelt sich hierbei um einen Wachstumsfaktorrezeptor, den epidermal growth factor receptor, kurz EGFR oder ErbB-1 (erythroblastic leukemia viral oncogene), welcher beim Menschen auch als HER 1 (human epidermal growth

factor receptor) bezeichnet wird. Er gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen aus der Familie der ErbB-Rezeptoren [49].

Zu diesen zählen vier Rezeptoren (ErbB 1 bis 4 oder HER 1 bis 4). Sie zeichnen sich durch die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren aus. Dies wird, abgesehen von HER 2, durch die Bindung eines Liganden initiiert [50-52]. Durch Induktion von Kinaseaktivität führt das dazu, dass sich Tyrosinreste an deren intrazellulären, C-terminalen Enden autophosphorylieren, wobei HER 3 nur über eine schwache Kinaseaktivität verfügt und auf einen potenteren Dimerisierungspartner angewiesen ist [52, 53]. Hierbei fungiert jeweils ein Rezeptor als Donor, der andere als Akzeptor, wobei erstgenannter das C-terminale Ende seines Partners phosphoryliert. Auf diese Weise kann selbst ein medikamentös blockierter Rezeptor noch von einem Dimerisierungspartner aktiviert werden [54-56]. Heterodimerisierung bedeutet, dass dieser Rezeptor auch mit Verwandten Rezeptoren aus der ErbB-Familie Paare bilden kann und so Signale ins Zellinnere sendet, auch ohne dass er zwingend auf einen weiteren EGF-Rezeptor angewiesen ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch andere Tyrosinkinasen, wie c-Met oder der IGF-1-Rezeptor zur Heterodimerisierung mit EGFR befähigt sind [57, 58]. Durch den „Down-stream“ der reziproken Phosphorylierung kommt es im Zellinneren zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die miteinander oder mit anderen Signalwegen der Zelle interagieren („cross-talk“). Diese Prozesse ermöglichen eine komplexe Regulation intrazellulärer Funktionen bis hin zur Genexpression und sind somit die Grundlage für eine differenzierte Zellantwort auf extrazelluläre Reize. Die MAPK und PI3K-AKT Signalwege, welche in Abbildung 1 grafisch dargestellt sind, stellen nach derzeitigem Stand die beiden Hauptwege im EGFR- Signalweg dar [9, 59].

Ein weiterer wichtiger Vertreter der ErbB-Rezeptorfamilie ist Her2/neu, welcher beim Mammakarzinom eine bedeutende Rolle spielt und schon lange bei Überexpression als prognoseverschlechternd gilt [60]. Auch bei Speicheldrüsenkarzinomen ist dieser häufig exprimiert und geht sogar mit schlechtem Differenzierungsgrad und ungünstiger Prognose einher [61, 62]. Außerdem dient er in besonderem Maße als Heterodimerisierungspartner für

andere Mitglieder der ErbB-Familie (ErbB 1, ErbB3 und ErbB 4), da er im Gegensatz zu diesen konstitutiv, also auch ohne Bindung eines Liganden dimerisieren kann und keinen ErbB-Liganden direkt bindet [52, 63, 64].

Der EGF-Rezeptor selbst scheint weiterhin nicht zwingend abhängig von EGF zu sein. Neben diesem wurden bisher bereits fünf weitere verwandte Liganden gefunden die diesen Rezeptor ebenfalls binden und aktivieren können [9, 64].

In ihrer Funktion als Wachstumsfaktoren sind diese Rezeptoren von großer Bedeutung für das Wachstum, die Proliferation und das Überleben von Zellen, was bei Dysregulation jedoch zur Tumorentstehung beitragen kann [9, 48, 65, 66]. In der Regel ist das Niveau der EGFR-Expression normaler Körperzellen sehr gering [9]. In Karzinomen, wie dem HNSCC, ist eine Überexpression von EGFR jedoch häufig zu beobachten [67-69]. Grandis und Twardy fanden diese sogar in über 90 % der Fälle untersuchter Kopf-Hals-Karzinome [68]. Des Weiteren stehen bei Kopf-Hals-Karzinomen eine ungünstige Prognose sowie ein schlechter Differenzierungsgrad des Tumors mit einem hohen Expressionsniveau an EGFR in Zusammenhang [70, 71]. Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von EGFR einen unabhängigen negativen prognostischen Parameter für das krankheitsspezifische Überleben darstellt [72]. Neben der vermehrten Expression spielen beim Lungenkarzinom Mutationen des Rezeptors, welche die bereits erwähnten Signalkaskaden beeinflussen, eine Rolle. Dies trifft besonders bei bestimmten Patientengruppen zu: Eine Häufung des positiven Mutationsstatus findet sich hier bei Adenokarzinomen sowie bei Karzinomen von lebenslangen Nichtrauchern, Frauen und Asiaten [73]. Bei Kopf-Hals-Tumoren sind Mutationen des EGFR bei Kaukasiern allerdings außerordentlich selten [74].

Aufgrund der onkogenen Eigenschaften dieses Rezeptors und seiner Signalwege wurde eine Reihe von Medikamenten entwickelt, die entweder als Antikörper, z.B. Cetuximab oder Panitumumab, an den Rezeptor binden, oder allosterisch die ATP-Bindungstasche der Tyrosinkinase des EGFR blockieren, um somit die Signalweitergabe zu unterbrechen. Unter letzteren sollen Erlotinib und Gefitinib spezifisch am EGFR wirken [75].

Es bleibt jedoch trotz Allem anzumerken, dass Veränderungen im Expressionsmuster sowie dessen Hochregulierung lediglich einen Baustein unter vielen darstellt, welche zu einer Tumorgenese und Progression beitragen. Dies dürfte die therapeutischen Möglichkeiten, durch ein alleiniges gezieltes Ausschalten des EGF-Rezeptors begrenzen [74, 76, 77]. Die folgende Grafik stellt die wichtigsten Liganden und Signalwege des EGF-Rezeptors dar:

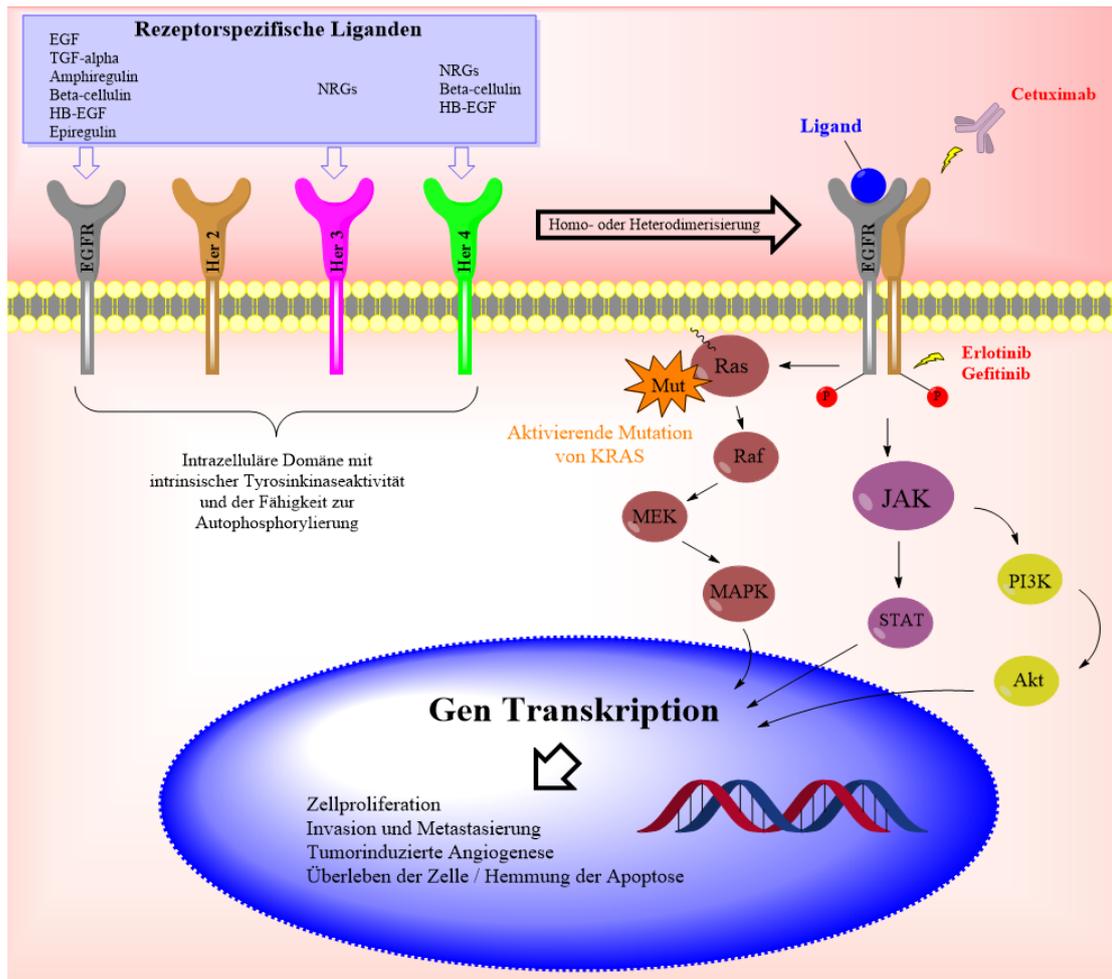


Abbildung 1: Übersicht über die ErbB-Familie, mit den wichtigsten downstream pathways für den EGFR. Bei Binden eines der angegebenen rezeptorspezifischen Liganden kommt es zur Homo- bzw. Heterodimerisierung zweier Rezeptoren. Durch ATP-abhängige Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen werden nun Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche im Zellkern (blau dargestellt) letztlich zu entsprechenden Veränderungen der Genexpression führen. Medikamentös kann dies durch monoklonale Antikörper (z.B. Cetuximab) von extrazellulär oder Tyrosinkinaseinhibitoren (z.B. Erlotinib oder Gefitinib) auf der zytoplasmatischen Seite unterbunden werden. Hierauf wird im weiteren Verlauf näher eingegangen. Aktivierende Mutationen (hier als Mut bezeichnet) von KRAS können zu einem EGF-unabhängigen Signalfluss führen und gelten als negativer prognostischer Faktor für eine Therapie mit Cetuximab [78-80]. Stellvertretend für viele weitere Resistenzmechanismen ist dieser, als einer der bekanntesten, hier aufgeführt.

Modifiziert nach Ciardiello, Khambata-Ford und Scaltriti [64, 78, 81].

## 2.1. Der monoklonale Antikörper Cetuximab

Cetuximab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Maus-Antikörper vom Typ IgG1, welcher spezifisch an die extrazelluläre Domäne des EGFR bindet und somit eine Blockade dessen bewirkt, was neben der Einschränkung der Funktion auch eine Internalisierung und den Abbau des Rezeptors zur Folge hat [75, 82, 83]. Die Wirksamkeit von Cetuximab als Tumorthapeutikum konnte insbesondere für das kolorektale Karzinom (CRC) sowie das HNSCC nachgewiesen werden [84-88]. Bei letzterem konnte ein signifikanter Vorteil der Kombinationstherapie mit Cetuximab gegenüber einer rein platinbasierten Therapie mit 5-Fluorouracil gezeigt werden [88]. Gleichzeitig sind aber Nebenwirkungen wie Sepsis oder schwerer Hautausschlag bei Anwendung von Cetuximab häufiger [88]. Die positiven Effekte beim fortgeschrittenen, metastasierten und rezidierten Kopf-Hals-Karzinom, wie von Vermorken et al. beschrieben, konnten in der „EXTREME“-Studie bestätigt werden [89]. Dennoch zeigt sich, in Bezug auf das Ansprechen der Therapie mit Cetuximab beim HNSCC, dass sich gerade bei Auftreten von Hautausschlag ein Überlebensvorteil ergibt [90]. Dies legt nahe, dass die Wirkung dieses Antikörpers nicht lediglich durch die Blockierung der EGF-Bindungsstellen, sondern ebenso durch eine Triggerung des Immunsystems zustande kommt. Daher wird die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) als ein Mechanismus der Wirkungsweise von Cetuximab genannt [91]. Dieser beruht anscheinend auf der Aktivierung eines zellulären Angriffs durch Natural-Killer(NK)-Zellen auf Tumorzellen und bewirkt somit höhere Ansprechraten auf Therapie, welche auch von Levy et al. beschrieben wurden [92]. Diese konnten ebenso zeigen, dass die Expression der Kolonkarzinomzellen vom HLA-E-Typ die Effektivität von Cetuximab einschränken kann. Unter dem immunmodulierenden Einfluss von HLA-E konnte nur noch unter hohen Konzentrationen ein wachstumshemmender Effekt beobachtet werden, was die Autoren zu der Annahme veranlasst, dass der hauptsächliche Wirkmechanismus der Tumorbekämpfung durch Cetuximab auf die ADCC zurückzuführen ist [92].

Es ist davon auszugehen, dass noch weitere Faktoren bei diesen Prozessen eine Rolle spielen und nicht allein die Blockade des EGFR zu den erwünschten Effekten bei der Tumorthherapie mit Cetuximab führt.

Erst kürzlich konnten Egloff et al. in einer Phase-2 Studie eine Relation der Ansprechrate mit dem HPV-Status des Tumors nachweisen. Im Vergleich zu HPV-negativen HNSCCs konnte ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben sowie Gesamtüberleben bei HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen gefunden werden, wenn eine Kombination aus Cetuximab, Cisplatin und Radiotherapie angewandt wurde [17]. Hierin zeigt sich erneut, dass HPV-positive und HPV-negative Kopf-Hals-Karzinome als unterschiedliche Entitäten aufzufassen sind.

## 2.2. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib und Gefitinib

Wie bereits beschrieben gehören Erlotinib sowie Gefitinib in die Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) und binden reversibel an die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne bzw. die dort lokalisierte ATP-Bindungstasche. So verhindern sie die Phosphorylierung und die damit verbundene Signalweitergabe innerhalb der Zelle [93]. Ihre Affinität zur ATP-Bindungstasche der Rezeptortyrosinkinase verdanken diese strukturell sehr ähnlichen Medikamente ihrem Anilinoquinazolinskelett, welches in beiden Fällen als Grundgerüst dient (Abb. 2) [9]. Auch wenn Erlotinib bereits beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) erfolgreich eingesetzt wird, so bestehen aktuell Zweifel, was die Wirksamkeit beim HNSCC betrifft [94, 95]. Bemerkenswert ist hier jedoch, dass besonders bei Nachweis von EGF-Rezeptor-Mutationen in Lungenkarzinomzellen ein verbessertes Ansprechen auf Therapie als bei Karzinomen ohne Mutation des Rezeptors zu beobachten war [96]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Lungenkarzinomen konnten Martins et al. bei lokal fortgeschrittenem Kopf-Hals-Karzinom keinen signifikanten Vorteil einer zusätzlichen Gabe von Erlotinib bei cisplatinbasierter Radiochemotherapie nachweisen [95].

Weiterhin gib es Hinweise darauf, dass Erlotinib noch andere Signalwege, die durch Mutationen der Janus Kinase 2 (JAK 2) vermittelt werden, inhibiert und somit auch Anwendung bei der Therapie der Polycythaemia vera finden könnte [97].

Die Wirkungsweise von Gefitinib, wie auch die Anwendung dessen beim NSCLC, entsprechen weitestgehend denen von Erlotinib [75, 98]. Ebenso ergeben sich beim HNSCC im Falle von Gefitinib Zweifel an der Überlegenheit gegenüber konventioneller Chemotherapie. Weder als alleinige Gabe im Vergleich mit Methotrexat, noch die zusätzliche Gabe von Gefitinib zu Docetaxel ergaben in Phase-3 Studien ein verbessertes Outcome oder zusätzlichen Nutzen [99, 100]. Aktuelle Studien jedoch weisen darauf hin, dass TKIs, wie Erlotinib oder Gefitinib, abgesehen von der adjuvanten Therapie, in Zukunft eine Rolle bei der Chemoprävention von Dysplasien und zur Rezidivprophylaxe nach HNSCC bei Hochrisikopatienten zukommen könnte [101-103]. Um solche Anwendungsbereiche zu etablieren ist jedoch noch weitere Forschung auf diesem Gebiet nötig.

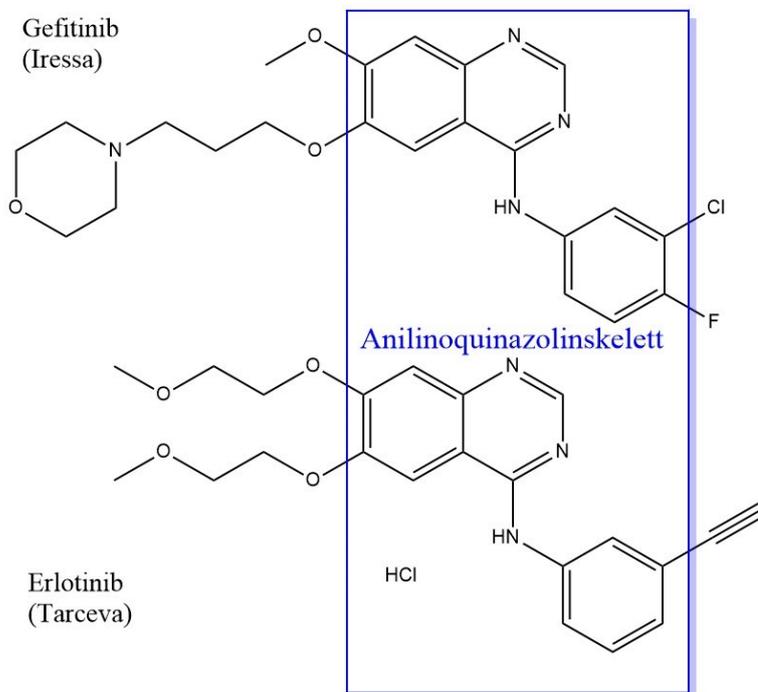


Abbildung 2: Strukturformeln von Erlotinib und Gefitinib im Vergleich. Darstellung modifiziert nach Weinberg [28]

### 3. Fragestellung und Zielsetzung

In vorangegangenen Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe feststellen, dass bei Zugabe von Cetuximab zu Plattenepithelkarzinomzelllinien, obgleich klinisch in bestimmten Fällen wirksam, im Zellkulturversuch nur geringe bis gar keine Effekte selbst bei überaus hohen Dosen zu beobachten waren [88, 89, 104]. Prinzipiell verfolgt die Therapie mit allen drei Medikamenten Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab das gleiche Ziel: Eine möglichst gezielte Ausschaltung der Signalübermittlung durch den EGF-Rezeptor, um somit konsekutiv die Unterdrückung der hiermit verbundenen Wachstumsstimulation zu erreichen. Dennoch greifen die beiden Tyroinkinaseinhibitoren an anderer Stelle und in unterschiedlicher Weise in die Signalübertragung des EGF-Rezeptors ein, als der monoklonale Antikörper Cetuximab. Es gilt zu verifizieren in wieweit sich die Wirksamkeit der genannten Medikamente bei EGF-unabhängigen HNSCC Zellkulturen unterscheidet und außerdem eventuelle Effekte einer Kombinationstherapie von Cetuximab mit Tyrosinkinaseinhibitoren zu evaluieren. Des Weiteren soll festgestellt werden, ob Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab eine Hemmung der Autophosphorylierung in diesen Zelllinien bewirken.

## II. Material und Methoden

### 1. Chemikalien, Materialien und Geräte

Markennamen sind, auch wenn im Weiteren nicht explizit darauf hingewiesen wird, urheberrechtlich geschützt.

Table 2

| <b>Chemikalien</b>                      | <b>Hersteller</b>                                     |
|---|---|
| <b>Medikamente und Antikörper</b>       |   |
| Erlotinib HCl (OSI-744)                 | Selleck Chemicals,<br>Houston, TX, USA                |
| Gefitinib (ZD 1839)                     | Selleck Chemicals,<br>Houston, TX, USA                |
| Cetuximab                               | Merck KGaA, Darmstadt                                 |
| Antikörper 12351 gegen pEGFR (Tyr 1173) | Santa Cruz Biotechnology<br>Inc., Santa Cruz, CA, USA |
| Anti-Maus IgG HRP-Antikörper            | Cell Signaling Technology,<br>Danvers, MA, USA        |
| Alpha-Tubulin Maus-Antikörper           | Thermo Scientific,<br>Waltham, MA, USA                |
| Recombinant human EGF                   | R&D Systems Inc.,<br>Minneapolis, MN, USA             |
| <b>SDS Page und Western Blot</b>        |   |
| Rotiphorese Gel 30 (37,5 : 1)           | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                          |
| Tris(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane) | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                          |
| SDS ultra pure                          | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                          |
| Ammoniumperoxodisulfat                  | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                          |
| TEMED p.a.                              | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                          |
| 10 %ige APS-Lösung                      | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                          |
| Aqua dest.                              | B. Braun Melsungen AG,<br>Melsungen                   |

|  |   |
|--|---|
| Glycin   | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| Methanol J.T.Baker   | Mallinckrodt Baker B.V.,<br>Deventer, Netherlands |
| Salzsäure rauchend 37%   | Merck, Darmstadt                                  |
| Isopropanol  | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| Gel-Blotting-Papier Roti-PVDF  | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| Nitrocellulose Blotting Membran NCA2   | GE Healthcare                                     |
| Milchpulver 250 mg   | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| Probenpuffer:  |   |
| Bromphenolblau   | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| Glycerin   | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| SDS ultra pure   | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| Tris(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane)  | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| 1,4-Dithiothreit   | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| Kristallviolettlösung (1g/1L doppelt destillierten Wassers mit 20% Methanolanteil) | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe                      |
| Phosphataseinhibitor I und II  | Sigma-Aldrich, St. Louis,<br>MO, USA              |
| 10x General WESTERN: 30,3 g Tris;144 g Glycin                                      |   |
| Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)  |   |
| Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,8)  |   |
| Detection Reagent 1: Peroxide Solution   | Thermo Scientific,<br>Waltham MA, USA             |
| Detection Reagent 2: Luminol Enhancer Solution                                     | Thermo Scientific,<br>Waltham MA, USA             |

Tabelle 3

| <b>Verbrauchsmaterialien, Nährmedien und Puffer</b> |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Aqua isotona III                                    | Beckmann Coulter,<br>Krefeld         |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)                             | Sigma-Aldrich, St. Louis,<br>MO, USA |
| Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)                          | Biochrom, Berlin                     |
| TBS mit 0,1% Tween 20                               |                                      |
| DMEM (Glucose 1 g/L, + L-Glutamin, + Pyruvat)       | Gibco, Carlsbad, CA, USA             |
| DPBS  | Gibco, Carlsbad, CA, USA             |
| L-Glutamin (200mM)                                  | Biochrom K0283, Berlin               |

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| Penicillin/Streptomycin (10 000 U Penicillin/ml u. 10 mg Streptomycin/ml) | Gibco 15140-122, Carlsbad, CA, USA |
| 10% FCS   | Gibco, , Carlsbad, CA, USA         |
| 96- und 6-well Platten  | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden      |
| Zellkulturflaschen  | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden      |
| Gewebekulturschalen   | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden      |
| Reaktionsgefäße   | Eppendorf, Hamburg                 |
| Pipettenspitzen   | Eppendorf, Hamburg                 |
| Nalgene Kryoröhrchen (steril)   | Relags GmbH, Wertheim              |
| Serologische Pipetten   | Brand GmbH, Wertheim               |
| Pipettierhilfe Akku-Jet   | Brand GmbH, Wertheim               |
| Mikroliterpipetten Typ Eppendorf Research Plus                            | Eppendorf, Hamburg                 |
| Mehrkanalpipetten Typ Eppendorf Research Plus multi 8-channel             | Eppendorf, Hamburg                 |

Tabelle 4

| <b>Geräte</b>   |                                 |
|---|---------------------------------|
| Brutschrank HERAcell 150i   | Heraeus, Hanau                  |
| Sterilbank HERAsafe KS 12   | Heraeus, Hanau                  |
| Lichtmikroskop CK40   | Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan |
| CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System TTC                             | Schärfe System, Reutlingen      |
| Software CASYstat   | Schärfe System, Reutlingen      |
| Digital SLP Celldisruptor   | Branson, Dietzenbach            |
| SPECTRA Mikro Plate Reader "Rainbow"                                    | Tecan, Männedorf, Schweiz       |
| Centrifuge 5415 R   | Eppendorf, Hamburg              |
| PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, 45-1010-C<br>Gelgröße 10x10 cm mit: | Peqlab, Erlangen                |
| 4 Glasplatten   | Peqlab, Erlangen                |
| 2 ausgeschnittene Glasplatten   | Peqlab, Erlangen                |
| 2 Kämmen 0,8 mm (12 Zähne)  | Peqlab, Erlangen                |
| 2 Spacer-Sets, 0,8 mm Gießbasis   | Peqlab, Erlangen                |
| Spannungsgerät PeqPower 250 V   | Peqlab, Erlangen                |
| PerfectBlue Semi-Dry-Elektroblotter SEDEC S 52-1010                     | Peqlab, Erlangen                |
| Wippschüttler Mini-Rocker MR 3  | Peqlab, Erlangen                |
| Wasserbäder   | Julabo, Seelbach                |
| Röntgenkassetten  | Dr. Goos Suprema,               |

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
|  | Heidelberg                        |
| Amersham Hyperfilm ECL, chemiluminescence film | GE Healthcare Limited,<br>UK      |
| Röntgenfilmentwickler, Cawomat 2000 IR         | CAWO Solutions,<br>Schrobenhausen |

*Tabelle 5*

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>Software</b>        |   |
| Microsoft Office 2013  | Microsoft, Redmond, WA,<br>USA          |
| Graphpad Prism 6.05    | GraphPad Software, La<br>Jolla, CA, USA |
| Adobe Creative Suite   | Adobe Systems, San Jose,<br>CA, USA     |
| ChemBioDraw Ultra 14.0 | CambridgeSoft, Waltham<br>MA, USA       |

## 2. Zelllinien

Die folgenden Zelllinien, abgesehen von A 431, stammen vom Tumorzentrum der Universität Pittsburgh (PA, USA) [105]. Sie wurden bereits in mehreren vorangegangenen Studien verwendet, um Zytotoxizität und antineoplastische Effekte verschiedener Tumortherapeutika zu testen [104, 106-108]. Aufgrund der hohen EGFR-Expression wurde die Zelllinie A 431 als Positivkontrolle ausgewählt [109].

### 1. A 431

Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, welche aus einem Epidermoidkarzinom einer 85-jährigen Patientin isoliert wurde. (ATCC® CRL-1555™)

### 2. PCI-68

Diese Zelllinie stammt von einem primären Zungenkarzinom eines männlichen Patienten.

Tumorstadium: pT4 N0 M0 G1

### 3. PCI-9:

Ursprung dieser Zelllinie ist ein Karzinom des Zungengrundes eines männlichen Patienten.

Tumorstadium: pT4 N3 M0 G2

### 4. PCI-1:

Diese Zelllinie stammt von einem Larynxkarzinom der Glottis eines männlichen Patienten.

Tumorstadium: pT2 N0 M0 G2

### 5. PCI-13

Diese Zelllinie wurde aus einem Plattenepithelkarzinom des Trigonum retromolare eines männlichen Patienten isoliert.

Tumorstadium: pT4 pN1 M0 G3

## 6. PCI-52

Diese Zelllinie entstammt einem primären Karzinom der Plica aryepiglottica eines männlichen Patienten.

Tumorstadium: pT2 N0 M0 G2

## 3. Zellkultur

Die Zellen wurden bei 95 % Luftfeuchtigkeit und 37°C sowie einem Anteil von 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank adhärent kultiviert. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit geringem Glukosegehalt von 1000 mg/l und einem Anteil von 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % L-Glutamin, diente als Nährmedium für die Zelllinien 2 bis 6. Für A 431 wurde stattdessen die Standardglukosekonzentration (4,5 g/l) von DMEM ohne L-Glutamin verwendet. Nach Kontrolle unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen je nach Zelldichte passagiert, also ausgesät oder gesplittet. Hierzu wurde das Nährmedium steril angesetzt. Die Medien, welche bei 4°C kühl gelagert werden, wurden zur Verwendung zuvor im Wasserbad vorgewärmt.

Als erstes wurde jeweils dreimal mit 10 ml PBS (Gibco 14190-094, -CaCl, -MgCl) gewaschen und anschließend wurden 3 ml Trypsin/EDTA (Biochrom 0,05 %/0,02 %, Kat.Nr. L2143) zugegeben, um die adhärenen Zellen zu lösen. Je nach Zelllinie wurden zum Trypsin/EDTA nach 10-30 min bei 37°C im Brutschrank und Ablösen der Zellen von der Flasche 7 ml Medium zugegeben. Diese 10 ml Zellsuspension wurden dann in 50 ml Falcon-Spitzröhrchen überführt. Hieraus wurden 10 µl Suspension abpipettiert, um hiermit die Zellzählung für die jeweiligen Versuchsansätze durchzuführen. In Abhängigkeit von der Teilungsrate der Zelllinien wurden diese 2-mal wöchentlich im jeweiligen Verhältnis gesplittet und wieder in Medium von 25 ml kultiviert. Für die Zelllinie PCI-52 und PCI-9 betrug dieses 1:3, für PCI-68 1:4 und für PCI-1 sowie PCI-13 1:10.

### 3.1. Zellzählung

Zur Bestimmung der Konzentration der gewonnenen Zellsuspensionen wurde das CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System, Modell TTC (Schärfe System Reutlingen) verwendet. Die aus der Zellsuspension entnommenen 10 µl wurden in 990 µl Aqua isotona III (Beckmann Coulter, Krefeld) überführt. Mit dieser Lösung wurde dann die Messung durchgeführt.

Entsprechend der Herstellerangaben funktioniert der Zählvorgang wie folgt: Nach Suspension in einem schwachen Elektrolyt (Aqua isotona) können die Zellen mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Messkapillare von 150 µm gesaugt werden. Bei dieser Methode fungieren intakte Zellen als elektrische Isolatoren. Somit können Parameter definiert werden, mittels welcher, nach dem Prinzip der Widerstandsmessung und Pulsflächenanalyse, eine Zellzählung durchgeführt werden kann.

Als Messbereich wurde eine Spanne von 0 bis 30 µm festgelegt. Entsprechend der Normalverteilung der Zellgröße vitaler Zellen wurde ein Messfenster zwischen 12 und 30 µm ausgewählt. Aus drei automatisierten Einzelmessungen á 200 µl pro Probe wurde der Mittelwert bestimmt. Die Auswertung, unter Einberechnung des Verdünnungsfaktors, erfolgte mit der Software CASYstat (Schärfe Systeme, Reutlingen). Die ermittelte Zellzahl wurde pro ml unverdünnter Suspension angegeben.

### 3.2. Versuchsaufbau

Der Versuchsrahmen umfasste Einzeltherapien mit Cetuximab, Erlotinib und Gefitinib sowie Kombinationstherapien.

Hierbei wurden 96-Well-Platten mit je 10 000 Zellen pro Well in den bereits beschriebenen Nährmedien besät. Nach 24 Stunden im Brutschrank erfolgte dann das Hinzufügen der jeweiligen Medikamente oder einer kombinierten Medikation,

welche anschließend für weitere 72 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Für die Einzeltherapien wurden dabei jeweils neun 1 zu 2 (im Folgenden log 2) beziehungsweise 1 zu 3 (im Folgenden log 3) Verdünnungsschritte durchgeführt. Die Maximaldosis betrug bei Cetuximab 400 µg/ml, bei den beiden Tyrosinkinaseinhibitoren hingegen 400 µM.

Bei den Kombinationen handelt es sich um zwei Ansätze, welche im Folgenden als Kombi 1 und Kombi 2 bezeichnet werden. Bei Kombi 1 wurden, neben Cetuximab mit der Konzentration von 400 µg/ml, die in den Einzeltherapien abgeschätzten IC-50 Konzentrationen von Erlotinib bzw. Gefitinib zugegeben. Bei der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC-50) handelt es sich um die Stoffkonzentration die nötig ist, um eine 50-prozentige Inhibition, in diesem Falle einer Zellkultur, durch einen bestimmten Stoff oder ein bestimmtes Pharmakon zu erreichen. Anhand der Werte aus den Einzeltherapien von Erlotinib und Gefitinib mit log 2 und log 3 wurde der Mittelwert aus maximaler Wirksamkeit in Prozent sowie der Kontrolle, ohne Zugabe des Inhibitors bestimmt. Die Stoffkonzentration bei welcher dieser Prozentwert erreicht wurde, wurde als IC-50 definiert. Diese Konzentration wurde nun mit Cetuximab in log 2 Verdünnung, beginnend bei 400 µg/ml, kombiniert. Für die Kombi 2 Versuche hingegen wurden sowohl die maximale in der Einzeltherapie verwendete Konzentration von 400 µM für Erlotinib bzw. Gefitinib, als auch die IC-50 Konzentration der beiden Stoffe verwendet. Diese wurden dann jeweils mit einer Cetuximab Konzentration von 400 µg/ml kombiniert und miteinander verglichen.

### 3.3. Kristallviolett-Assay

Zur relativen Quantifizierung der Ergebnisse aus den Versuchsreihen wurde der Kristallviolett-Assay angewendet. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Test, der auf der Extinktionsmessung mit Hilfe von Kristallviolett beruht. Zur Herstellung der verwendeten Lösung wurde 1 g Kristallviolett in 1 l doppelt destillierten Wassers mit einem Methanolanteil von 20 % gegeben.

Nach der bereits beschriebenen Inkubation mit den verschiedenen Hemmstoffen für 72 h wurde das Medium der 96-Well-Platten entfernt und den noch adhären, somit lebenden Zellen 50 µl der Kristallviolettlösung pro Well hinzugegeben. Diese wurde 15 Minuten inkubiert und im Anschluss durch mehrfaches Auswaschen mit destilliertem Wasser entfernt. Zur spektrometrischen Beurteilung wurden dann 100 µl Methanol pro Well zugegeben.

Nun konnte die optische Dichte (OD), welche mit der Anzahl der vitalen Zellen korreliert, mittels eines Mikroplattenlesegeräts bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt werden. Die Wirksamkeit der einzelnen Therapien kann nun anhand der Relativwerte (in Prozent) im Vergleich zu den Kontrollen (100 %) derselben Platte bestimmt werden, wobei pro Platte mit 3 technischen und pro Versuch mit mindestens 3 biologischen Replikaten gearbeitet wurde.

#### 4. Western Blot

Die Versuche mittels Western Blot wurden mit Zelllysaten durchgeführt. Die verschiedenen Zelllinien wurden hierfür jeweils auf 6-Well-Platten zu je 750 000 Zellen pro Well angesetzt und nach 24 Stunden im Brutschrank für 30 Minuten mit 100 µg/ml Cetuximab bzw. jeweils 1,6 µM Erlotinib und Gefitinib behandelt. Anschließend wurde 10 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Dann wurden die Zellen in eiskaltem PBS (engl.: phosphate buffered saline) mit einem Zellschaber gelöst und für 1 Minute mit 16 000 Umdrehungen ab zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden zu den verbliebenen Pellets Phosphataseinhibitor-„Cocktail“-Lösungen I und II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gegeben. Die mittels Ultraschall generierten Zelllysate wurden dann 3 Minuten bei 95°C zur möglichst vollständigen Denaturierung gekocht. Um eine größtmögliche Konservierung der gesuchten Phosphorverbindungen zu gewährleisten wurden die Proben im weiteren Verlauf während des gesamten Vorgehens auf Eis gelagert.

Anschließend wurden das Trenn- und Sammelgel für die Gelelektrophorese hergestellt. Die Komponenten hierfür bestanden aus:

- TEMED
- 10% APS Lösung
- Acrylamid 30%
- Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer ( 1,5 M Tris, pH 8,8 bzw. 0,5 M Tris pH 6,8)
- H<sub>2</sub>O (Millipore)

Nach Auftragen des Markers (15 µL) sowie der einzelnen Proben zu je 20 µL, wurden die dann 1,5 h mit 35 mA/Gel durch 8 % SDS-Page aufgetrennten Proteine mit 60 mA innerhalb von 2 Stunden im Semi-Dry-Elektroblotter auf Nitrozellulose-Membranen übertragen.

Im Folgenden wurden diese für etwa 60 Minuten mit einer Lösung aus 5 g Milchpulver und 100 ml 1x TBS auf dem Wippschüttler benetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Nach Zugabe der Primärantikörperlösung (AK 12351 an Tyr 1173; 1,1 µL/10 ml) wurden die Blots dann über Nacht in 50 ml Falcons im Kühlraum rotierend inkubiert. Am darauffolgenden Tag, nach dreimaligem, fünfminütigen Waschens in TBS, zur Entfernung schwach haftender unspezifischer Bindungen, wurde 1,1 µL des HRP(horseradish peroxidase)-konjugierten Sekundärantikörpers in 10 ml gelöstem Milchpulver (5g in 100 ml TBS) zugegeben und für 1 h inkubiert. Dieser Schritt soll die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers gewährleisten. Die Blots wurden dann wiederum dreimal für 15 Minuten gewaschen. Die Zugabe der Detektionsreagenzien HRP (horseradish peroxidase) und Luminol zu gleichen Teilen für 1 Minute bewirkt nun, dass die Oxidation von Luminol durch die Peroxidase und somit dessen chemolumineszente Eigenschaften katalysiert werden. Daraufhin wurden die Blots in Klarsichtfolie eingeschlagen und unter trockenen Verhältnissen in die Filmkassette eingelegt. Anschließend wurde in roter Dunkelkammerbeleuchtung der Röntgenfilm über der Membran eingebracht und nach entsprechender Belichtungszeit entnommen. [110]

## 5. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Microsoft Excel (Office 2013) und Graphpad Prism 6.05 durchgeführt.

Bei jeder der Plattenepithelkarzinomzelllinien wurden Unterschiede zwischen Cetuximab, Erlotinib und Gefitinib untersucht. Alle Experimente wurden mindestens dreimal ( $n=3$ ) wiederholt. Bei der Analyse der Daten kamen verschiedene statistische Verfahren zu Anwendung. Da die Voraussetzungen einer Normalverteilung allerdings nicht gegeben sind, wurden, wegen der Zahl an Versuchen, der nicht parametrische Mann-Whitney-U Test zum Vergleich zweier Gruppen sowie bei der Analyse von mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

### III. Ergebnisse

Alle Ergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben, in Mittelwerten (MW), die Streuung bzw. Fehlerbalken in Standardabweichung (SD) angegeben. Häufig verwendete Abkürzungen sind Erlo = Erlotinib, Gefi = Gefitinib und Cetu = Cetuximab. Bei der Bezeichnung log 2-Verdünnung handelt es sich um eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2, bei der log 3-Verdünnung hingegen wurde im Verhältnis 1:3 verdünnt. Teile dieser Arbeit und deren Ergebnisse sind bereits veröffentlicht [111].

#### 1. Cetuximab Einzeltherapie

In den folgenden Abbildungen sind die Resultate der Einzeltherapien in log 2 Verdünnungsreihe graphisch dargestellt. Hier wurde eine statistische Analyse mit Hilfe des „Kruskal-Wallis-Tests“ und dem „Dunn’s multiple comparisons test“ durchgeführt. Hierbei wurden alle Werte mit den jeweiligen Kontrollen (Medium) verglichen. Abgesehen von den Zelllinien PCI-1 und PCI-13 konnten in keiner anderen Zelllinie eine statistisch signifikante Beeinflussung des Zellwachstums, selbst bei einer Konzentration von 400 µg/ml des gegen EGFR gerichteten Antiköpers nachgewiesen werden. Zwar zeigte sich bei Linie PCI-1 ein signifikanter Unterschied zwischen Therapie und der Kontrolle mit 100 % lebenden Zellen, doch sind die Unterschiede über alle Konzentrationen von Cetuximab hinweg so gering, dass hier keine statistisch signifikante, konzentrationsabhängige Verbesserung der Wirkung gezeigt werden konnte (Kruskal-Wallis-Test). Bei der Zelllinie PCI-13 waren erst bei Konzentrationen von 50 µg/ml bis 200 µg/ml signifikante Unterschiede zur

Kontrolle mit Medium zu beobachten. Dies traf jedoch nicht auf die Cetuximabkonzentration von 400  $\mu\text{g/ml}$  zu. Auch im Falle dieser Zelllinie konnten keine signifikanten Abweichungen beim Vergleich der Wirksamkeit der unterschiedlichen Konzentrationen von Cetuximab untereinander festgestellt werden. Die Prozentzahlen überlebender Zellen lagen für die verschiedenen Konzentrationen maximal zwischen 76 % und 84 %. Die Ergebnisse sind im Einzelnen in den folgenden Tabellen und Grafiken dargestellt.

Die Bestimmung der IC-50 bei diesem Kollektiv war wegen mangelnder Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht sinnvoll.

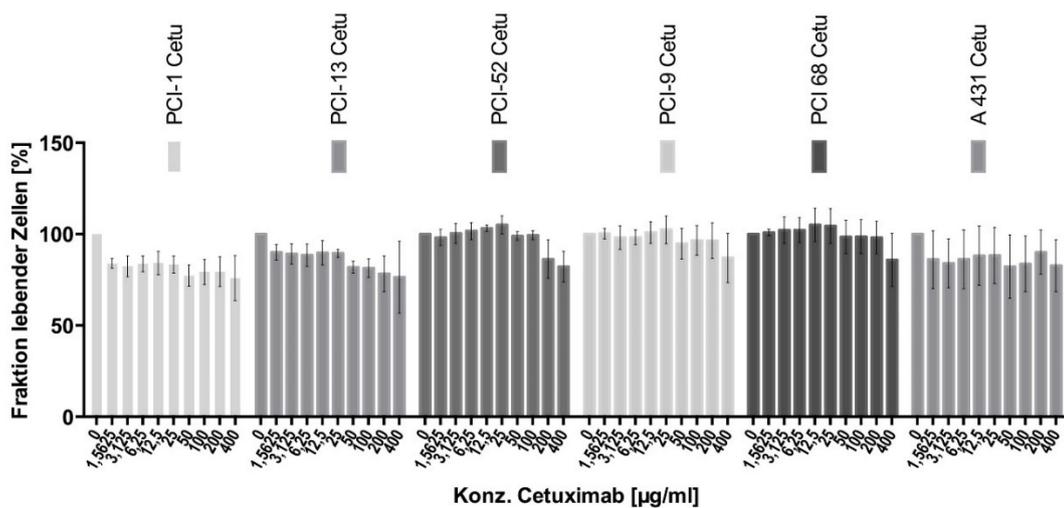


Abbildung 3: Überblick über die Ergebnisse (MW u. SD) der log<sub>2</sub> Verdünnungsreihe mit Cetuximab, ausgehend von 400  $\mu\text{g/ml}$

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der log 2 Verdünnungsreihe mit Cetuximab aller 6 Zellreihen. Konzentrationen links in µg/ml, Mittelwerte überlebender Zellen aus den Einzelversuchen (Mean), Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Versuche.

| PCI-1 Cetu |       |      |   | PCI-13 Cetu |       |      |   |
|------------|-------|------|---|-------------|-------|------|---|
|            | Mean  | SD   | N |             | Mean  | SD   | N |
| 0          | 100.0 | 0.0  | 8 | 0           | 100.0 | 0.0  | 3 |
| 1,5625     | 84.0  | 2.6  | 8 | 1,5625      | 90.0  | 4.2  | 3 |
| 3,125      | 82.4  | 5.7  | 8 | 3,125       | 89.2  | 5.5  | 3 |
| 6,25       | 83.7  | 4.3  | 8 | 6,25        | 88.5  | 6.0  | 3 |
| 12,5       | 84.2  | 6.4  | 8 | 12,5        | 89.8  | 6.6  | 3 |
| 25         | 83.4  | 4.7  | 8 | 25          | 89.5  | 2.2  | 3 |
| 50         | 77.3  | 5.8  | 8 | 50          | 81.9  | 3.3  | 3 |
| 100        | 79.2  | 6.9  | 8 | 100         | 81.4  | 5.1  | 3 |
| 200        | 79.4  | 8.1  | 8 | 200         | 78.3  | 9.8  | 3 |
| 400        | 75.9  | 12.3 | 8 | 400         | 76.4  | 19.8 | 3 |

| PCI-52 Cetu |       |      |   | PCI-9 Cetu |       |      |   |
|-------------|-------|------|---|------------|-------|------|---|
|             | Mean  | SD   | N |            | Mean  | SD   | N |
| 0           | 100.0 | 0.0  | 3 | 0          | 100.0 | 0.0  | 6 |
| 1,5625      | 98.1  | 4.4  | 3 | 1,5625     | 100.2 | 2.7  | 6 |
| 3,125       | 100.4 | 5.5  | 3 | 3,125      | 98.1  | 6.4  | 6 |
| 6,25        | 101.7 | 4.7  | 3 | 6,25       | 98.2  | 4.0  | 6 |
| 12,5        | 103.2 | 1.7  | 3 | 12,5       | 100.9 | 6.0  | 6 |
| 25          | 105.1 | 4.9  | 3 | 25         | 102.3 | 7.6  | 6 |
| 50          | 99.0  | 2.3  | 3 | 50         | 94.8  | 8.4  | 6 |
| 100         | 99.4  | 2.3  | 3 | 100        | 96.5  | 8.1  | 6 |
| 200         | 86.2  | 10.5 | 3 | 200        | 96.3  | 9.7  | 6 |
| 400         | 82.1  | 8.4  | 3 | 400        | 86.9  | 13.4 | 6 |

| PCI-68 Cetu |       |      |   | A 431 Cetu |       |      |   |
|-------------|-------|------|---|------------|-------|------|---|
|             | Mean  | SD   | N |            | Mean  | SD   | N |
| 0           | 100.0 | 0.0  | 6 | 0          | 100.0 | 0.0  | 4 |
| 1,5625      | 100.8 | 1.8  | 6 | 1,5625     | 86.1  | 15.9 | 4 |
| 3,125       | 102.2 | 7.3  | 6 | 3,125      | 84.0  | 13.4 | 4 |
| 6,25        | 102.2 | 6.8  | 6 | 6,25       | 86.2  | 16.1 | 4 |
| 12,5        | 105.1 | 9.1  | 6 | 12,5       | 88.2  | 16.3 | 4 |
| 25          | 104.5 | 9.5  | 6 | 25         | 88.3  | 15.3 | 4 |
| 50          | 98.4  | 9.1  | 6 | 50         | 82.3  | 17.4 | 4 |
| 100         | 98.6  | 9.3  | 6 | 100        | 83.6  | 15.3 | 4 |
| 200         | 98.0  | 8.9  | 6 | 200        | 90.1  | 12.0 | 4 |
| 400         | 85.9  | 14.5 | 6 | 400        | 82.7  | 14.4 | 4 |

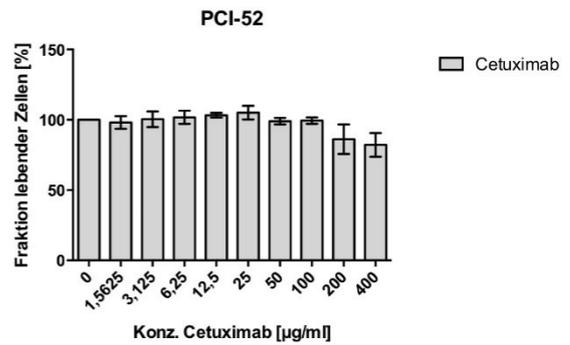
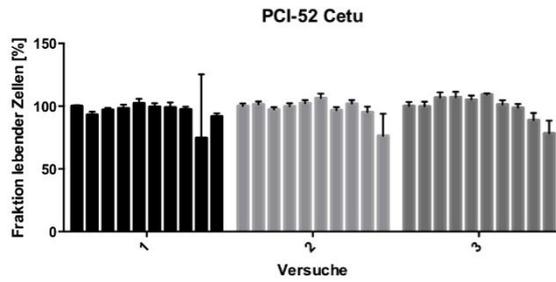
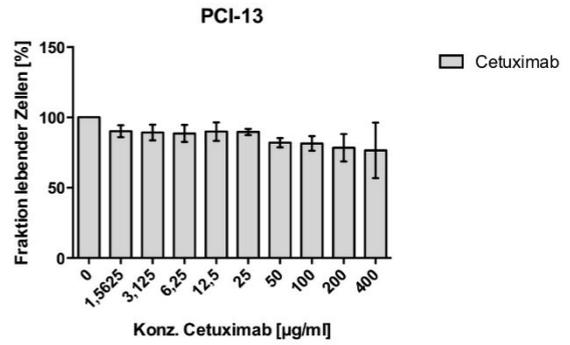
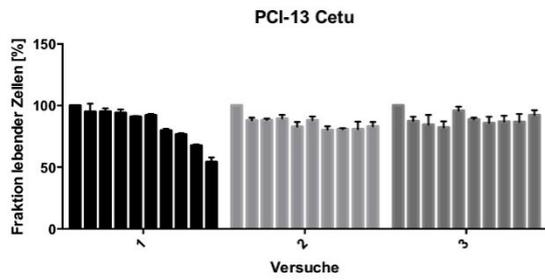
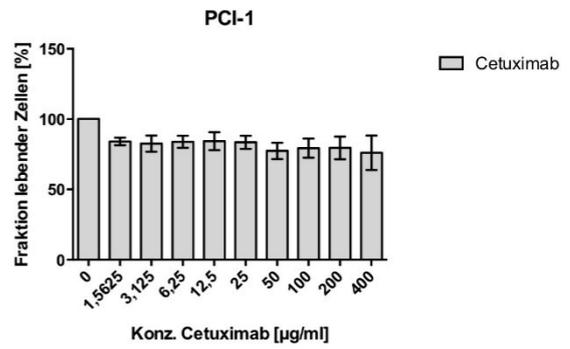
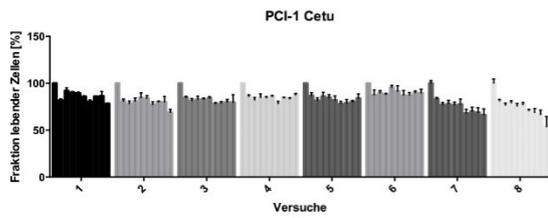


Abbildung 4: Darstellung der Verdünnungsreihen (MW u. SD) mit Cetuximab: links finden sich die Einzelversuche (n = 3 bzw. 8) rechts der zugehörige, diese in MW zusammenfassende Graph.

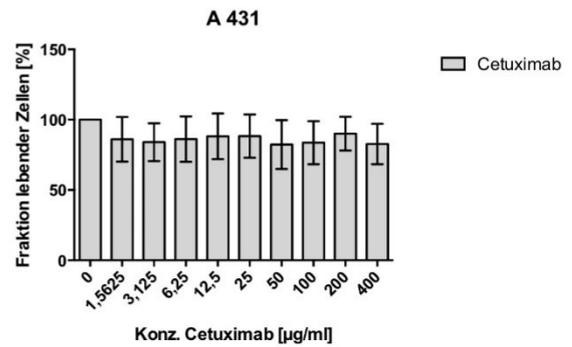
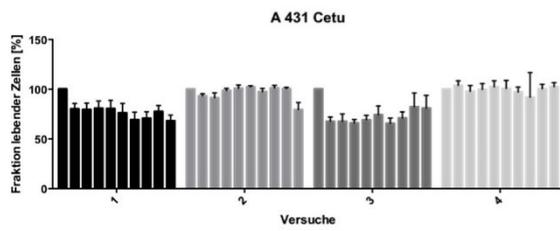
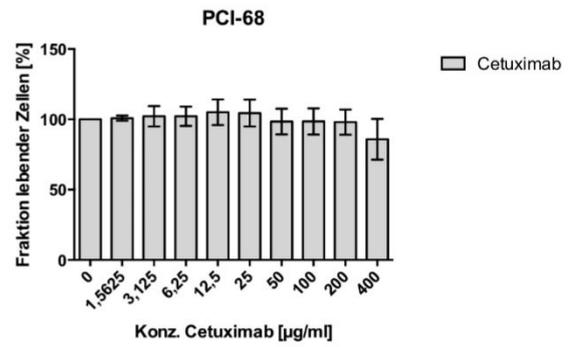
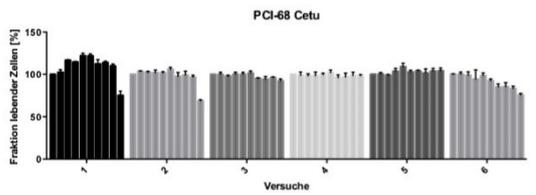
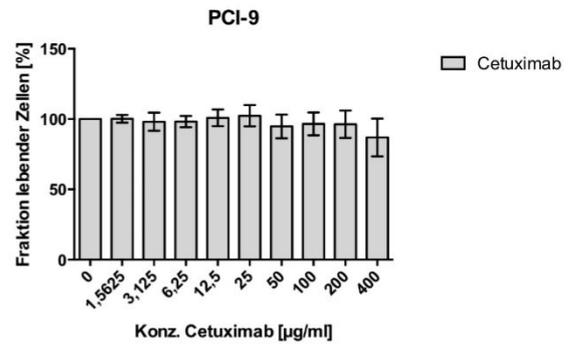
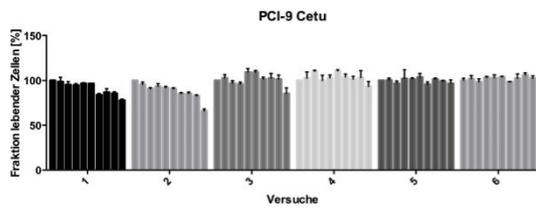


Abbildung 5 Darstellung der Verdünnungsreihen (MW u. SD) mit Cetuximab: links finden sich die Einzelversuche (n = 4 bzw. 6) rechts der zugehörige, diese in MW zusammenfassende Graph.

## 2. Einzeltherapien mit Erlotinib und Gefitinib

Abgesehen von A 431 wurde für alle Zellreihen neben der log 2 Verdünnung auch eine Versuchsreihe mit log 3 Schritten durchgeführt. Maximalwert waren hier jeweils 400  $\mu\text{M}$ . Anhand der Ergebnisse konnte dann die IC-50 (mittlere inhibitorische Konzentration, bei welcher die Hälfte der Wirksamkeit erreicht wird) abgeschätzt werden. Diese kamen später in den im Folgenden beschriebenen Kombinationstherapien zum Einsatz.

Für A 431 ergaben sich für Erlotinib und Gefitinib sehr ähnliche Konzentrations-Wirkungskurven. Entsprechend der Grafik in Abbildung 6 wurde die IC-50 für beide Medikamente bei 1,6  $\mu\text{M}$  näherungsweise festgelegt. Die maximale Hemmung des Zellwachstums fand sich bei beiden Medikamenten bei der Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  und lag zwischen etwa 16 % lebender Zellen bei Erlotinib sowie 24 % bei der Anwendung von Gefitinib.

Bei der Zelllinie PCI-1 (Abbildung 7 und 8) lagen in der log 2 Verdünnung beide IC-50 Werte bei Konzentrationen unterhalb der kleinsten durchgeführten Verdünnung, weshalb diese als entsprechender Wert dargestellt ist. In der log 3 Verdünnung hingegen konnte für Erlotinib ein Wert von 0,18  $\mu\text{M}$  gefunden werden. Die kleinste Verdünnung für Gefitinib lag auch hier oberhalb der gesuchten Konzentration. Daher wurde der Wert von 0,06  $\mu\text{M}$  als IC-50 festgelegt. Auch hier lag die größte Wachstumshemmung bei der maximalen Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  und lag im Bereich von 14 % (log 3) und 17 % (log 2) bei Erlotinib sowie bei rund 20 % bzw. 26 % für Gefitinib im log 3 und log 2 Versuch.

Die Zelllinie PCI-13 zeigte die in den Abbildungen 9 und 10 dargestellten Ergebnisse, aus welchen sich in der log 2 Versuchsreihe IC-50 Werte von 2,5  $\mu\text{M}$  für Erlotinib und 1,5  $\mu\text{M}$  für Gefitinib ergaben. Für Gefitinib lag der Prozentwert jedoch hierbei in einem Bereich, der auf eine niedrigere Konzentration schließen lässt. In der log 3 Verdünnung hingegen konnte für Erlotinib ein IC-50 Wert von ca. 9  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Bei Gefitinib lag dieser dagegen bei etwa 5  $\mu\text{M}$ . Der größte antitumoröse

Effekt fand sich hier im Bereich zwischen 13 % und 18 % der Kontrollzellmenge für Erlotinib. Bei Gefitinib lag der Wert für die maximale Hemmung bei etwa 34 % bzw. 37 % überlebender Zellen.

Die Auswertung der Verdünnungsreihe der Zelllinie PCI-52 (dargestellt in Abbildung 11 und 12) zeigte im Vergleich zu allen anderen Linien ein nur sehr geringes Ansprechen auf die Therapie bei beiden Medikamenten. Die IC-50 Werte lagen dementsprechend hier deutlich höher: Für Erlotinib wurden Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  in der log 2 und 44,5  $\mu\text{M}$  in der log 3 Verdünnung bestimmt. Die entsprechenden Werte für Gefitinib lagen bei 36  $\mu\text{M}$  und 35  $\mu\text{M}$  für die log 2 bzw. log 3 Verdünnungsreihen. Bei dieser Zelllinie konnten erst bei sehr hohen Konzentrationen deutliche Effekte der Therapie gezeigt werden. Die maximal erreichte Hemmung lag hier bei 47 % und 38 % lebender Zellen für Erlotinib und zwischen etwa 24 % und 57 % bei Gefitinib, wobei sich hier zwischen 133  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  im Schnitt keine bedeutsame Wirkungssteigerung ergab.

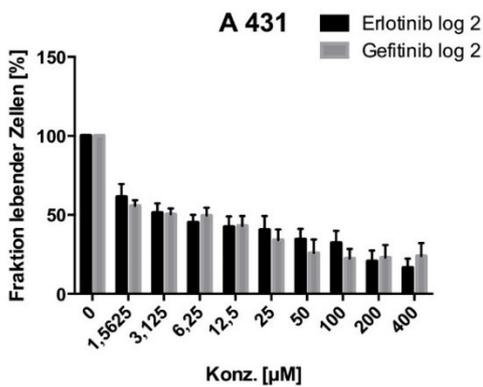
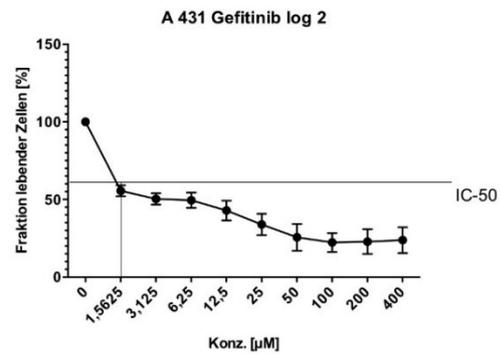
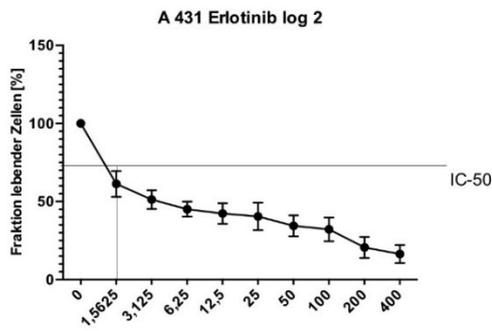
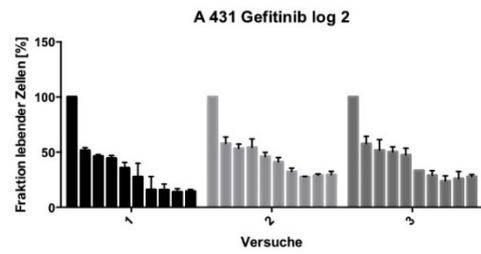
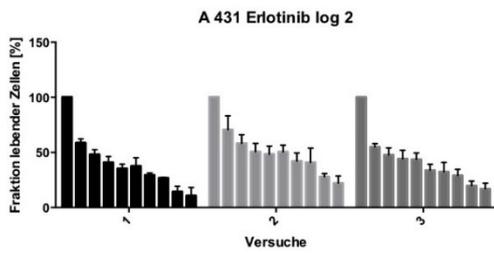
Die IC-50 Werte für Erlotinib bei der Zelllinie PCI-9 (Abbildung 13 und 14) lagen zwischen 15  $\mu\text{M}$  (log 3) und 6,3  $\mu\text{M}$  (log 2), sowie im Bereich von 1,6  $\mu\text{M}$  bis 15  $\mu\text{M}$  für Gefitinib. Der erreichte Höchstwert der Unterdrückung des Zellwachstums lag für Erlotinib zwischen 37 % und 33 % lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Gefitinib zeigte in hohen Konzentrationen eine Hemmung von ca. 50 %.

Bei der Linie PCI-68 (Abbildung 15 und 16) wurden IC-50 Werte von 4  $\mu\text{M}$  in der log 2 Reihe und 5  $\mu\text{M}$  bei log 3 für Erlotinib, sowie 1,5  $\mu\text{M}$  (log 2) und circa 8  $\mu\text{M}$  bei der log 3 Verdünnung für die Therapie mit Gefitinib bestimmt. Der Anteil lebender Zellen im Vergleich zu den Kontrollen betrug bei Erlotinib 15 % und 16 %, bei Gefitinib lag der Bereich zwischen 24 % und 38 %.

In der log 2 Verdünnung ist mit Ausnahme der Zelllinie PCI-52 eine deutliche Stufe zwischen dem letzten Verdünnungsschritt bei 1,56  $\mu\text{M}$  und der Kontrolle zu beobachten. Hier liegt für Erlotinib bei der Linie A 431 ein Abfall von 39 %, bei PCI-1 von 61 %, PCI-13 von 37 %, PCI-9 von 22 % und für die PCI-68 von ca. 30 % vor. Lediglich bei der PCI-52 liegt der Mittelwert überlebender Zellen bei einer

Erlotinibkonzentration von 1,56  $\mu\text{M}$  bei 94 % im Vergleich zur Kontrolle. Analog ist dies auch in ähnlichem Umfang für Gefitinib zu beobachten.

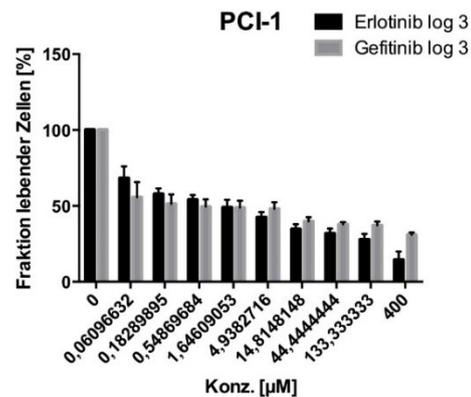
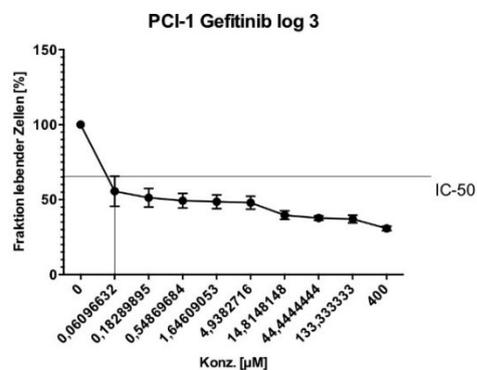
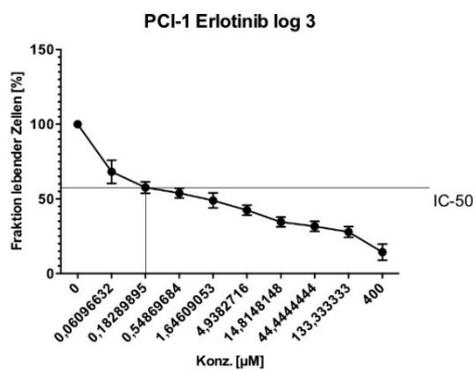
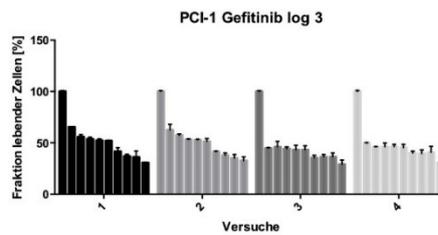
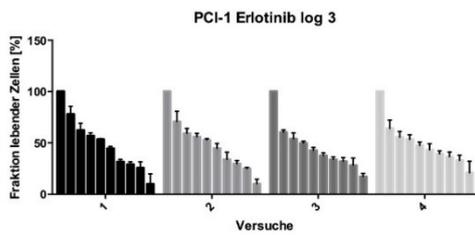
Bei Anwendung einer 1:3 Verdünnung lag die geringste Verdünnungsstufe bei 0,06  $\mu\text{M}$ . Hier sind Unterschiede im Kurvenverlauf zwischen der Gabe von Erlotinib und Gefitinib festzustellen. Im Falle von Erlotinib konnte für die Konzentration von 0,06  $\mu\text{M}$  lediglich bei der im Vergleich recht sensitiven Linie PCI-1 noch ein nennenswerter Sprung um 32 % auf 68 % überlebender Zellen gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Neben der eben beschriebenen PCI-1 mit einem Abfall um etwa 44 % konnten für Gefitinib auch bei PCI-68 und PCI-13 deutliche Unterschiede bei der niedrigsten Verdünnung von 0,06  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Diese lagen für erstere bei ca. 22 %, für letztere bei 25 %. Bei den Zelllinien PCI-9, PCI-68 und PCI-52 kann in log 3 Verdünnung ein typisch sigmoidaler Verlauf beobachtet werden. In höheren Konzentrationen, wie 0,5  $\mu\text{M}$ , 1,6  $\mu\text{M}$  oder 5,5  $\mu\text{M}$  nivellieren sich die Werte zwischen Erlotinib und Gefitinib anscheinend.



|        | A 431 Erlo |     |   | A 431 Gefi |     |   |
|--------|------------|-----|---|------------|-----|---|
|        | Mean       | SD  | N | Mean       | SD  | N |
| 0      | 100.0      | 0.0 | 3 | 100.0      | 0.0 | 3 |
| 1,5625 | 61.3       | 8.2 | 3 | 55.6       | 3.6 | 3 |
| 3,125  | 51.2       | 6.0 | 3 | 50.3       | 3.6 | 3 |
| 6,25   | 45.1       | 4.9 | 3 | 49.5       | 4.9 | 3 |
| 12,5   | 42.4       | 6.6 | 3 | 42.9       | 6.3 | 3 |
| 25     | 40.4       | 8.7 | 3 | 33.9       | 6.8 | 3 |
| 50     | 34.4       | 6.6 | 3 | 25.6       | 8.7 | 3 |
| 100    | 32.1       | 7.6 | 3 | 22.3       | 6.1 | 3 |
| 200    | 20.6       | 6.7 | 3 | 22.8       | 8.0 | 3 |
| 400    | 16.4       | 5.7 | 3 | 23.8       | 8.3 | 3 |
| [µM]   |            |     |   |            |     |   |

Abbildung 6: Log 2 Verdünnungsreihe von A 431

Oben: Übersicht über die Einzelerprobe (MW u. SD) für Erlotinib (n=3) und Gefitinib (n=3); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelversuche bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in µM (links).



|            | PC 1-1 Erlo log 3 |     |   | PC 1-1 Gefi log 3 |      |   |
|------------|-------------------|-----|---|-------------------|------|---|
|            | Mean              | SD  | N | Mean              | SD   | N |
| 0          | 100.0             | 0.0 | 4 | 100.0             | 0.0  | 4 |
| 0,06096632 | 68.1              | 7.8 | 4 | 55.6              | 10.0 | 4 |
| 0,18289895 | 57.6              | 3.8 | 4 | 51.2              | 6.2  | 4 |
| 0,54869684 | 53.9              | 3.2 | 4 | 49.3              | 4.9  | 4 |
| 1,64609053 | 49.0              | 5.0 | 4 | 48.6              | 4.6  | 4 |
| 4,9382716  | 42.4              | 3.4 | 4 | 48.0              | 4.3  | 4 |
| 14,8148148 | 34.5              | 3.3 | 4 | 39.6              | 2.8  | 4 |
| 44,4444444 | 31.6              | 3.3 | 4 | 37.7              | 1.5  | 4 |
| 133,333333 | 27.8              | 3.6 | 4 | 37.1              | 2.5  | 4 |
| 400        | 14.4              | 5.5 | 4 | 30.8              | 1.5  | 4 |
| [µM]       |                   |     |   |                   |      |   |

Abbildung 7: Log 3 Verdünnungsreihe von PCI-1

Oben: Übersicht über die Einzellersuche (MW u. SD) für Erlotinib (n=4) und Gefitinib (n=4); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelversuche bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in µM (links).

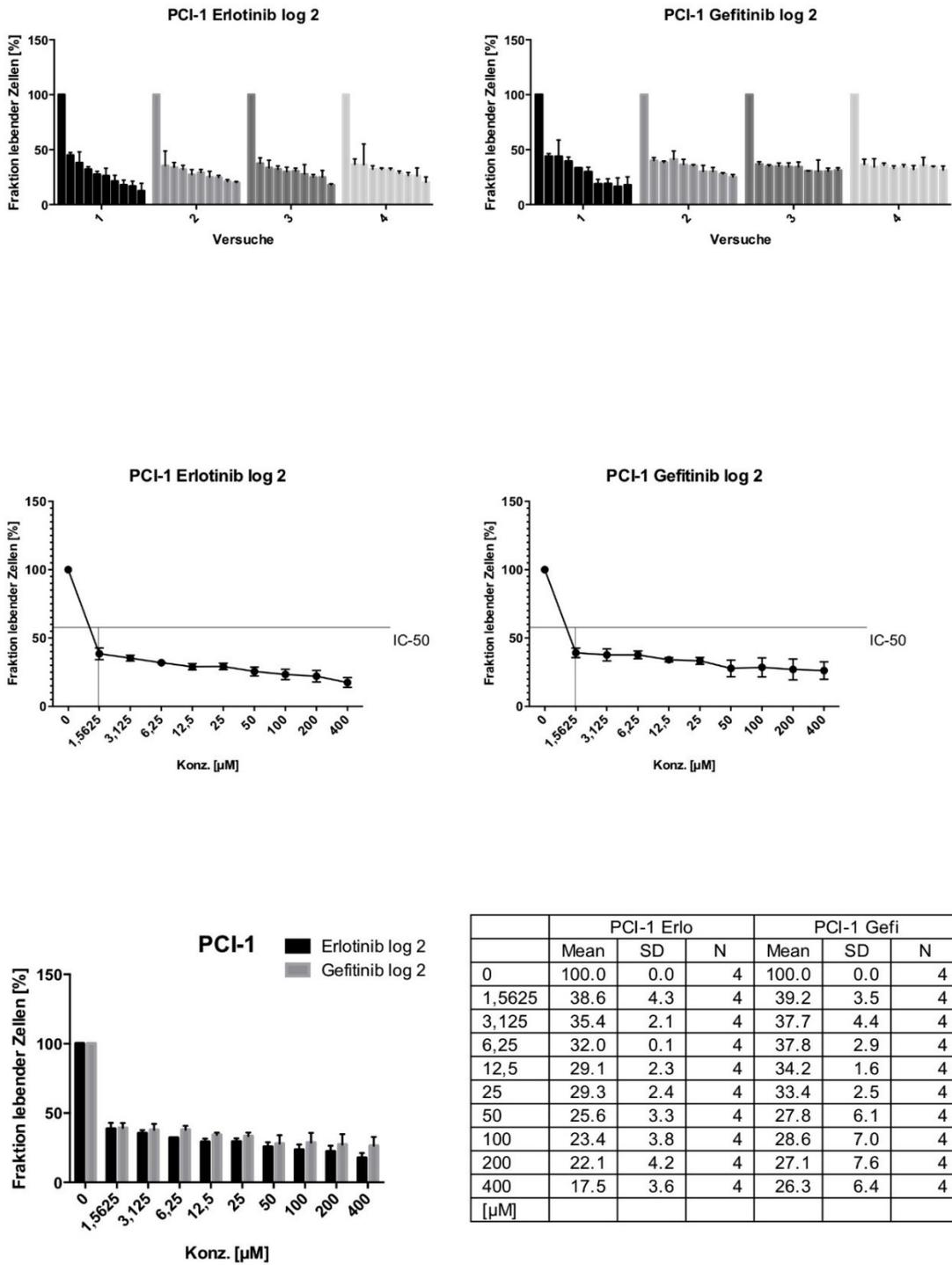
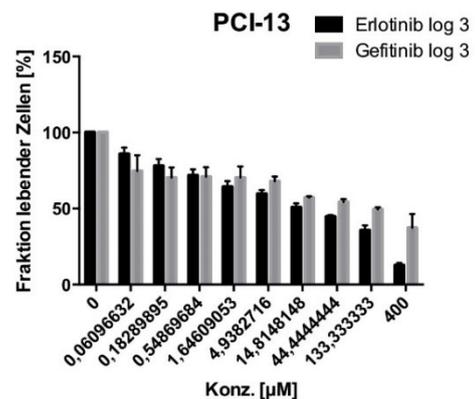
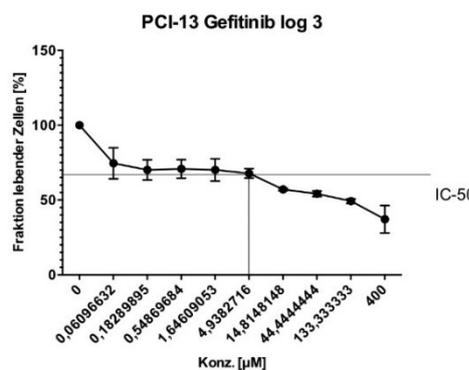
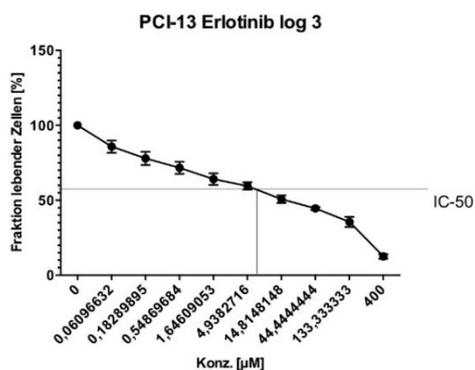
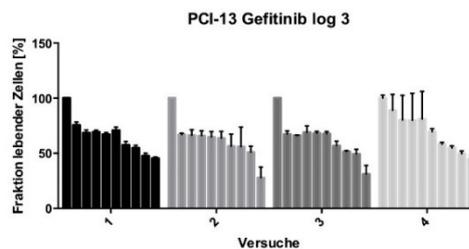
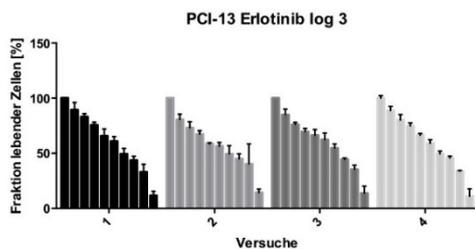


Abbildung 8: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-1

Oben: Übersicht über die Einzelergebnisse (MW u. SD) für Erlotinib (n=4) und Gefitinib (n=4); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelergebnisse bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in µM (links).



|            | PCI-13 Erlot log 3 |     |   | PCI-13 Gefi log 3 |      |   |
|------------|--------------------|-----|---|-------------------|------|---|
|            | Mean               | SD  | N | Mean              | SD   | N |
| 0          | 100.0              | 0.0 | 4 | 100.0             | 0.0  | 4 |
| 0,06096632 | 85.8               | 4.1 | 4 | 74.6              | 10.4 | 4 |
| 0,18289895 | 78.0               | 4.4 | 4 | 70.1              | 6.8  | 4 |
| 0,54869684 | 71.7               | 4.0 | 4 | 70.8              | 6.2  | 4 |
| 1,64609053 | 64.2               | 3.8 | 4 | 70.2              | 7.4  | 4 |
| 4,9382716  | 59.6               | 2.5 | 4 | 67.8              | 3.1  | 4 |
| 14,8148148 | 50.7               | 2.6 | 4 | 57.1              | 0.9  | 4 |
| 44,4444444 | 44.6               | 1.0 | 4 | 54.2              | 1.9  | 4 |
| 133,333333 | 35.5               | 3.3 | 4 | 49.3              | 1.4  | 4 |
| 400        | 12.5               | 1.6 | 4 | 37.2              | 9.1  | 4 |
| [µM]       |                    |     |   |                   |      |   |

Abbildung 9: Log 3 Verdünnungsreihe von PCI-13

Oben: Übersicht über die Einzelsuche (MW u. SD) für Erlotinib (n=4) und Gefitinib (n=4); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelsuche bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in µM (links).

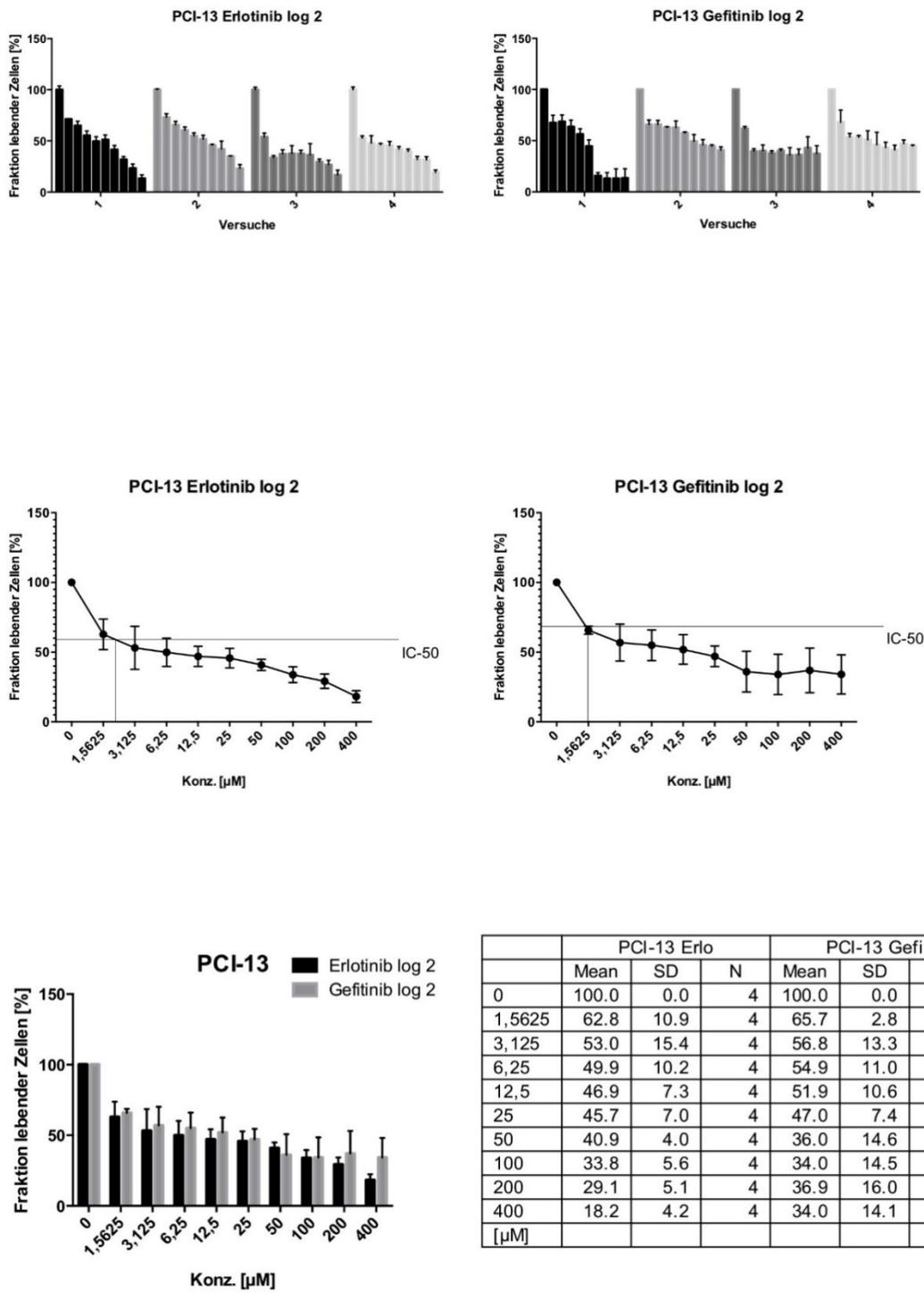
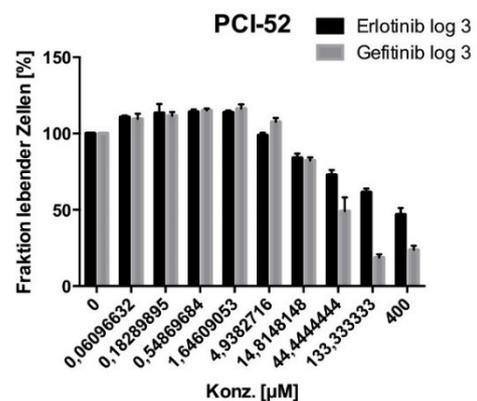
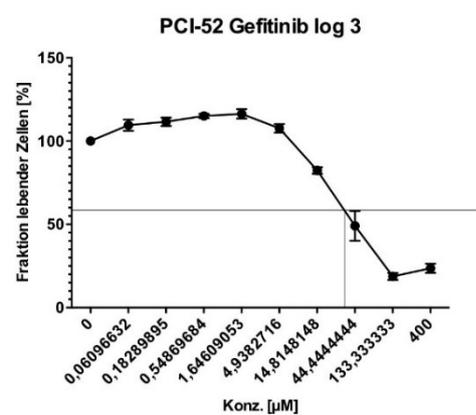
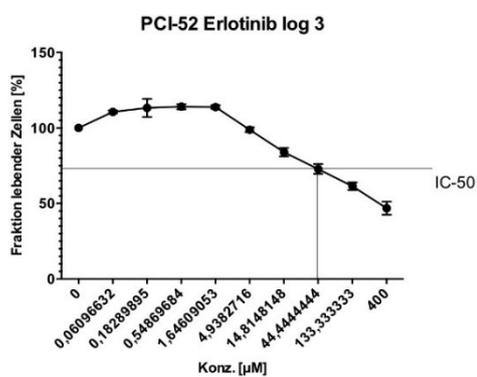
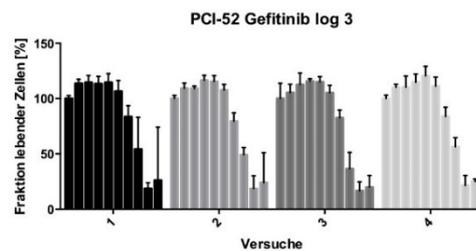
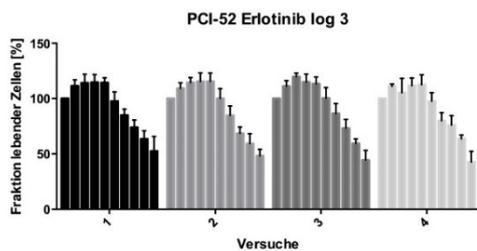


Abbildung 10: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-13

Oben: Übersicht über die Einzellersuche (MW u. SD) für Erlotinib (n=4) und Gefitinib (n=4); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelversuche bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in  $\mu$ M (links).



|             | PCI-52 Erlo log 3 |     |   | PCI-52 Gefi log 3 |     |   |
|-------------|-------------------|-----|---|-------------------|-----|---|
|             | Mean              | SD  | N | Mean              | SD  | N |
| 0           | 100.0             | 0.0 | 4 | 100.0             | 0.0 | 4 |
| 0,06096632  | 110.7             | 1.0 | 4 | 109.5             | 3.4 | 4 |
| 0,18289895  | 113.3             | 6.0 | 4 | 111.6             | 2.5 | 4 |
| 0,54869684  | 114.1             | 1.7 | 4 | 115.1             | 1.3 | 4 |
| 1,64609053  | 113.9             | 1.2 | 4 | 116.3             | 2.8 | 4 |
| 4,9382716   | 98.9              | 1.5 | 4 | 107.6             | 2.6 | 4 |
| 14,8148148  | 84.0              | 2.8 | 4 | 82.4              | 2.0 | 4 |
| 44,4444444  | 72.8              | 3.2 | 4 | 49.1              | 8.9 | 4 |
| 133,3333333 | 61.4              | 2.5 | 4 | 18.7              | 2.0 | 4 |
| 400         | 46.8              | 4.3 | 4 | 23.7              | 2.7 | 4 |
| [µM]        |                   |     |   |                   |     |   |

Abbildung 11: Log 3 Verdünnungsreihe von PC 52

Oben: Übersicht über die Einzelergebnisse (MW u. SD) für Erlotinib (n=4) und Gefitinib (n=4); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelergebnisse bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in µM (links).

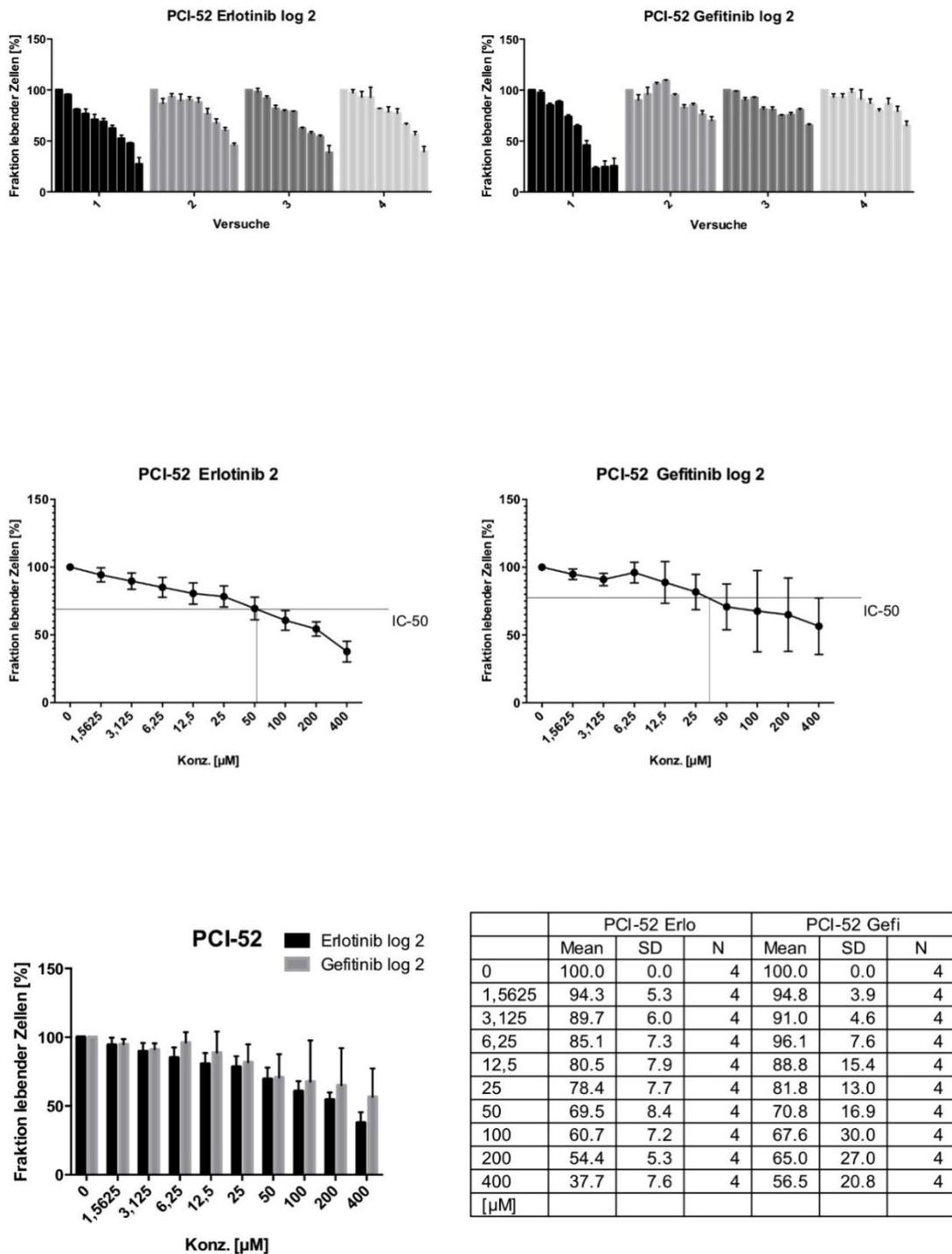
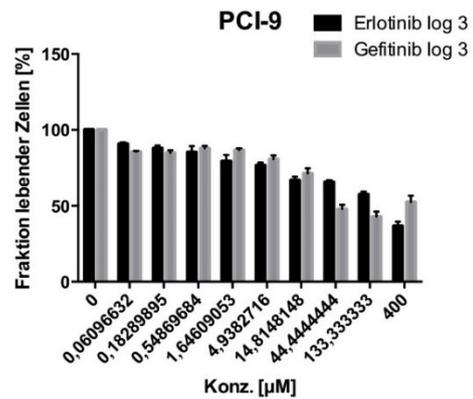
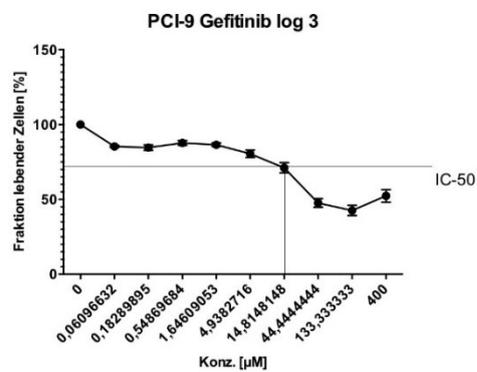
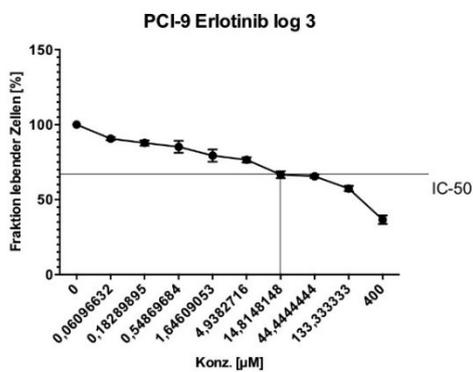
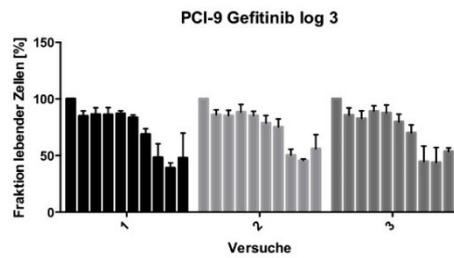
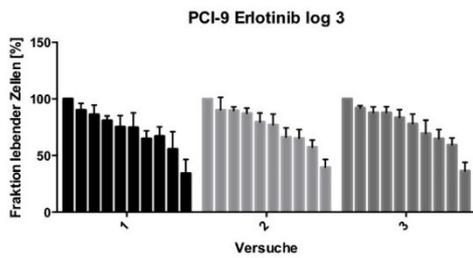


Abbildung 12: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-52

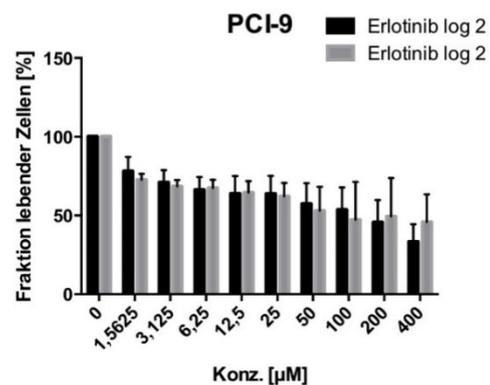
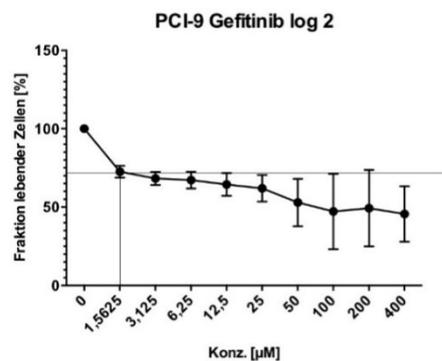
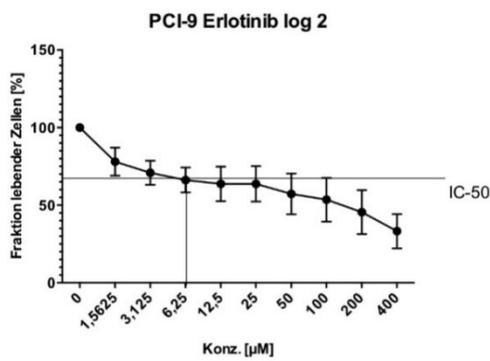
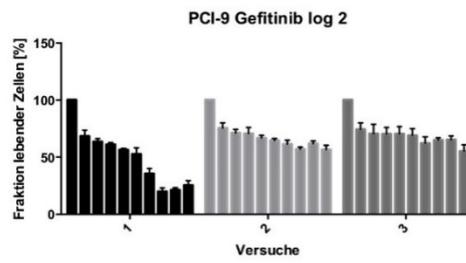
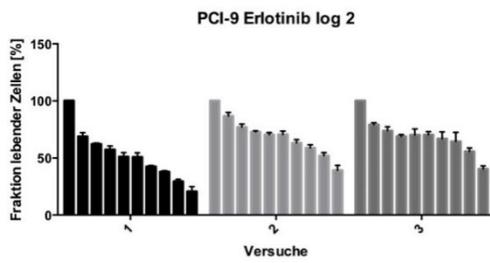
Oben: Übersicht über die Einzelercherche (MW u. SD) für Erlotinib (n=4) und Gefitinib (n=4); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelversuche bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in  $\mu$ M (links).



|            | PCI-9 Erlo log 3 |     |   | PCI-9 Gefi log 3 |     |   |
|------------|------------------|-----|---|------------------|-----|---|
|            | Mean             | SD  | N | Mean             | SD  | N |
| 0          | 100.0            | 0.0 | 3 | 100.0            | 0.0 | 3 |
| 0,06096632 | 90.7             | 1.0 | 3 | 85.4             | 0.6 | 3 |
| 0,18289895 | 87.8             | 1.8 | 3 | 84.6             | 1.9 | 3 |
| 0,54869684 | 85.2             | 4.0 | 3 | 87.7             | 1.6 | 3 |
| 1,64609053 | 79.3             | 4.1 | 3 | 86.5             | 1.2 | 3 |
| 4,9382716  | 76.5             | 1.8 | 3 | 80.5             | 2.5 | 3 |
| 14,8148148 | 66.7             | 2.4 | 3 | 71.1             | 3.5 | 3 |
| 44,4444444 | 65.6             | 1.2 | 3 | 47.6             | 2.9 | 3 |
| 133,333333 | 57.4             | 1.8 | 3 | 42.7             | 3.4 | 3 |
| 400        | 36.6             | 2.8 | 3 | 52.4             | 4.2 | 3 |
| [µM]       |                  |     |   |                  |     |   |

Abbildung 13: Log 3 Verdünnungsreihe von PCI-9

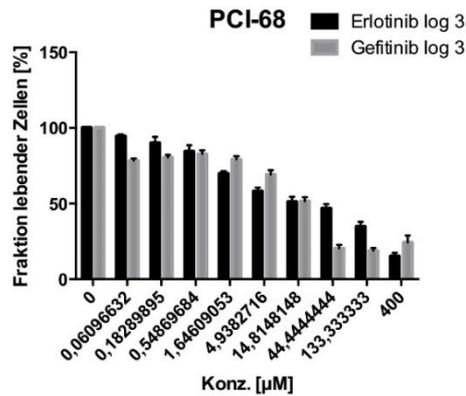
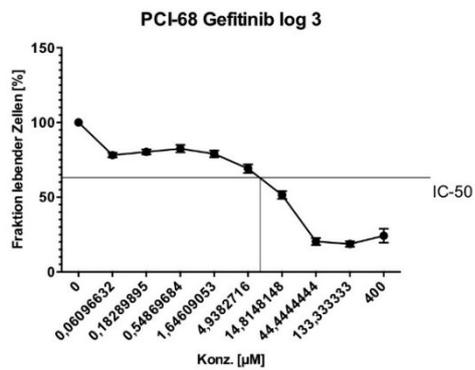
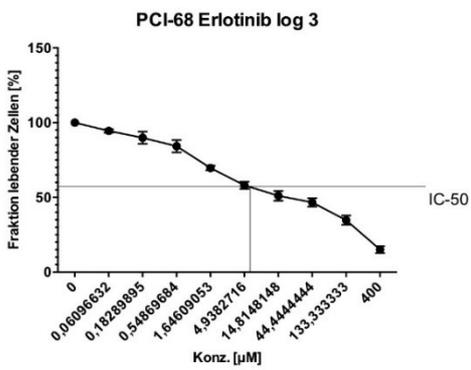
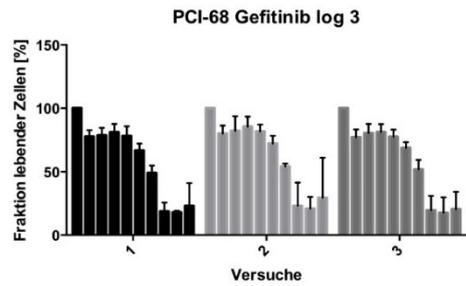
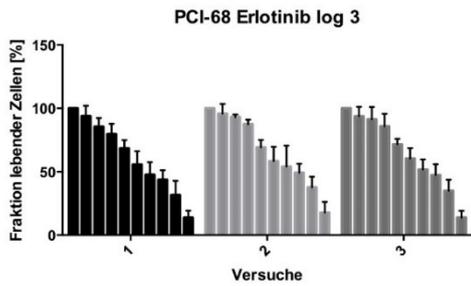
Oben: Übersicht über die Einzellersuche (MW u. SD) für Erlotinib (n=3) und Gefitinib (n=3); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzerversuche bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in µM (links).



|        | PCI-9 Erlö |      |   | PCI-9 Gefi |      |   |
|--------|------------|------|---|------------|------|---|
|        | Mean       | SD   | N | Mean       | SD   | N |
| 0      | 100.0      | 0.0  | 3 | 100.0      | 0.0  | 3 |
| 1,5625 | 78.0       | 9.0  | 3 | 72.6       | 3.8  | 3 |
| 3,125  | 70.9       | 7.8  | 3 | 68.3       | 4.2  | 3 |
| 6,25   | 66.2       | 8.0  | 3 | 67.3       | 5.3  | 3 |
| 12,5   | 63.8       | 11.1 | 3 | 64.5       | 7.3  | 3 |
| 25     | 63.7       | 11.4 | 3 | 62.0       | 8.5  | 3 |
| 50     | 57.3       | 13.2 | 3 | 52.9       | 15.1 | 3 |
| 100    | 53.6       | 14.1 | 3 | 47.2       | 24.0 | 3 |
| 200    | 45.6       | 14.2 | 3 | 49.3       | 24.4 | 3 |
| 400    | 33.3       | 11.1 | 3 | 45.7       | 17.6 | 3 |
| [µM]   |            |      |   |            |      |   |

Abbildung 14: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-9

Oben: Übersicht über die Einzelerste (MW u. SD) für Erlotinib (n=3) und Gefitinib (n=3); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelerste bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in µM (links).



|            | PCI-68 Erlo log 3 |     |   | PCI-68 Gefi log 3 |     |   |
|------------|-------------------|-----|---|-------------------|-----|---|
|            | Mean              | SD  | N | Mean              | SD  | N |
| 0          | 100.0             | 0.0 | 3 | 100.0             | 0.0 | 3 |
| 0,06096632 | 94.5              | 1.1 | 3 | 78.2              | 1.5 | 3 |
| 0,18289895 | 89.9              | 4.0 | 3 | 80.3              | 1.8 | 3 |
| 0,54869684 | 84.3              | 4.1 | 3 | 82.5              | 2.5 | 3 |
| 1,64609053 | 69.7              | 1.6 | 3 | 79.0              | 2.2 | 3 |
| 4,9382716  | 58.1              | 2.4 | 3 | 69.1              | 2.8 | 3 |
| 14,8148148 | 51.1              | 3.2 | 3 | 51.5              | 2.6 | 3 |
| 44,4444444 | 46.7              | 2.9 | 3 | 20.3              | 2.3 | 3 |
| 133,333333 | 34.7              | 3.1 | 3 | 18.7              | 1.8 | 3 |
| 400        | 15.0              | 2.3 | 3 | 24.2              | 4.6 | 3 |
| [µM]       |                   |     |   |                   |     |   |

Abbildung 15: Log 3 Verdünnungsreihe von PCI-68

Oben: Übersicht über die Einzelerste (MW u. SD) für Erlotinib (n=3) und Gefitinib (n=3); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelerste bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in µM (links).

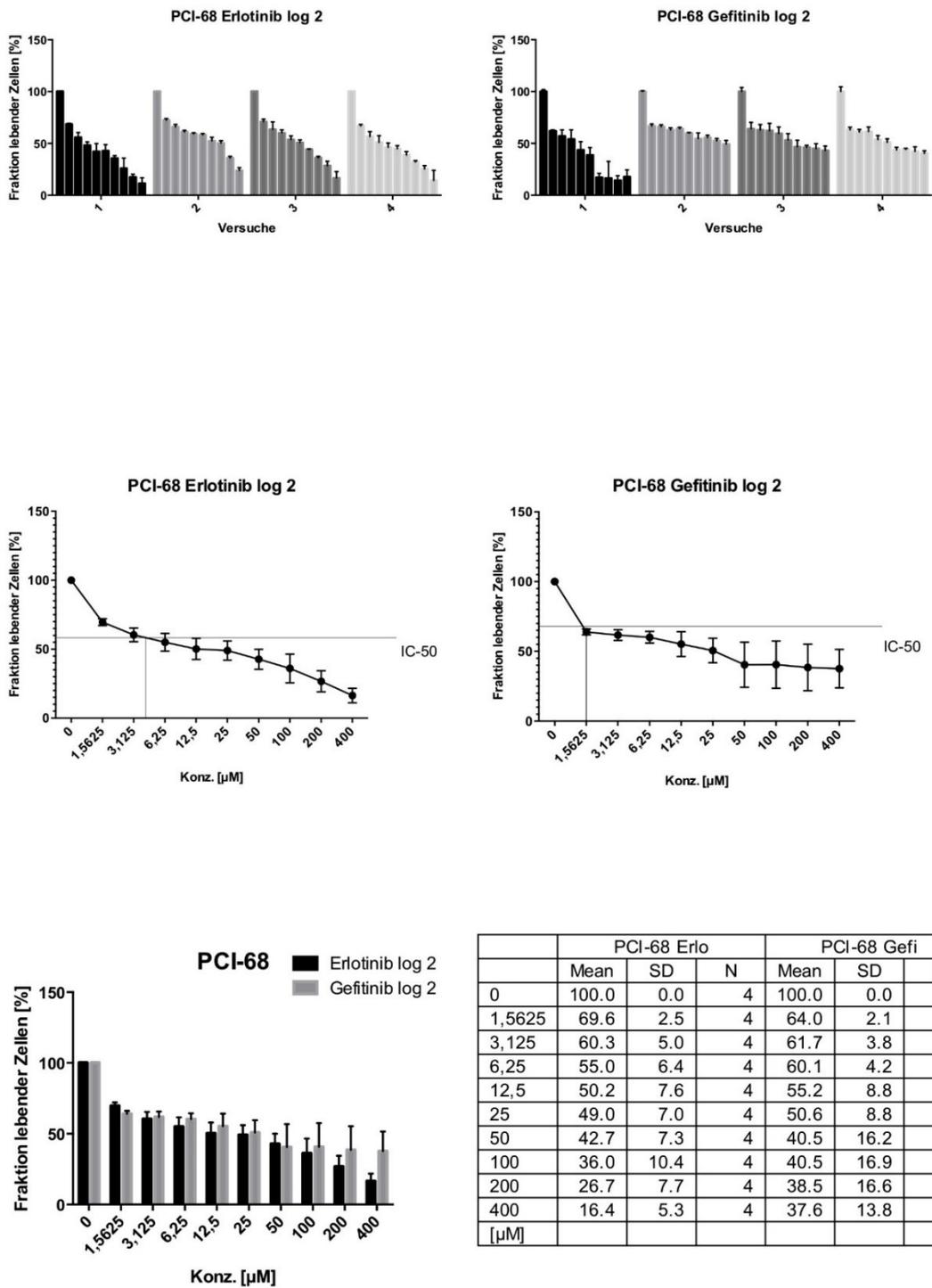


Abbildung 16: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-68

Oben: Übersicht über die Einzellersuche (MW u. SD) für Erlotinib (n=4) und Gefitinib (n=4); Mitte: Übersicht mit Bestimmung der IC-50; unten: Ergebnisse grafisch (links) und tabellarisch (rechts) zusammengefasst. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (Mean) aus der Zusammenführung der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD) und N = Anzahl der Einzelversuche bei verschiedenen Konzentrationen Erlotinib und Gefitinib in  $\mu\text{M}$  (links).

### 3. Kombination 1

Die aus den zuvor beschriebenen Versuchen ermittelten IC-50 Werte der Hemmstoffe Erlotinib und Gefitinib der jeweiligen Zellkulturen wurden hier verwendet, um anhand dieser die Kombination mit Cetuximab in log 2 Verdünnungsreihe zu testen. Für die IC-50 Werte in den hier dargestellten Kombinationsversuchen wurden die folgenden gerundeten Mittelwertkonzentrationen verwendet: Für PCI-1 waren dies 1  $\mu\text{M}$  Erlotinib sowie Gefitinib, für die PCI-13 6  $\mu\text{M}$  Erlotinib und 3  $\mu\text{M}$  Gefitinib, bei der PCI-52 47  $\mu\text{M}$  für Erlotinib und 36  $\mu\text{M}$  für Gefitinib, bei der PCI-9 11  $\mu\text{M}$  und 8  $\mu\text{M}$  für Erlotinib bzw. Gefitinib, sowie 5  $\mu\text{M}$  Erlotinib und 7  $\mu\text{M}$  Gefitinib bei der Zelllinie PCI-68. Die Werte der Linie A 431 lagen bei jeweils 2  $\mu\text{M}$  pro Medikament. Die maximale Cetuximabkonzentration lag hier bei 400  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , die minimale lag bei 0,8  $\text{mg}/\text{dl}$ . Zur Kontrolle diente neben Medium die alleinige Gabe von 400  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cetuximab. In keiner Kultur konnte ein wirkungsverstärkender Einfluss durch die zusätzliche Gabe von Cetuximab zu Erlotinib oder Gefitinib beobachtet werden.

Für die alleinige Gabe von 400  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cetuximab fanden sich bei Zelllinie A 431 84 % (SD = 11,8), bei PCI-1 76 % (SD = 8,6), bei PCI-13 85 % (SD = 2,4), bei PCI-9 92 % (SD = 4,2), bei PCI-68 94 % (SD = 3,1) und bei PCI-52 97 % (SD = 4,3) überlebender Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Auch in dieser Versuchsreihe sprach die Zelllinie PCI-52 am schlechtesten auf die Medikamente an. Bei der Kombination mit Erlotinib lagen die Ergebnisse für die Linie A 431 von 61 % bis 71 %, für PCI-1 zwischen 50 % und 55 %, bei der PCI-13 im Bereich von 34 % bis 41 %, für PCI-9 bei 61 % bis 73 %, für PCI-68 zwischen 58 % und 69 % sowie bei der Zelllinie PCI-52 im Bereich zwischen 74 % und 94 % lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombination mit Gefitinib ergab für A 431 Werte von 68 % bis 75 %, für die PCI-1 zwischen 46 % und 54 %, bei der PCI-13 55 % bis 65 %, für die PCI-9 zwischen 65 % und 75 %, für die PCI-68 von 65 % bis 78 % und im Falle der PCI-52 zwischen 72 % und 83 % im Vergleich zu Kontrollkollektiv. Die einzelnen Ergebnisse der Kombinationstherapie sind im Folgenden tabellarisch und graphisch aufgeführt.

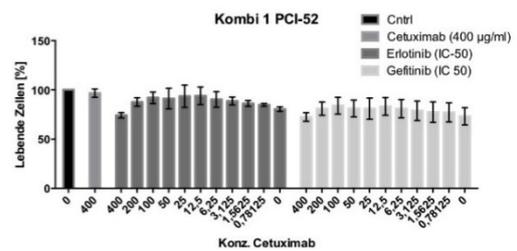
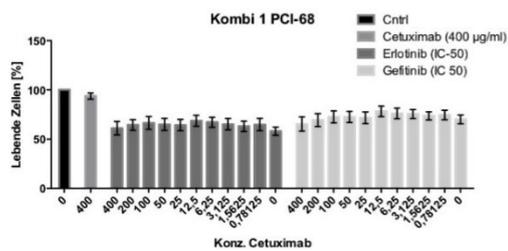
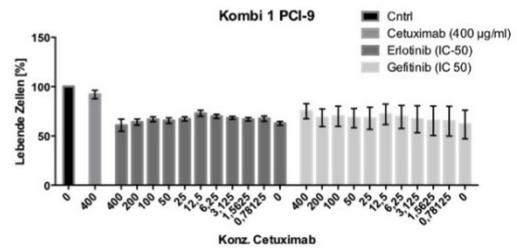
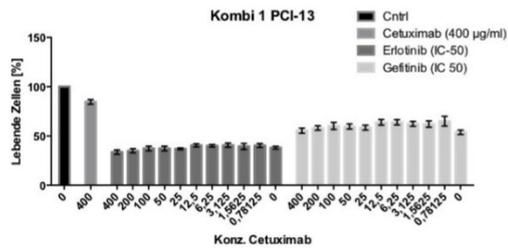
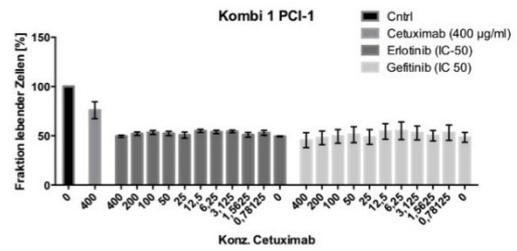
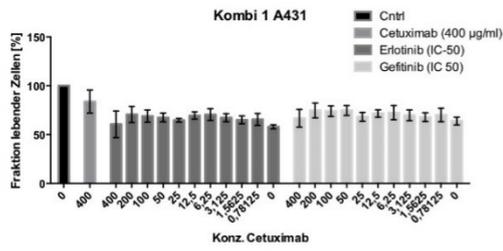


Abbildung 17: Graphische Zusammenfassung der Mittelwerte (MW) der Einzelergebnisse der Kombination 1. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an

Tabelle 7: Ergebnisse der Kombinationen von Erlotinib bzw. Gefitinib mit Cetuximab. Diese sind Mittelwerte (Mean) der Einzelversuche und geben die Prozentzahl überlebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle wieder. Die Standardabweichung ist mit SD gekennzeichnet. Kontrollen liegen bei 100%. Links sind jeweils die Konzentrationen Cetuximab dargestellt, welche mit der IC-50 des jeweiligen Stoffes kombiniert wurden. N = Anzahl der Versuche.

A 431

|                      | Erlotinib (IC-50) |      |   | Gefitinib (IC-50) |     |   |
|----------------------|-------------------|------|---|-------------------|-----|---|
|                      | Mean              | SD   | N | Mean              | SD  | N |
| 400                  | 60.7              | 13.7 | 3 | 66.8              | 9.2 | 3 |
| 200                  | 70.7              | 8.3  | 3 | 74.8              | 7.6 | 3 |
| 100                  | 68.9              | 6.2  | 3 | 74.0              | 5.4 | 3 |
| 50                   | 67.6              | 4.5  | 3 | 74.8              | 5.0 | 3 |
| 25                   | 64.8              | 1.9  | 3 | 68.3              | 4.5 | 3 |
| 12,5                 | 69.5              | 3.7  | 3 | 71.7              | 3.8 | 3 |
| 6,25                 | 70.6              | 6.0  | 3 | 72.6              | 7.3 | 3 |
| 3,125                | 67.4              | 4.1  | 3 | 69.8              | 5.5 | 3 |
| 1,5625               | 65.1              | 4.1  | 3 | 68.0              | 4.5 | 3 |
| 0,78125              | 65.6              | 6.1  | 3 | 70.1              | 6.9 | 3 |
| 0                    | 58.1              | 2.1  | 3 | 64.0              | 4.0 | 3 |
| Cetuximab [ $\mu$ M] |                   |      |   |                   |     |   |

PCI-1

|                      | Erlotinib (IC-50) |     |   | Gefitinib (IC-50) |     |   |
|----------------------|-------------------|-----|---|-------------------|-----|---|
|                      | Mean              | SD  | N | Mean              | SD  | N |
| 400                  | 49.6              | 1.2 | 3 | 45.5              | 7.5 | 3 |
| 200                  | 52.2              | 1.8 | 3 | 47.9              | 6.9 | 3 |
| 100                  | 53.4              | 2.1 | 3 | 49.4              | 6.9 | 3 |
| 50                   | 52.4              | 2.1 | 3 | 51.1              | 8.0 | 3 |
| 25                   | 50.8              | 3.0 | 3 | 48.7              | 7.4 | 3 |
| 12,5                 | 55.1              | 1.6 | 3 | 54.4              | 7.9 | 3 |
| 6,25                 | 54.0              | 1.7 | 3 | 55.1              | 9.0 | 3 |
| 3,125                | 54.4              | 1.4 | 3 | 53.0              | 7.1 | 3 |
| 1,5625               | 51.0              | 2.4 | 3 | 50.2              | 5.3 | 3 |
| 0,78125              | 53.1              | 2.5 | 3 | 53.1              | 7.8 | 3 |
| 0                    | 49.5              | 0.4 | 3 | 48.5              | 5.0 | 3 |
| Cetuximab [ $\mu$ M] |                   |     |   |                   |     |   |

PCI-13

|                      | Erlotinib (IC-50) |     |   | Gefitinib (IC-50) |     |   |
|----------------------|-------------------|-----|---|-------------------|-----|---|
|                      | Mean              | SD  | N | Mean              | SD  | N |
| 400                  | 33.7              | 2.2 | 3 | 55.4              | 2.7 | 3 |
| 200                  | 35.0              | 2.1 | 3 | 58.1              | 2.2 | 3 |
| 100                  | 37.4              | 2.3 | 3 | 60.2              | 3.6 | 3 |
| 50                   | 37.4              | 2.3 | 3 | 59.6              | 2.7 | 3 |
| 25                   | 37.0              | 0.9 | 3 | 58.5              | 2.6 | 3 |
| 12,5                 | 40.5              | 1.5 | 3 | 63.9              | 2.8 | 3 |
| 6,25                 | 40.0              | 1.3 | 3 | 63.9              | 2.7 | 3 |
| 3,125                | 40.6              | 2.1 | 3 | 62.4              | 2.5 | 3 |
| 1,5625               | 39.5              | 3.1 | 3 | 62.0              | 3.3 | 3 |
| 0,78125              | 40.4              | 2.0 | 3 | 65.0              | 4.9 | 3 |
| 0                    | 38.2              | 1.4 | 3 | 53.8              | 2.2 | 3 |
| Cetuximab [ $\mu$ M] |                   |     |   |                   |     |   |

PCI-9

|                      | Erlotinib (IC-50) |     |   | Gefitinib (IC-50) |      |   |
|----------------------|-------------------|-----|---|-------------------|------|---|
|                      | Mean              | SD  | N | Mean              | SD   | N |
| 400                  | 60.8              | 6.2 | 4 | 75.1              | 7.7  | 4 |
| 200                  | 64.1              | 3.2 | 4 | 68.5              | 8.9  | 4 |
| 100                  | 66.9              | 2.4 | 4 | 69.9              | 10.1 | 4 |
| 50                   | 65.5              | 2.8 | 4 | 68.2              | 9.8  | 4 |
| 25                   | 67.2              | 2.1 | 4 | 67.9              | 11.2 | 4 |
| 12,5                 | 72.9              | 3.1 | 4 | 71.9              | 10.4 | 4 |
| 6,25                 | 69.9              | 2.2 | 4 | 69.2              | 11.7 | 4 |
| 3,125                | 68.3              | 1.5 | 4 | 67.0              | 13.7 | 4 |
| 1,5625               | 66.9              | 1.9 | 4 | 65.4              | 14.8 | 4 |
| 0,78125              | 67.5              | 2.8 | 4 | 64.9              | 15.0 | 4 |
| 0                    | 62.8              | 1.9 | 4 | 61.7              | 14.5 | 4 |
| Cetuximab [ $\mu$ M] |                   |     |   |                   |      |   |

PCI-68

|                      | Erlotinib (IC-50) |     |   | Gefitinib (IC-50) |     |   |
|----------------------|-------------------|-----|---|-------------------|-----|---|
|                      | Mean              | SD  | N | Mean              | SD  | N |
| 400                  | 61.1              | 6.8 | 5 | 65.4              | 7.2 | 5 |
| 200                  | 64.5              | 5.4 | 5 | 69.4              | 6.5 | 5 |
| 100                  | 66.5              | 6.5 | 5 | 72.6              | 6.1 | 5 |
| 50                   | 65.0              | 6.1 | 5 | 72.6              | 5.5 | 5 |
| 25                   | 64.2              | 5.8 | 5 | 71.7              | 5.9 | 5 |
| 12,5                 | 68.6              | 5.6 | 5 | 78.2              | 5.3 | 5 |
| 6,25                 | 67.2              | 5.1 | 5 | 76.1              | 5.4 | 5 |
| 3,125                | 65.2              | 5.8 | 5 | 75.4              | 4.6 | 5 |
| 1,5625               | 63.0              | 5.2 | 5 | 73.6              | 4.2 | 5 |
| 0,78125              | 64.7              | 6.3 | 5 | 74.6              | 4.9 | 5 |
| 0                    | 58.1              | 4.2 | 5 | 70.1              | 4.5 | 5 |
| Cetuximab [ $\mu$ M] |                   |     |   |                   |     |   |

PCI-52

|                      | Erlotinib (IC-50) |      |   | Gefitinib (IC-50) |      |   |
|----------------------|-------------------|------|---|-------------------|------|---|
|                      | Mean              | SD   | N | Mean              | SD   | N |
| 400                  | 74.3              | 2.7  | 5 | 72.4              | 4.4  | 5 |
| 200                  | 87.7              | 4.4  | 5 | 80.9              | 6.7  | 5 |
| 100                  | 92.0              | 5.9  | 5 | 84.0              | 8.5  | 5 |
| 50                   | 91.2              | 10.4 | 5 | 81.1              | 8.5  | 5 |
| 25                   | 93.6              | 11.3 | 5 | 81.0              | 10.7 | 5 |
| 12,5                 | 94.0              | 8.9  | 5 | 83.2              | 8.9  | 5 |
| 6,25                 | 90.3              | 7.9  | 5 | 81.0              | 9.3  | 5 |
| 3,125                | 88.7              | 4.0  | 5 | 78.9              | 9.9  | 5 |
| 1,5625               | 86.2              | 3.0  | 5 | 77.5              | 10.3 | 5 |
| 0,78125              | 84.8              | 1.4  | 5 | 77.1              | 9.8  | 5 |
| 0                    | 80.5              | 2.3  | 5 | 73.2              | 8.8  | 5 |
| Cetuximab [ $\mu$ M] |                   |      |   |                   |      |   |

#### 4. Kombination 2

Im Folgenden wurde eine Dosis von 400 µg/ml Cetuximab alleine mit 400 µM Erlotinib bzw. Gefitinib, verglichen und kombiniert. Ebenso wurde auch die angenommene IC-50 mit 400 µg/ml Cetuximab kombiniert. Die Konzentrationen für die IC-50 wurden wie schon bei Kombination 1 beschrieben erhoben. Die Mittelwerte der Ergebnisse für Cetuximab in einer Konzentration von 400 µg/ml lagen für die Zelllinie A 431 bei 78 % (SD = 3,2), für PCI-68 bei 88 % (SD = 4,5), für PCI-9 bei 84 % (SD = 6,7), für PCI-52 bei 93 % (SD = 3,0). Für PCI-1 und 13-1 (beide lediglich n=2) ergaben sich Mittelwerte von 65 % für erstere und 85 % für letztere. Auch in dieser Versuchsreihe konnte selbst bei der Kombination höchster Konzentrationen keine Verbesserung des antitumorösen Effektes der drei Medikamente gezeigt werden. Auch bei Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der alleinigen Gabe der IC-50 Konzentrationen von Erlotinib oder Gefitinib und der Kombination eben dieser mit 400 µg/ml Cetuximab.

Tabelle 8: Zusammenfassung der verschiedenen Kombinationen von Cetuximab mit Erlotinib und Gefitinib. Die Ergebnisse sind in Mittelwerten (Mean) mit Standardabweichung (SD) dargestellt. N = Anzahl der Versuche. A = Medikament (Erlotinib oder Gefitinib), Cetu = Cetuximab

A 431

|                    | Erlotinib |     |   | Gefitinib |     |   |
|--------------------|-----------|-----|---|-----------|-----|---|
|                    | Mean      | SD  | N | Mean      | SD  | N |
| A (400 µM)         | 11.5      | 0.6 | 3 | 18.5      | 1.3 | 3 |
| A IC50             | 45.5      | 0.3 | 3 | 48.4      | 2.9 | 3 |
| A IC50+Cetu        | 45.8      | 3.2 | 3 | 48.2      | 3.9 | 3 |
| A (400 µM ) + Cetu | 12.2      | 1.2 | 3 | 16.4      | 1.5 | 3 |

PCI-68

|                    | Erlotinib |     |   | Gefitinib |     |   |
|--------------------|-----------|-----|---|-----------|-----|---|
|                    | Mean      | SD  | N | Mean      | SD  | N |
| A (400 µM)         | 17.8      | 1.3 | 3 | 26.9      | 1.5 | 3 |
| A IC50             | 67.6      | 4.1 | 3 | 68.4      | 6.3 | 3 |
| A IC50+Cetu        | 56.8      | 5.3 | 3 | 62.3      | 4.3 | 3 |
| A (400 µM ) + Cetu | 21.9      | 4.0 | 3 | 24.1      | 2.0 | 3 |

PCI-9

|                    | Erlotinib |     |   | Gefitinib |     |   |
|--------------------|-----------|-----|---|-----------|-----|---|
|                    | Mean      | SD  | N | Mean      | SD  | N |
| A (400 µM)         | 33.6      | 1.3 | 3 | 46.9      | 6.1 | 3 |
| A IC50             | 61.6      | 2.3 | 3 | 68.8      | 4.1 | 3 |
| A IC50+Cetu        | 61.2      | 3.8 | 3 | 84.4      | 5.7 | 3 |
| A (400 µM ) + Cetu | 38.2      | 3.1 | 3 | 36.0      | 2.1 | 3 |

PCI-52

|                    | Erlotinib |     |   | Gefitinib |     |   |
|--------------------|-----------|-----|---|-----------|-----|---|
|                    | Mean      | SD  | N | Mean      | SD  | N |
| A (400 µM)         | 31.2      | 1.8 | 3 | 60.3      | 6.8 | 3 |
| A IC50             | 69.6      | 4.7 | 3 | 55.7      | 3.5 | 3 |
| A IC50+Cetu        | 64.5      | 5.9 | 3 | 47.3      | 2.3 | 3 |
| A (400 µM ) + Cetu | 38.5      | 3.6 | 3 | 32.5      | 2.6 | 3 |

PCI-1

|                         | Erlotinib |     |   | Gefitinib |     |   |
|-------------------------|-----------|-----|---|-----------|-----|---|
|                         | Mean      | SD  | N | Mean      | SD  | N |
| A (400 $\mu$ M)         | 12.2      | 1.0 | 2 | 19.8      | 0.5 | 2 |
| A IC50                  | 44.5      | 0.4 | 2 | 57.1      | 2.8 | 2 |
| A IC50+Cetu             | 43.1      | 0.4 | 2 | 44.6      | 0.3 | 2 |
| A (400 $\mu$ M ) + Cetu | 13.3      | 0.3 | 2 | 14.1      | 0.8 | 2 |

PCI-13

|                         | Erlotinib |          |   | Gefitinib |     |   |
|-------------------------|-----------|----------|---|-----------|-----|---|
|                         | Mean      | SD       | N | Mean      | SD  | N |
| A (400 $\mu$ M)         | 16.1      | 1.2e-002 | 2 | 23.0      | 1.1 | 2 |
| A IC50                  | 65.8      | 2.4      | 2 | 58.0      | 2.0 | 2 |
| A IC50+Cetu             | 54.5      | 3.6      | 2 | 63.1      | 2.1 | 2 |
| A (400 $\mu$ M ) + Cetu | 19.8      | 1.2      | 2 | 21.1      | 0.4 | 2 |

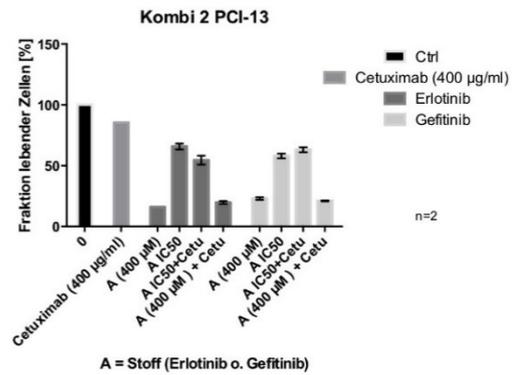
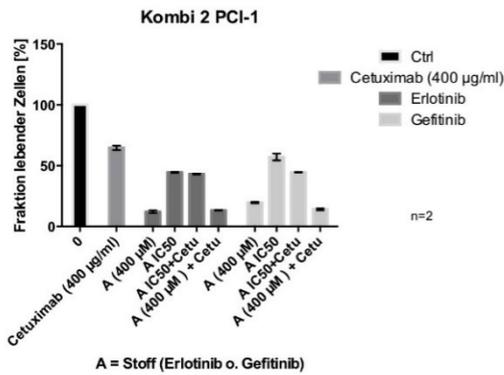
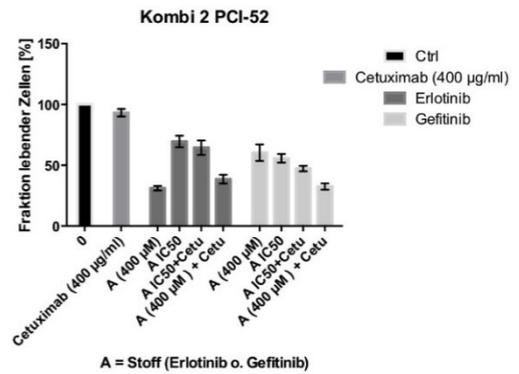
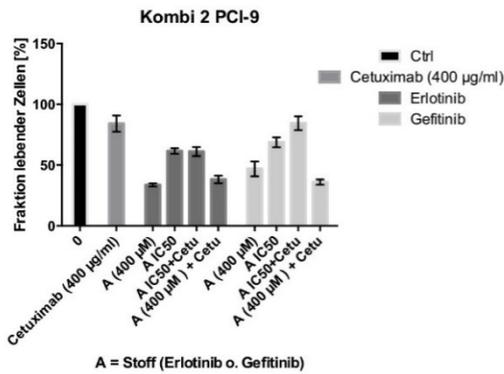
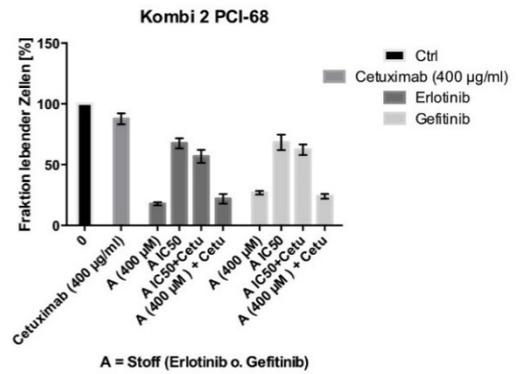
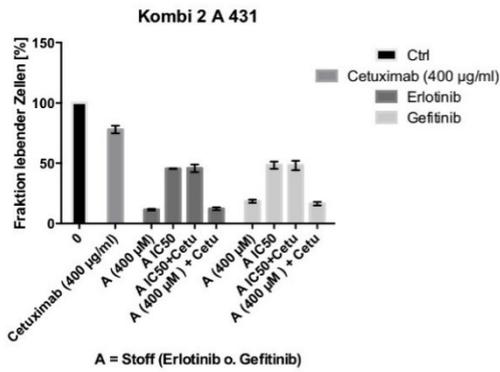


Abbildung 18: Graphische Darstellung der zuvor tabellarisch aufgeführten Werte der Kombination 2 in Mittelwerten mit Standardabweichung

## 5. Vergleich der relevanter Serumkonzentrationen

Aus den eben beschriebenen Versuchsreihen wurden nun klinische Serumkonzentrationen miteinander verglichen. Als Referenz dienten in der Literatur beschriebene maximale Serumkonzentrationen [112, 113].

Hierfür wurde eine Cetuximabkonzentration von 100 µg/ml gewählt und mit Erlotinib bzw. Gefitinib bei Werten von ca. 0,5 µM, 1,6 µM und 5,5 µM verglichen. Der Wert von 0,5 µM konnte lediglich aus der log 3 Verdünnung gewonnen werden. Der Bereich von 1,6 µM wurde durch Zusammenfassen der Verdünnungsschritte aus log 2 mit 1,56 µM und log 3 mit 1,64 µM bestimmt.

Bei einer Konzentration von 0,5 µM Erlotinib bzw. Gefitinib zeigten beide Medikamente bei den Zelllinien PCI-1 (jeweils  $p = 0,004$ ) und PCI-13 (jeweils  $p = 0,0286$ ) signifikant größere Wirkung als Cetuximab. Für die Linie PCI-68 ( $p = 0,0357$ ) trifft dies lediglich für Gefitinib zu. Der entsprechende p-Wert für Erlotinib lag hingegen bei 0,595 und ist somit statistisch nicht signifikant.

Vergleicht man jedoch die Ergebnisse bei einer Konzentration von circa 1,6 µM, so ergaben die erhobenen Werte dieser Zelllinie auch für Erlotinib einen signifikanten Unterschied zur Therapie mit Cetuximab. Der p-Wert liegt hier bei 0,0006. Mit  $p = 0,0012$  ist Gefitinib auch in dieser Konzentration bei der Linie PCI-68 signifikant wirkungsvoller als Cetuximab. Außerdem konnte bei der Konzentration von 1,6 µM zusätzlich ein statistisch signifikanter Unterschied bei der Linie PCI-9 zwischen Cetuximab und den beiden Tyrosinkinaseinhibitoren gefunden werden, welche sich auch hier im Rahmen der Versuche als wirkungsvoller erwiesen. ( $p = 0,0087$  für Erlotinib;  $p = 0,026$  für Gefitinib). Besonders die Ergebnisse für PCI-1 wiesen größere Effekte auf. Geringer fiel die Veränderung bei gleichen Maßnahmen für PCI-13 aus. (PCI-1:  $p = 0,0002$  für Erlotinib und Gefitinib; PCI-13:  $p = 0,0121$  für Erlotinib und Gefitinib).

Der Vergleich einer Konzentration von 5,5 µM Erlotinib bzw. Gefitinib bei gleicher Cetuximabkonzentration erbrachte lediglich für Gefitinib bei der Zelllinie PCI-9 eine

Verbesserung der Wirkung ( $p = 0,0022$ ). Bei der Linie PCI-68 lag der p-Wert bei dieser Konzentration für Erlotinib etwas höher, bei  $p = 0,0012$ .

Für die Zelllinie PCI-52 konnte in keiner der untersuchten Konzentrationen eine Wirksamkeit bei Gabe von Cetuximab, Erlotinib oder Gefitinib gezeigt werden.

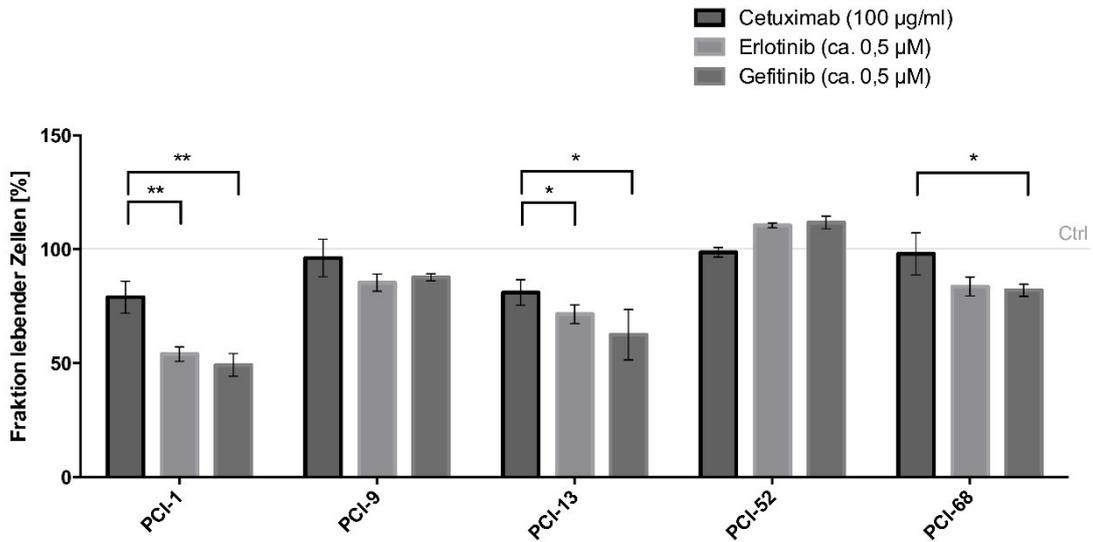


Abbildung 19: Die Werte sind aus den zuvor erhobenen Daten wie beschrieben zusammengefasst und in Mittelwerten mit Standardabweichung angegeben. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$

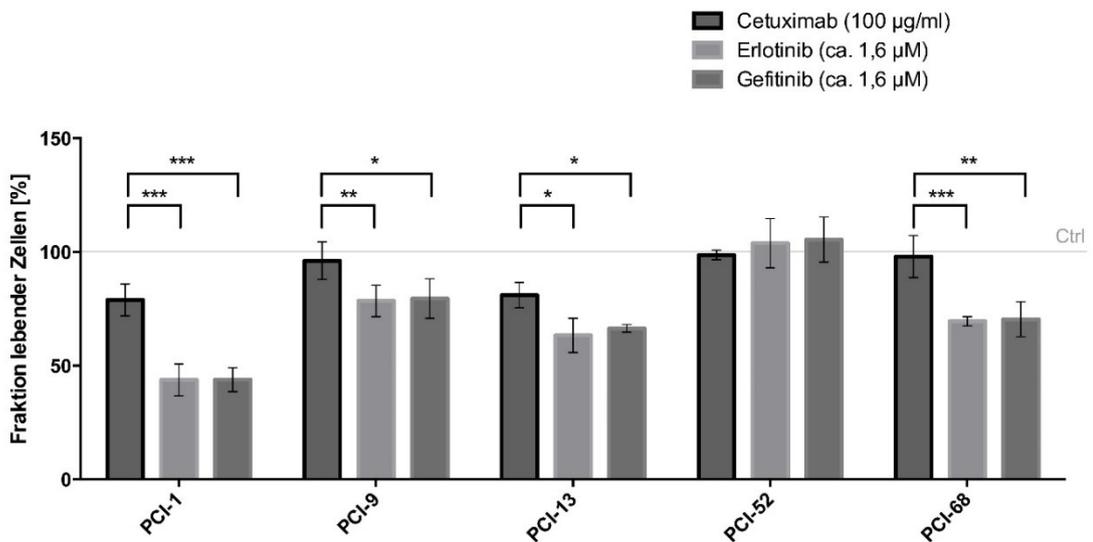


Abbildung 20: Die Werte sind aus den zuvor erhobenen Daten wie beschrieben zusammengefasst und in Mittelwerten mit Standardabweichung angegeben. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$

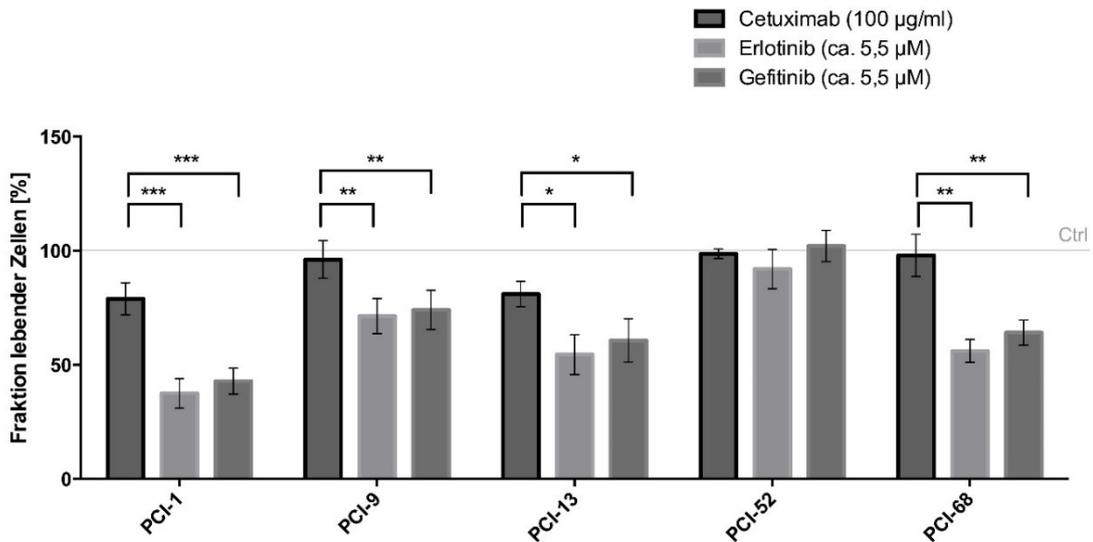


Abbildung 21: Die Werte sind aus den zuvor erhobenen Daten wie beschrieben zusammengefasst und in Mittelwerten mit Standardabweichung angegeben. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$

## 6. Western Blot Analyse

In der folgenden Abbildung werden Phosphorylierungsnachweise des EGFR der Zelllinien A 431, PCI-1, PCI-13, PCI-52, PCI-9 und PCI-68 erbracht. Hierbei wurde mit 50 ng/ml hEGF 10 min stimuliert und die Phosphorylierung bzw. deren Hemmung bei vorheriger Zugabe von 1,6 µM Erlotinib, Gefitinib und 100 µg/ml Cetuximab untersucht. Der verwendete Antikörper AK 12351 ist gegen Tyr 1173 des EGFR gerichtet. In allen Proben konnte hier eine Stimulierung der Phosphorylierung durch EGF, sowie eine Unterdrückung eben dieser durch die verwendeten Medikamente gezeigt werden.

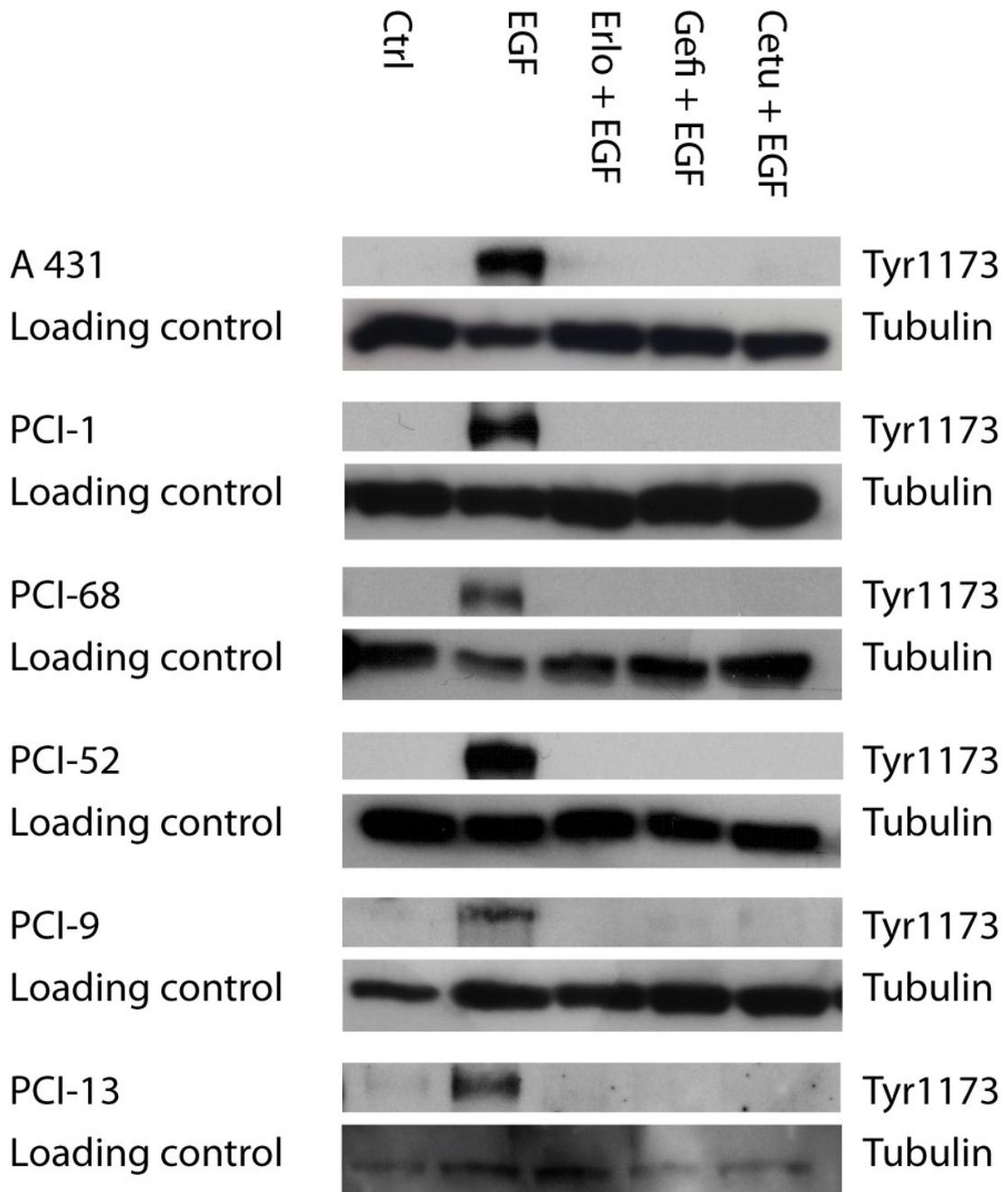


Abbildung 22: Phosphorylierungsnachweise an Tyr1173 des EGFR bei allen 6 Zelllinien, sowie deren Unterdrückung durch die Zugabe von 1,6  $\mu$ M Erlotinib bzw. Gefitinib und 100  $\mu$ g/ml Cetuximab. Die Ladekontrolle (Loading control) erfolgte jeweils mit Tubulin.

## 7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Aufgrund der Vielzahl von Versuchsansätzen werden die Ergebnisse hier noch einmal kurz zusammengefasst:

In keiner der verwendeten Zelllinien konnte, selbst bei sehr hohen Dosierungen, ein relevanter wachstumshemmender Effekt der Blockade des EGF-Rezeptors durch Cetuximab nachgewiesen werden.

Die Wirksamkeit von Erlotinib und Gefitinib in Bezug auf die Hemmung des Zellwachstums war in den vorliegenden Versuchen sehr ähnlich. Im Gegensatz zu Cetuximab konnte hier vor allem bei hohen Dosierungen eine starke Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden. Das schlechteste Ansprechen auf die beiden Tyrosinkinaseinhibitoren zeigte die Zelllinie PCI-52.

In der Kombination 1 sollte anhand der Zugabe aufsteigender Konzentrationen von Cetuximab zu den IC-50 Werten von Erlotinib beziehungsweise Gefitinib für die jeweilige Zellkultur evaluiert werden, ob dies einen Einfluss auf das Zellwachstum hat. In keiner der Zelllinien konnte jedoch ein wirkungsverbessernder Effekt einer zusätzlichen Gabe von Cetuximab gezeigt werden.

Dies konnte anhand der Kombination 2 bestätigt werden. Auch hier fand sich selbst bei einer Konzentration von 400 µg/ml Cetuximab kein statistisch signifikanter Unterschied zur alleinigen Gabe der IC-50 von Erlotinib oder Gefitinib. Im Unterschied dazu konnte jedoch durch eine Erhöhung der Konzentration der Tyrosinkinaseinhibitoren eine stärkere Hemmung des Zellwachstums bewirkt werden.

Beim Vergleich klinisch relevanter Dosierungen von 0,5 µM, 1,6 µM und 5,5 µM der beiden Tyrosinkinaseinhibitoren konnte im Falle der beiden höheren Konzentrationen bei allen Zelllinien, abgesehen von PCI-52, eine signifikant bessere Hemmung des Zellwachstums durch Erlotinib bzw. Gefitinib als durch Cetuximab gefunden werden. Bei der geringsten Konzentration war auch bei Zelllinie PCI-9 der

Unterschied nicht mehr signifikant. Die Zellreihe PCI-52 sprach bei allen 3 Konzentrationen auf keines der Medikamente an.

In der Western Blot-Analyse konnten durch Zugabe von EGF Phosphorylierungsnachweise an allen fünf Kopf-Hals-Karzinomzelllinien sowie der Zelllinie A 431 erbracht werden. Diese Phosphorylierung konnte durch 1,6  $\mu\text{M}$  Erlotinib bzw. Gefitinib und 100  $\mu\text{g/ml}$  Cetuximab unterdrückt und somit nicht mehr nachgewiesen werden.

## V. Diskussion

Die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren stellt trotz fortschreitender Entwicklung von Bildgebung, Operationstechnik, Radiotherapie und Chemotherapie nach wie vor eine besondere Herausforderung dar. So verwundert es, dass die Heilungsraten trotz stetiger wissenschaftlicher und technischer Weiterentwicklung dennoch seit etwa 30 Jahren bei circa 50 Prozent stagnieren [34]. Abgesehen von sehr kleinen Läsionen erfordern Kopf-Hals-Tumore ein Behandlungsschema, welches zur vollständigen Heilung nach wie vor die radikale Tumorexzision beinhaltet. Besonders bei fortgeschrittenem Tumorleiden ist dabei die postoperative Lebensqualität abhängig vom Resektionsausmaß signifikant verringert [5, 114].

Dies zeigt, wie wichtig es ist weitere Behandlungsoptionen zu evaluieren, um eine weitreichende Verbesserung der Lebensqualität sowie der Überlebenschancen zu erreichen.

Wie für verschiedene andere Tumore wurde der EGF-Rezeptor und die damit verbundenen Signalwege auch für das Kopf-Hals-Karzinom als entscheidende Faktoren der Tumorgenese und somit auch als vielversprechender Angriffspunkt identifiziert [115, 116]. Mit Cetuximab hat sich die gezielte, auf den EGFR gerichtete Therapie, für bestimmte Indikationen, wie dem lokal fortgeschrittenen, metastasierten oder rezidierten Kopf-Hals-Karzinom bereits in der Klinik etabliert [88, 117, 118]. Ob die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren ebenfalls eine Verbesserung der Therapieoptionen mit sich bringt ist derzeit umstritten [119].

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden in Zusammenhang mit dem aktuellen Wissenstand der Forschung diskutiert.

## 1. Grundlegendes zu den verwendeten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien

In vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Parameter erhoben, welche als Grundlage für eine fundierte Diskussion der in dieser Arbeit gewonnenen Werte in Betracht gezogen werden müssen.

Mittels FACS-Analyse konnte auf den Oberflächen aller Zelllinien die Expression von EGFR nachgewiesen werden. Nachweis der spezifischen Bindung an EGFR befand sich im Bereich von 96,9 % bis 97,5 %.

In jeweils drei konsekutiven ELISA-Messungen waren jedoch in keiner der Zelllinien relevante Mengen endogen produzierten EGFs nachweisbar.

Die Zelllinien PCI-1, PCI-13 und PCI-68 konnten selbst durch sehr hohe EGF-Konzentrationen von bis zu 500 ng/ml nicht zu vermehrtem Wachstum angeregt werden. Lediglich PCI-9 und PCI-52 zeigten ein leichtes Ansprechen auf Stimulation, wobei der Maximalwert eines 1,28 fachen Wachstumsanstiegs für PCI-52 gemessen wurde.

Bei der Mutationsanalyse durch Sanger-Sequenzierung von EGFR, KRAS, BRAF und PI3K fanden sich für alle Zelllinien Wildtyp-Exons. Des Weiteren konnte in jeder Linie die Mutation Q787Q und in der Zelllinie PCI-9 außerdem die Mutation T785T im Gen für den EGF-Rezeptor gefunden werden. Beide sind jedoch still und scheinen die Downstream-Signalwege nicht zu beeinflussen. Die Abwesenheit von Mutationen in KRAS, BRAF oder PI3K ist beim Kopf-Hals-Karzinom, im Gegensatz zum kolorektalen Karzinom oder dem malignen Melanom, häufig [111, 120, 121].

## 2. Vergleich der Einzeltherapien

Bei der Einzeltherapie mit Cetuximab war bei 4 von 6 Zellreihen keine signifikante Hemmung des Zellwachstums zu beobachten. Lediglich die Zelllinien PCI-1 und PCI-13 sprachen geringfügig auf Cetuximab an. Unterschiede in der Wirksamkeit einzelner Konzentrationen des Medikaments waren jedoch auch hier nicht statistisch signifikant.

Dies legt nahe, dass zumindest die übrigen Zelllinien A 431, PCI-52, PCI-9 und PCI-68 in der Zellkultur als resistent gegenüber Cetuximab anzusehen sind, wohingegen PCI-1 in geringem Maße sensibel zu sein scheint, was sich mit bereits publizierten Ergebnissen vorheriger Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deckt [107]. Für die Zelllinie PCI-13 konnte erst bei sehr hohen Dosierungen ab 50 µg/ml eine geringe, aber statistisch signifikante Hemmung nachgewiesen werden.

Dies ist relevant, da die Wirksamkeit von Cetuximab in der Literatur nicht nur der Blockade des EGF-Rezeptors, sondern teilweise in besonderem Maße der Antikörper getriggerten Immunreaktion (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity – ADCC) zugeschrieben wird, welche jedoch unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht vorhanden sein kann [122]. Da bekannte Mutationen im Signalweg als Grund für das mangelnde Ansprechen von Cetuximab auf die von uns verwendeten Zelllinien mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnten, ist dies ein Ansatz die ausbleibende Effektivität in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zu erklären. Die Relevanz dieser Annahme ergibt sich aus der Tatsache, dass aufgrund des klinischen Erfolges von Cetuximab weitere, nebenwirkungsärmere monoklonale Antikörper entwickelt wurden. Diese sind im Gegensatz zu Cetuximab rein humanen Ursprungs oder voll humanisierte Antikörper und haben dadurch ein geringeres immunogenes Potential, was das Auslösen einer ADCC erschwert. Eines dieser neueren Medikamente ist Panitumumab, ein voll humanisierter IgG2 Antikörper gegen EGFR, was ihm zwar ein günstigeres Nebenwirkungsprofil, aber ein geringeres bis gar kein Potential zur

antikörperabhängigen Zytotoxizität einbringt. Ob dieses geringer oder überhaupt nicht vorhanden ist, bleibt Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussionen [54, 123, 124]. Es kristallisiert sich jedoch mehr und mehr heraus, dass weder eine zusätzliche Gabe von Panitumumab zu konventioneller Chemotherapie, noch die alleinige Gabe des Antikörpers in Kombination mit Radiatio einen therapeutischen Vorteil bringt [125-127]. Ein direkter Vergleich zu Cetuximab wurde in diesen Studien jedoch nicht erbracht. Rezeptormutationen können jedoch ein besseres Ansprechen auf Panitumumab in bestimmten Fällen erklären und wurden im Zellkulturversuch beobachtet [104, 128].

Für Patienten mit einem kompetenten Immunsystem könnte dieser Umstand jedoch von Nachteil sein, da ein eventuell entscheidender Wirkmechanismus im Vergleich zu einer Therapie mit Cetuximab ausbleibt [54]. Dies zeigt, dass weitere Forschung im Bereich der ADCC notwendig ist, um zu verifizieren, welchen Anteil diese an der klinischen Wirksamkeit von Cetuximab und anderen monoklonalen Antikörpern hat.

Bei den beiden Tyrosinkinaseinhibitoren stellte sich ein sehr ähnliches Bild der Wirksamkeit dar. Auch hier war die Zelllinie PCI-1 besonders empfindlich gegenüber den verwendeten Medikamenten, wohingegen die Zelllinie PCI-52 nur sehr geringe, oder nur bei sehr hohen Dosierungen Ansprechraten zeigte. Generell war bei sehr hohen Konzentrationen im Gegensatz zu Cetuximab auch eine starke Hemmung des Zellwachstums zu beobachten. Dies muss jedoch nicht auf den eigentlichen Wirkmechanismus des Medikaments zurückzuführen sein, sondern kann auch lediglich Ausdruck toxischer Konzentrationen der beiden Medikamente sein. Weiterhin können „off-target“-Effekte, also nicht dem propagierten Wirkmechanismus entsprechende Effekte, welche durch den Angriff an anderer Stelle zustande kommen, verantwortlich für die beobachtete Wirksamkeit der beiden Tyrosinkinaseinhibitoren sein. Sowohl für Erlotinib, als auch für Gefitinib sind solche „off-target“-Effekte beschrieben und dienen als Erklärung für positive antitumoröse Effekte sowie als Ursache von Nebenwirkungen [129-133]. Als antitumorös wirksam wird besonders der Einfluss auf den Januskinase 2 (JAK

2) Signalweg verantwortlich gemacht. Dieser ist für Erlotinib nachgewiesen und ähnliche Mechanismen für beide Tyrosinkinaseinhibitoren werden angenommen [129, 133]. Auch beim Kopf-Hals-Karzinom erwies sich die gezielte Blockade des JAK 1 und 2 Signalweges als geeignet Tumorwachstum zu hemmen [134, 135].

Um also möglichst vergleichbare Werte zu finden, wurden die in der Literatur beschriebenen maximalen Serumkonzentrationen gewählt. Dies ermöglicht zwar nicht die Darstellung realistischer Verhältnisse, wie sie *in vivo* oder dreidimensionalen Geweben möglich ist, bietet jedoch die Möglichkeit klinisch relevante Konzentrationen im Rahmen der Zellkultur zu untersuchen und ihre Wirksamkeit zu vergleichen.

Das Dosierungsschema von Erlotinib beträgt 150 mg pro Tag. Für Gefitinib hingegen wird die tägliche Einnahme von 250 mg empfohlen. Hieraus ergeben sich aber anscheinend stark abweichende Serumkonzentrationen: Für Erlotinib bedeutet dies eine maximale Serumkonzentration von 2120 ng/ml (ca. 5,4  $\mu$ M), wohingegen die beschriebene Tagesdosis Gefitinib nur zu einer Konzentration von etwa 310 ng/ml bzw. circa 1  $\mu$ M führt. Die Angaben für Gefitinib schwanken zwischen 0,4  $\mu$ M und 1,4  $\mu$ M. Zur maximalen Serumkonzentration von Cetuximab gibt es Angaben zwischen 168  $\mu$ g/ml und 235  $\mu$ g/ml und 41  $\mu$ g/ml bis 85  $\mu$ g/ml [112, 113].

Vergleicht man nun diese Konzentrationen miteinander, so finden sich, abgesehen von der PCI-52, eine statistisch signifikant bessere Wirksamkeit der Tyrosinkinaseinhibitoren gegenüber Cetuximab. Für eine Konzentration von 0,5  $\mu$ M trifft dies immerhin noch auf die Zelllinien PCI-1, PCI-13 und für Gefitinib auch bei der Linie PCI-68 zu. Gleichzeitig scheint es jedoch keinen relevanten Unterschied in der Wirksamkeit bei einer Dosissteigerung der Tyrosinkinaseinhibitoren von 1,6  $\mu$ M auf 5,5  $\mu$ M zu geben.

Die Zelllinie PCI-52 hingegen ist auch noch bei einer TKI-Konzentration von etwa 5,5  $\mu$ M als resistent gegenüber Gefitinib und Erlotinib anzusehen.

Diese Ergebnisse sind insofern bemerkenswert, als dass mittels Western Blot für alle drei Medikamente ein Wirksamkeitsnachweis durch Hemmung der

Autophosphorylierung erbracht werden konnte, doch trotzdem unterschiedliche Ansprechraten auf die beiden TKIs und Cetuximab gefunden wurden. Zudem handelt es sich, wie in vorherigen Versuchen bereits ermittelt (wie oben beschrieben) um EGF-unabhängige Zelllinien. Selbst PCI-9 und PCI-52, welche zumindest leicht auf EGF Stimulation ansprachen, reagierten nicht mit stärker vermindertem Zellwachstum auf Therapie durch EGFR-Blockade, als die vollständig EGF-resistenten Linien. Im Falle der Zelllinie PCI-52 konnte sogar die Resistenz gegenüber allen drei verwendeten Medikamenten beobachtet werden. Sie zeigte somit das schlechteste Ansprechen auf zielgerichtete EGFR-Therapie. Es konnte dementsprechend keine eindeutige Korrelation zwischen EGF-Sensitivität und die Wirksamkeit der Blockade des EGF-Rezeptor Signalwegs gefunden werden.

Dies steht im Widerspruch zu der gängigen Ansicht, dass der EGF-Rezeptor und sein Signalweg eine führende oder außergewöhnlich große Rolle für das Tumorwachstum und -überleben darstellt [136-139]. Möglicherweise sind für die verwendeten Zelllinien andere Signalwege wichtiger oder können den Ausfall des EGFR kompensieren. Hartmann et al. konnten sogar eine umgekehrte Korrelation zwischen EGFR-Expression und der Wirksamkeit der Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab bei vier Kopf-Hals-Karzinomen im Zellkulturversuch durch EGFR-Knockdown zeigen [107]. Weiterhin zeigt sich, dass EGFR in vivo zwar wichtig, doch in den allermeisten Fällen nicht essenziell für Tumorprogression und -überleben zu sein scheint [137]. Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass eine Stimulation mit EGF bei entsprechend sensitiven Kopf-Hals-Tumoren bestehende Resistenzen bei Chemotherapie durch Synchronisierung des Zellzyklus überwinden kann [139]. Im Zellkulturversuch wurde dies bereits für Docetaxel und Cisplatin gezeigt [140, 141]. Möglicherweise erklärt genau dieser Umstand das schlechte Abschneiden der Tyrosinkinaseinhibitoren bei klinischen Studien, da hier sogenannte Proliferationsgifte mit den antiproliferativen EGFR-Rezeptorblockern kombiniert wurden [95, 142]. Dies entspräche der wenig zielführenden Betätigung von Gaspedal und Bremse zugleich. Eine Multicenter-Studie von Soulieres et al. konnte bereits 2004 bei der Einzeltherapie von Erlotinib bei therapieresistenten

Kopf-Hals-Karzinomen krankheitsstabilisierende Effekte beschreiben [143]. Es gibt somit noch eine Reihe von Ansätzen zur EGFR- oder EGF-gerichteten Therapie, welche vom Versuch der absoluten Unterdrückung, bis hin zur Stimulation reichen. Dies verdeutlicht den weiteren Bedarf an Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet.

Besonderes Augenmerk muss auf das signifikant bessere Ansprechen fast aller Zelllinien auf Erlotinib und Gefitinib gelegt werden. Groß angelegte klinische Studien zeigen, dass die Effektivität einer Therapie mit einem der beiden Tyrosinkinaseinhibitoren entscheidend vom Mutationsstatus des EGF-Rezeptor abhängig zu sein scheint [96, 144, 145]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die von Weinberg als Onkogen-Sucht beschriebene Abhängigkeit von bestimmten Mutationen, welche in einer früheren Phase der Tumorentstehung einen Wachstums- bzw. Überlebensvorteil für die betroffenen Zellen ergaben. Diese „Sucht“ geht so weit, dass ohne das entsprechende Onkogen ein Überleben der Zelle kaum möglich ist und erklärt somit das überaus gute Ansprechen gezielter Therapie mit Erlotinib oder Gefitinib bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit positivem EGFR-Mutationsstatus [9].

Da ein solcher in den verwendeten Zelllinien nicht vorhanden war, sind die Ergebnisse der beschriebenen Versuche umso bemerkenswerter. Zwar konnte in klinischen Studien keine Verbesserung bestehender Therapien bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen gezeigt werden, doch gibt es vielversprechende Hinweise darauf, dass Tyrosinkinaseinhibitoren eine Rolle in der Chemoprävention präkanzeröser Läsionen zukommt [95, 101-103]. Besonders geeignet wären diese hierfür aufgrund der besseren Verteilung im Gewebe sowie der oralen Applizierbarkeit, im Gegensatz zu den intravenös zu verabreichenden monoklonalen Antikörpern [54, 137]. Nichtsdestotrotz sind die nicht unerheblichen Nebenwirkungen, welche insbesondere die Haut betreffen, der limitierende Faktor für diesen klinischen Anwendungsbereich und machen eine Langzeitgabe in der Prophylaxe nur schwer vorstellbar [146-149]. Nach derzeitiger Studienlage gibt es

außerdem widersprüchliche Hinweise, ob Gefitinib oder Erlotinib über das günstigere Risikoprofil verfügt [150-153].

Zwar haben sowohl monoklonale Antikörper, als auch Tyrosinkinaseinhibitoren als zielgerichtete Therapeutika durch Blockade des EGF-Rezeptor-Signalwegs direkt Einfluss auf diesen, doch unterscheiden sich beide im Angriffspunkt sowie in ihren chemischen Eigenschaften deutlich. Dies kann bei einem direkten Vergleich Unterschiede in der Effektivität erklären.

Diese bestehen nach Damjanov et al. neben dem genauen Ziel des Angriffs am Rezeptor, in der Spezifität sowie der Bindungsstärke [137]. Demnach wird den „small molecules“ Erlotinib und Gefitinib eine etwas schwächere, dafür schnellere, aber auch kurzfristige Bindung zugeschrieben. Dies könnte erklären, warum die beiden Tyrosinkinaseinhibitoren in den Versuchen der vorliegenden Arbeit eine bessere Wirkung erzielen konnten. Zum einen sind diese „kleinen Moleküle“ alleine durch ihre geringe Größe in der Lage, interstitiell tief in das Innere von Tumoren vorzudringen [9]. Somit stellen mechanische Barrieren nur ein geringes Problem dar. Eine Penetration in tiefere Tumorareale sollte aber vor allem *in vivo* von Relevanz sein [9]. Möglich und denkbar ist jedoch auch eine unbekannte Wirkung oder ein Effekt an anderen Tyrosinkinasen, was zu einer verstärkten Wirksamkeit durch Hemmung von weiteren „downstream“ - Signalwegen und somit des Zellwachstums im Kulturversuch führt [107]. Zum anderen könnte es auf die im Vergleich gigantischen Dimensionen des monoklonalen Antikörpers Cetuximab zurückzuführen sein, dass dieser auch bei der Zelllinie A 431, welche sich durch eine besonders hohe EGFR-Expression auszeichnet, schlechter abschnitt als Erlotinib oder Gefitinib [137]. So könnten zum Beispiel sterische Probleme bei der Bindung an vielen sich in enger Nachbarschaft befindlichen Rezeptoren dazu führen, dass nicht alle Antikörper, aufgrund enger Platzverhältnisse, ihr Ziel auch tatsächlich erreichen [104]. Somit kann unter Umständen eine Blockade vieler EGFR-Rezeptoren nicht gelingen und die verbliebenen Tyrosinkinaserzeptoren könnten die ausgefallenen in ausreichendem Maße ersetzen. Die Hemmung von EGF wäre somit nicht ausreichend. Dies wäre ein Ansatz zu erklären, warum Cetuximab in den

Versuchen dieser Arbeit auch bei der Zelllinie A 431 trotz, oder gerade wegen deren hoher EGFR-Expression keine signifikante Hemmung des Zellwachstums bewirken konnte [137].

### 3. Analyse der Kombinationstherapien

In beiden Versuchsreihen, in denen Erlotinib oder Gefitinib mit Cetuximab kombiniert wurden, konnte kein positiver Effekt der Gabe eines Tyrosinkinaseinhibitors in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Dies fügt sich in das Bild, das sich auch in den Western Blots zeigt und nahelegt, dass alle drei Medikamente letztlich den gleichen Effekt haben, wobei sie eine Unterdrückung der Autophosphorylierung am C-terminalen Ende des EGF-Rezeptors bewirken. Die Ergebnisse aus der Kombination 1 und 2 legen nahe, dass die hauptsächliche Wirksamkeit auf der des jeweiligen Tyrosinkinaseinhibitors beruht. Erwähnenswert ist, dass in den durchgeführten Kombinationsversuchen zwar eine Erhöhung der Konzentration der Tyrosinkinaseinhibitoren, nicht aber die Kombination mit Cetuximab zu einer stärkeren Hemmung des Zellwachstums führte. Konzentrationen von bis zu 400 µg/ml Cetuximab, erbrachten keine statistisch relevanten Veränderungen und hatten somit auch keinen negativen Effekt auf die Wirksamkeit von Erlotinib oder Gefitinib. Diese beiden TKIs und der monoklonale Antikörper Cetuximab hemmen zwar eine gemeinsame Endstrecke, der Angriffspunkt jedoch ist ein anderer, sodass erstere relativ unbeeinträchtigt von monoklonalen Antikörpern agieren können. Dies legt weiterhin nahe, dass die beschriebenen Effekte unabhängig von einer zusätzlichen oder vorherigen Blockade der extrazellulären Einheit des EGF-Rezeptors an sich sein dürften.

Den Kombinationsversuchen lag die bereits geäußerte Überlegung zugrunde, dass sogenannte „off-target“ Effekte für die bessere Wirksamkeit von Erlotinib und Gefitinib verantwortlich sein könnten. Bei EGF-Rezeptor Aktivierung kann es sich

um Homo- oder Heterodimerisierung handeln und wie eingangs beschrieben, sind auch andere Tyrosinkinase-Rezeptoren wie c-Met in der Lage, sogar mittels Tyrosinkinaseinhibitoren blockierte EGF-Rezeptoren zu aktivieren [54]. Wäre dies der Fall, so sollte sich zumindest ein Teil der TKIs in solchen Bindungen befinden und dadurch sein eigentliches Ziel der Signalblockade verfehlen. Somit könnte der Einsatz von Cetuximab eine Wirkungssteigerung erbringen, da dieses im Gegensatz zu Erlotinib und Gefitinib nicht nur die Phosphorylierung unterbindet, sondern gleichzeitig zu Rezeptorinternalisierung und dadurch auch zu einer Herunterregulation der EGFR-Expression führen soll [154].

Die Hypothese, dass sich die positiven Eigenschaften dieser TKIs und des verwendeten monoklonalen Antikörpers gegenseitig beeinflussen, konnte sich jedoch in den beschriebenen Versuchen nicht bestätigen.

#### 4. Western Blot-Analyse

Mittels Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die EGF-Rezeptoren aller Zellreihen auf eine Stimulation mit EGF durch Autophosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr 1173 ansprechen. Hier ist jeweils bei Zugabe von 50 ng/ml EGF eine deutliche Bande zu erkennen. Daraus ist zu schließen, dass, auch wenn die Zelllinien zum größten Teil EGF-unabhängig zu wachsen scheinen, sie trotz allem über funktionsfähige EGF-Rezeptoren verfügen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Mutationsanalyse des EGFR und seiner Pathways, welche in unserer Arbeitsgruppe erhoben wurden.

Die durch die Western Blots nicht nachweisbaren Phosphorylierungen in den Proben ohne Zugabe dieses Liganden entsprechen außerdem die Beobachtungen einer geringen endogenen Produktion von EGF aus den zuvor beschriebenen ELISA Messungen.

Des Weiteren konnten alle verwendeten Medikamente die Autophosphorylierung von Tyr 1173 unterdrücken, wodurch deutlich wird, dass der erwünschte Effekt, und zwar die Blockade des EGF-Rezeptors, bei den beschriebenen Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien auch in diesen relativ geringen Dosierungen funktioniert. Daher wäre, wenn man den primären Wirkmechanismus, die Blockade des EGFR-Signalweges, zugrunde legt, eine ähnliche Wirksamkeit der drei Medikamente zu erwarten.

In Untersuchungen am Glioblastoma multiforme konnten Hasselbalch et al. allerdings bereits feststellen, dass Cetuximab zwar die Autophosphorylierung von EGFR hemmt, jedoch im Zellkulturversuch nicht die entsprechende Wirksamkeit zeigt [155].

## 5. Schlussfolgerungen

Die propagierten Wirkmechanismen in Form einer Blockade des EGF-Rezeptors mit konsekutiver Verhinderung der Phosphorylierung von Tyrosinkinasen konnten in der Westernblotanalyse bei allen drei Medikamenten nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte so gezeigt werden, dass das primäre Target, also der EGF-Rezeptor in allen verwendeten Kopf-Hals Zellkulturen vorhanden ist. Somit ist die mangelnde Wirksamkeit von Cetuximab nicht auf die Abwesenheit des entsprechenden Rezeptors zurückzuführen.

Nichtsdestotrotz lassen in vitro Studien, wie die vorliegende, keine direkten Rückschlüsse auf die klinische Anwendbarkeit oder Umsetzung zu, können jedoch helfen bestehende klinische Resultate zu erklären oder neue Anwendungsbereiche in der Praxis zu entwickeln. Bestimmte Effekte, wie die zuvor beschriebene antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) oder in vivo vorhandene Wechselwirkungen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Dennoch lässt die mangelnde Wirksamkeit von Cetuximab in den vorliegenden Versuchen annehmen, dass die bereits an anderer Stelle erläuterten immunologischen Effekte einen nicht unerheblicher Einflussfaktor für die Wirksamkeit dieses monoklonalen Antikörpers in der Klinik darstellen und somit dessen erfolgreichen Einsatz in vivo erklären können.

Erlotinib und Gefitinib schnitten, im Rahmen der hier durchgeführten Zellkulturversuche mit klinisch relevanten Serumkonzentrationen der drei Medikamente bei 4 von 5 Zelllinien, besser ab, als der bereits in der Praxis etablierte monoklonale Antikörper Cetuximab. Weitere Evaluation zu Wirkmechanismus und Vorhersagbarkeit ist nötig, um diese Effekte erklären zu können.

## 5.1 Ausblick

Die sowohl in der Einzeltherapie, als auch in den Kombinationen zu beobachtenden besseren Ansprechraten von Erlotinib und Gefitinib weisen darauf hin, dass der klinischen Wirksamkeit von Cetuximab andere Mechanismen, wie die zuvor diskutierte ADCC, zugrunde liegen [156]. Klinisch ist dies relevant, da auch pharmakologische Einflussgrößen, wie immunsupprimierende Medikamente die Aktivität der Natural-Killer Zellen verringern und somit womöglich auch den Nutzen von Cetuximab in der Tumorthherapie kompromittieren [157]. Auch gesteigerter Alkoholkonsum, welcher, wie eingangs beschrieben, bei einem großen Teil des Patientenkontingents mit Kopf-Hals-Karzinomen zu beobachten ist, wirkt sich kompromittierend auf das Immunsystem aus [158].

Das Ausbleiben einer solchen Reaktion könnte zum Teil auch erklären, weshalb die Ansprechraten von Erlotinib und Gefitinib klinisch bisher nicht den erhofften Erfolg bringen konnten [95, 159, 160]. Obwohl beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom die Effektivität einer Therapie entscheidend vom Mutationsstatus abhängt, konnten Bontognali et al. keine Abhängigkeit vom Mutationsstatus bei Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen mit Gefitinib nachweisen [161]. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der Einfluss verwandter Rezeptoren, wie ErbB2 und ErbB3, von Relevanz ist, wenn es um die Blockade mittels Tyrosinkinaseinhibitoren wie Gefitinib geht [55, 56, 162, 163].

Eine neue Generation von TKIs setzt an eben diesem Punkt an. Vertreter dieser neuen Gruppe von „Multikinaseinhibitoren“ sind Afatinib, Dacomitinib und Lapatinib, wobei die beiden erstgenannten sogar irreversibel an die ATP-Bindungstasche der Zielrezeptoren binden [54, 164-166]. Besonders für Afatinib und Dacomitinib zeigten in ersten klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse [166-168].

Neueste Belege gibt es auch dafür, dass es scheinbar geringfügige Unterschiede zwischen den beiden älteren Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib und Gefitinib gibt.

Diese äußern sich in einem unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster am C-terminalen Ende der untersuchten EGF-Rezeptoren, was wiederum unterschiedlich starke Effekte auf folgenden Signalwege zu haben scheint [169]. Dies ließe sogar die Erwägung eine Kombination beider Medikamente zu, was nach bisheriger Vorstellung des Wirkmechanismus keinen Sinn ergeben hätte.

Des Weiteren konnten für das Kopf-Hals-Karzinom bisher keine molekularbiologischen Marker gefunden werden, welche für die Therapieentscheidung einer EGFR-spezifischen zielgerichteten Tumorthherapie herangezogen werden könnten. Derzeit kann beim Kopf-Hals-Karzinom lediglich das Auftreten von Ausschlag als klinischer Parameter für das Ansprechen auf Therapie mit Gefitinib oder Cetuximab angesehen werden [54, 90, 170]. Für erhöhte EGFR-Expression in behandelten Tumoren konnte im Gegensatz dazu in klinischen Studien für Gefitinib kein verbessertes Gesamtüberleben und für Cetuximab keine Korrelation gezeigt werden [88, 117, 161].

Nach wie vor bleiben trotz interessanter und vielversprechender Ergebnisse von in vitro Studien alle medikamentösen Ansätze Palliativsituationen vorbehalten und können die operative Therapie nicht ersetzen [5]. Im Idealfall jedoch kann ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus bestehende Therapiemöglichkeiten sinnvoll ergänzen. Eine Heilung durch medikamentöse Therapie alleine ist derzeit nicht abzusehen.

Diese Punkte zeigen, wie unspezifisch die zielgerichtete EGFR-Therapie trotz aller Bemühungen nach wie vor ist und verdeutlichen den bestehenden Forschungsbedarf in den Bereichen der Tumorbilogie, Pharmakologie, Immunologie und des EGF-Rezeptor-spezifischen Wirkmechanismus, welcher zwar immer besser, dennoch auch 50 Jahre nach dessen Entdeckung nicht ausreichend entschlüsselt ist.

## VI. Zusammenfassung

Das derzeit einzige für die Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms zugelassene spezifische Therapeutikum ist der monoklonale Antikörper Cetuximab, welcher eine gezielte Blockade des epidermal growth factor receptors (EGFR) bewirkt. Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) wie Erlotinib oder Gefitinib, welche ebenfalls am EGFR angreifen, konnten in klinischen Studien bisher nicht den hohen Erwartungen standhalten, wenngleich diese bei anderen Tumoren erfolgreich eingesetzt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirksamkeit der Medikamente in Mono- und Kombinationstherapie im Rahmen von *in-vitro*-Experimenten zu untersuchen. Weiterhin soll die Phosphorylierung des EGFR vor und nach der Inkubation mit den o.g. Medikamenten mittels Western Blot erfasst werden, um hieraus ggf. Rückschlüsse auf Gründe für ein Ausbleiben der Wirkung zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche an sechs Karzinomzelllinien (A431, PCI-1, PCI-13, PCI-9, PCI-68, PCI-52) durchgeführt. Hierbei wurden Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab sowohl in Einzel-, als auch in Kombinationstherapie angewandt. Die Auswertung erfolgte mittels Kristallviolett-Assay. Zudem wurde mittels Western Blot-Verfahren die Aktivierung des EGFR, mit und ohne Medikamentenzusatz nach vorheriger Stimulierung mit EGF, anhand der Phosphorylierung am Tyrosinrest 1173 untersucht werden.

Die Einzeltherapie mit Cetuximab führte nur bei den Zelllinien PCI-1 und PCI-13 zu statistisch signifikanter Hemmung des Zellwachstums, welches jedoch nicht dosisabhängig war. Erlotinib und Gefitinib zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Wirksamkeit und führten zu einer Reduzierung des Zellwachstums. In den beiden Kombinationsversuchen konnte keine Wirkungsverstärkung bei gemeinsamer Gabe von TKIs und Cetuximab festgestellt werden. Ein Vergleich klinisch relevanter Dosen von 100 mg/ml Cetuximab mit 0,5  $\mu$ M, 1,6  $\mu$ M und 5,5  $\mu$ M Erlotinib oder Gefitinib ergab in der niedrigsten Konzentration bei drei und in den beiden höheren Konzentration sogar bei vier Zelllinien signifikant bessere

Ergebnisse für die TKIs. Die in der Western Blot-Analyse durchgeführten Phosphorylierungsnachweise zeigen die wirksame Blockade des Rezeptors durch Inhibierung der Autophosphorylierung an Tyr1173 durch alle drei Medikamente.

Die bessere Wirksamkeit der TKIs im Vergleich zu Cetuximab im Zellkulturversuch ist gegensätzlich zu Beobachtungen in klinischen Studien. Dies lässt unter anderem den Rückschluss zu, dass die *in vivo*-Wirkmechanismen von Cetuximab in der zweidimensionalen Zellkultur nur insuffizient abgebildet werden. Weiterhin scheint die Blockade des EGFR durch einen monoklonalen Antikörper in Kombination mit einem Tyrosinkinaseinhibitor – zumindest auf Grundlage des hier verwendeten *in vitro*-Modells – keinen zusätzlichen Effekt zu zeigen.

## VII. Abkürzungsverzeichnis

### μ

μ *Mikro*

### A

**ADCC** *antibody dependent cellular cytotoxicity (dt.: antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität)*

**AK** *Antikörper*

**AKT** *Bezeichnung für eine Serin/Threonin-Kinase*

**APS** *Ammoniumpersulfat*

**ASR** *age-standardised rate (dt.: Altersstandardisierte Rate)*

**ATP** *Adenosintriphosphat*

### B

**BRAF** *B-Rat-Fibrosarcoma-Protein*

### C

**Cetu** *Cetuximab*

**c-Met** *Synonym für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor*

**CO<sub>2</sub>** *Kohlenstoffdioxid*

**CRC** *colorectal carcinoma (dt.: Kolorektales Karzinom)*

### D

**dest.** *destilliert*

**DGMKG** *Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*

**dl** *Deziliter*

**DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle Medium (dt.: Dulbecco's modifiziertes Medium nach Eagle)*

**DPBS** *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (dt.: Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)*

### E

**EBV** *Epstein-Barr-Virus*

**ECL** *enhanced chemiluminescence (dt.: Verbesserte Chemolumineszenz)*

**EDTA** *Ethylendiamintetraessigsäure*

**EGFR** *epidermal growth factor receptor*

**ELISA** *enzyme linked immunosorbent assay (dt.: Enzymimmunoassay)*

**ErbB** *erythroblastic leukemia viral oncogene (dt.: Erythroblastisches, virales Leukämie-Antigen)*

**Erlo** *Erlotinib*

### F

**FACS** *fluorescence-activated cell sorting (dt.: Durchflusszytometrie)*

**FCS** *Fetal calf serum (dt.: Fetales Kälberserum)*

### G

**Gefi** *Gefitinib*

**GEKID** *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland*

**Gy** *Gray*

## H

**HB-EGF** *heparin-binding EGF-like growth factor (dt.: Heparinbindender, EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor)*  
**HER** *human epidermal growth factor receptor (dt.: Humaner, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)*  
**HLA** *human leukocyte antigen (dt.: Histokompatibilitätsantigen)*  
**HNO** *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*  
**HNSCC** *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (dt.: Kopf-Hals-Karzinom)*  
**HPV** *Humane Papilloma Viren*  
**HRP** *horseradish peroxidase (dt.: Meerrettichperoxidase)*

## I

**IC-50** *Half maximal inhibitory concentration (dt.: Mittlere inhibitorische Konzentration)*  
**ICD-10** *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (dt.: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme) - Die Zahl 10 beschreibt die aktuell gültige Ausgabe*  
**IGF** *insulin-like growth factor (dt.: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)*  
**IgG** *Immunglobulin G*

## J

**JAK** *Janus Kinase*

## K

**KRAS** *Kirsten-Rat-Sarkoma-Protein*

## L

**log** *Logarithmus*

## M

**M** *molare Masse*  
**MAPK** *mitogen-activated protein-kinase (dt.: Mitogenaktivierte Proteinkinase)*  
**MEK** *Synonym für MAPKK (Kinase der mitogenaktivierten Kinase)*  
**MKG** *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*  
**MW** *Mittelwert*

## N

**N** *Anzahl der Versuche*  
**ng** *Nanogramm*  
**NRGs** *Neureguline*  
**NSCLC** *Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom*

## O

**OD** *Optische Dichte*

## P

**p** *probability (dt.: Wahrscheinlichkeit)*  
**pEGFR** *Phosphorylierter epidermaler Wachstumsfaktor*  
**PI3K** *Phosphinositid-3-Kinase*  
**PVDF** *Polyvinylidenfluorid*

## R

**Ras/Raf** siehe KRAS bzw. BRAF

## S

**SD** *standard deviation (dt.: Standardabweichung)*

**SDS Page** *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (dt.: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)*

**STAT** *signal transducer and activator of transcription (dt.: Signalübermittler und Aktivator der Transskription)*

## T

**TBS** *Tris-buffered saline (dt.: Tris-gepufferte Salzlösung)*

**TEMED** *N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin*

**TGF-alpha** *transforming growth factor alpha*

**TKIs** *Tyrosinkinaseinhibitoren*

**TNM** *Tumor, Nodus, Metastasen*

**Tris** *Tris(hydroxymethyl)-aminomethan*

**Tyr** *Tyrosinrest*

## U

**UICC** *Union Internationale Contre le Cancer (dt.: Internationale Vereinigung gegen Krebs)*

## W

**WHO** *World Health Organisation (dt.: Weltgesundheitsorganisation)*

## VIII. Literaturverzeichnis

1. Pai, S.I. and W.H. Westra, *Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 49-70.
2. Robert-Koch-Institut, *Krebs in Deutschland*. 2010.
3. Licitra, L. and E. Felip, *Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2009. **20 Suppl 4**: p. 121-2.
4. Goyal, G., S.A. Mehdi, and A.K. Ganti, *Salivary Gland Cancers: Biology and Systemic Therapy*. Oncology (Williston Park), 2015. **29**(10): p. 773-80.
5. AWMF, D., *Mundhöhlenkarzinom, Diagnostik und Therapie*. 2012.
6. WHO, D., *ICD-10-WHO - Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme*. 2013.
7. IARC, *Globocan Database / Online Analysis*. 2012.
8. GEKID, G.d.e.K.i.D.e.V.-. *Atlas der Krebsinzidenz und –mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas). Datenlieferung: Dezember 2013, Lübeck, 2014. Verfügbar über: <http://www.gekid.de>*. 2014.
9. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer*, in *Second Edition*. 2014.
10. Dietz, A., W.D. Heller, and H. Maier, *[Epidemiologic aspects of cancers of the head-neck area]*. Offentl Gesundheitswes, 1991. **53**(10): p. 674-80.
11. Altieri, A., et al., *Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer*. Br J Cancer, 2002. **87**(11): p. 1227-9.
12. Balaram, P., et al., *Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene*. Int J Cancer, 2002. **98**(3): p. 440-5.
13. Franceschi, S., et al., *Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer*. Int J Cancer, 1999. **83**(1): p. 1-4.
14. Bagnardi, V., et al., *Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis*. Alcohol Res Health, 2001. **25**(4): p. 263-70.
15. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(19): p. 1944-56.
16. Smith, E.M., et al., *Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers*. Int J Cancer, 2004. **108**(5): p. 766-72.
17. Egloff, A.M., et al., *Phase II study of cetuximab in combination with cisplatin and radiation in unresectable, locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: Eastern cooperative oncology group trial E3303*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(19): p. 5041-51.
18. Neville, *Oral and Maxillofacial Pathology, 3 edition*. 2008, Saunders.
19. Jia, W.H. and H.D. Qin, *Non-viral environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a systematic review*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(2): p. 117-26.

20. Tsao, S.W., et al., *The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies*. J Pathol, 2015. **235**(2): p. 323-33.
21. Su, W.H., A. Hildesheim, and Y.S. Chang, *Human leukocyte antigens and Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: old associations offer new clues into the role of immunity in infection-associated cancers*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 299.
22. Ho, T., Q. Wei, and E.M. Sturgis, *Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck, 2007. **29**(7): p. 682-99.
23. Rusin, P., L. Markiewicz, and I. Majsterek, [*Genetic predeterminations of head and neck cancer*]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2008. **62**: p. 490-501.
24. Lacko, M., et al., *Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014. **89**(1): p. 38-48.
25. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*. 2009: John Wiley & Sons.
26. Wittekind, C., H. Asamura, and L.H. Sobin, *TNM Atlas*. 2014: Wiley.
27. Seeber, S. and H.J. Schütte, *Therapiekonzepte Onkologie*. 2007: Springer.
28. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer*. 2014: Garland Science.
29. Lefebvre, J.L., et al., *Management of early oral cavity cancer. Experience of Centre Oscar Lambret*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1994. **30B**(3): p. 216-20.
30. Panje, W.R., B. Smith, and B.F. McCabe, *Epidermoid carcinoma of the floor of the mouth: surgical therapy vs combined therapy vs radiation therapy*. Otolaryngol Head Neck Surg (1979), 1980. **88**(6): p. 714-20.
31. Rodgers, L.W., Jr., et al., *Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth*. Head Neck, 1993. **15**(1): p. 16-9.
32. Levendag, P.C., et al., *Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck*. Am J Clin Oncol, 1996. **19**(5): p. 469-77.
33. Bailey, J.S., R.H. Blanchaert, Jr., and R.A. Ord, *Management of oral squamous cell carcinoma treated with inadequate excisional biopsy*. J Oral Maxillofac Surg, 2001. **59**(9): p. 1007-10; discussion 1011.
34. Weiss, M.H., L.B. Harrison, and R.S. Isaacs, *Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1994. **120**(7): p. 699-702.
35. Dietz, A., et al., *Induction chemotherapy with paclitaxel and cisplatin followed by radiotherapy for larynx organ preservation in advanced laryngeal and hypopharyngeal cancer offers moderate late toxicity outcome (DeLOS-I-trial)*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2009. **266**(8): p. 1291-300.
36. Pignon, J.P., et al., *Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*. Lancet, 2000. **355**(9208): p. 949-55.
37. Bourhis, J., C. Amand, and J.P. Pignon, *Update of MACH-NC (Meta-Analysis of Chemotherapy in Head and Neck Cancer) database focused on concomitant chemoradiotherapy*. J Clin Oncol, 2004. **5505**. J Clin Oncol 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) 2004; **22**: 14 (July 15 Suppl).

38. Lin, S.S., S.T. Massa, and M.A. Varvares, *Improved overall survival and mortality in head and neck cancer with adjuvant concurrent chemoradiotherapy in national databases*. *Head Neck*, 2016. **38**(2): p. 208-15.
39. Wolff, K.D., M. Follmann, and A. Nast, *The diagnosis and treatment of oral cavity cancer*. *Dtsch Arztebl Int*, 2012. **109**(48): p. 829-35.
40. Bourhis, J., et al., *Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis*. *Lancet*, 2006. **368**(9538): p. 843-54.
41. Budach, W., et al., *A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. *BMC Cancer*, 2006. **6**: p. 28.
42. Candelaria, M., et al., *Radiosensitizers in cervical cancer. Cisplatin and beyond*. *Radiat Oncol*, 2006. **1**: p. 15.
43. Begg, A.C., *Cisplatin and radiation: interaction probabilities and therapeutic possibilities*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1990. **19**(5): p. 1183-9.
44. Gibson, M.K., et al., *Randomized phase III evaluation of cisplatin plus fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in advanced head and neck cancer (E1395): an intergroup trial of the Eastern Cooperative Oncology Group*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(15): p. 3562-7.
45. Pignon, J.P., et al., *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients*. *Radiother Oncol*, 2009. **92**(1): p. 4-14.
46. O'Brien, S.G., et al., *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(11): p. 994-1004.
47. Peggs, K. and S. Mackinnon, *Imatinib mesylate--the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(11): p. 1048-50.
48. Zhang, H., et al., *ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(8): p. 2051-8.
49. Herbst, R.S., *Review of epidermal growth factor receptor biology*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004. **59**(2 Suppl): p. 21-6.
50. Cho, H.S., et al., *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab*. *Nature*, 2003. **421**(6924): p. 756-60.
51. Garrett, T.P., et al., *The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors*. *Mol Cell*, 2003. **11**(2): p. 495-505.
52. Arteaga, C.L. and J.A. Engelman, *ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics*. *Cancer Cell*, 2014. **25**(3): p. 282-303.
53. Shi, F., et al., *ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(17): p. 7692-7.
54. Markovic, A. and C.H. Chung, *Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck*

- squamous cell carcinoma*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012. **12**(9): p. 1149-59.
55. Britten, C.D., *Targeting ErbB receptor signaling: a pan-ErbB approach to cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(10): p. 1335-42.
  56. Zhang, X., et al., *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor*. *Cell*, 2006. **125**(6): p. 1137-49.
  57. Harris, R.C., E. Chung, and R.J. Coffey, *EGF receptor ligands*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 2-13.
  58. Arteaga, C.L. and J. Baselga, *Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them?* *Cancer Cell*, 2004. **5**(6): p. 525-31.
  59. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
  60. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. *Science*, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
  61. Otsuka, K., et al., *[Survival analysis and immunohistochemical study of HER-2 and AR (androgen receptor) expression in salivary duct carcinoma]*. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*, 2013. **116**(9): p. 1024-32.
  62. Ettl, T., et al., *EGFR, HER2, survivin, and loss of pSTAT3 characterize high-grade malignancy in salivary gland cancer with impact on prognosis*. *Hum Pathol*, 2012. **43**(6): p. 921-31.
  63. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. *EMBO J*, 1997. **16**(7): p. 1647-55.
  64. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(11): p. 1160-74.
  65. Jo, M., et al., *Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(12): p. 8806-11.
  66. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. *Mol Syst Biol*, 2005. **1**: p. 2005.0010.
  67. Saranath, D., et al., *Amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor gene in human oropharyngeal cancer*. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1992. **28B**(2): p. 139-43.
  68. Grandis, J.R. and D.J. Tweardy, *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer*. *Cancer Res*, 1993. **53**(15): p. 3579-84.
  69. Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, *EGFR and cancer prognosis*. *Eur J Cancer*, 2001. **37 Suppl 4**: p. S9-15.
  70. Chung, C.H., et al., *Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(25): p. 4170-6.

71. Maurizi, M., et al., *EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: correlation with clinico-pathological features and prognostic significance*. Int J Cancer, 1992. **52**(6): p. 862-6.
72. Niemiec, J., et al., *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in surgically treated squamous cell lung cancer patients*. Folia Histochem Cytobiol, 2004. **42**(2): p. 111-8.
73. Shigematsu, H. and A.F. Gazdar, *Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 257-62.
74. Loeffler-Ragg, J., et al., *Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Eur J Cancer, 2006. **42**(1): p. 109-11.
75. Wheeler, D.L., E.F. Dunn, and P.M. Harari, *Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(9): p. 493-507.
76. Lee, J.W., et al., *Absence of EGFR mutation in the kinase domain in common human cancers besides non-small cell lung cancer*. Int J Cancer, 2005. **113**(3): p. 510-1.
77. Paez, J.G., et al., *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. Science, 2004. **304**(5676): p. 1497-500.
78. Khambata-Ford, S., 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): p. 3230-7.
79. Shan, L., et al., *PCR-based assays versus direct sequencing for evaluating the effect of KRAS status on anti-EGFR treatment response in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107926.
80. Adelstein, B.A., et al., *A systematic review and meta-analysis of KRAS status as the determinant of response to anti-EGFR antibodies and the impact of partner chemotherapy in metastatic colorectal cancer*. Eur J Cancer, 2011. **47**(9): p. 1343-54.
81. Scaltriti, M. and J. Baselga, *The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5268-72.
82. Sato, J.D., et al., *Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors*. Mol Biol Med, 1983. **1**(5): p. 511-29.
83. Goldstein, N.I., et al., *Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(11): p. 1311-8.
84. Sobrero, A.F., et al., *EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(14): p. 2311-9.
85. Jonker, D.J., et al., *Cetuximab for the treatment of colorectal cancer*. N Engl J Med, 2007. **357**(20): p. 2040-8.
86. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(14): p. 1408-17.

87. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 567-78.
88. Vermorken, J.B., et al., *Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1116-27.
89. Rivera, F., et al., *Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial*. Expert Rev Anticancer Ther, 2009. **9**(10): p. 1421-8.
90. Burtneess, B., et al., *Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8646-54.
91. Kimura, H., et al., *Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor*. Cancer Sci, 2007. **98**(8): p. 1275-80.
92. Levy, E.M., et al., *Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells*. Innate Immun, 2009. **15**(2): p. 91-100.
93. Raymond, E., S. Faivre, and J.P. Armand, *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy*. Drugs, 2000. **60 Suppl 1**: p. 15-23; discussion 41-2.
94. Cappuzzo, F., et al., *Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study*. Lancet Oncol, 2010. **11**(6): p. 521-9.
95. Martins, R.G., et al., *Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(11): p. 1415-21.
96. Kobayashi, K. and K. Hagiwara, *Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC)*. Target Oncol, 2013. **8**(1): p. 27-33.
97. Li, Z., et al., *Erlotinib effectively inhibits JAK2V617F activity and polycythemia vera cell growth*. J Biol Chem, 2007. **282**(6): p. 3428-32.
98. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13306-11.
99. Stewart, J.S., et al., *Phase III study of gefitinib compared with intravenous methotrexate for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck [corrected]*. J Clin Oncol, 2009. **27**(11): p. 1864-71.
100. Argiris, A., et al., *Phase III randomized, placebo-controlled trial of docetaxel with or without gefitinib in recurrent or metastatic head and neck cancer: an eastern cooperative oncology group trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(11): p. 1405-14.
101. Gross, N.D., et al., *Erlotinib, erlotinib-sulindac versus placebo: a randomized, double-blind, placebo-controlled window trial in operable head and neck cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(12): p. 3289-98.

102. Rosenthal, E.L., et al., *Assessment of erlotinib as adjuvant chemoprevention in high-risk head and neck cancer patients*. *Ann Surg Oncol*, 2014. **21**(13): p. 4263-9.
103. Saba, N.F., et al., *Chemoprevention of head and neck cancer with celecoxib and erlotinib: results of a phase Ib and pharmacokinetic study*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014. **7**(3): p. 283-91.
104. Hartmann, S., et al., *Efficacy of cetuximab and panitumumab in oral squamous cell carcinoma cell lines: prognostic value of MAGE-A subgroups for treatment success*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2013. **41**(7): p. 623-9.
105. Heo, D.S., et al., *Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines*. *Cancer Res*, 1989. **49**(18): p. 5167-75.
106. Muller-Richter, U.D., et al., *Impact of MAGE-A antigens on taxane response in oral squamous cell carcinoma*. *Oncol Lett*, 2010. **1**(1): p. 181-185.
107. Hartmann, S., et al., *Influence of epidermal growth factor receptor expression on the cetuximab and panitumumab response rates of head and neck carcinoma cells*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2014. **42**(7): p. 1322-8.
108. Hartmann, S., et al., *Correlation of MAGE-A tumor antigens and the efficacy of various chemotherapeutic agents in head and neck carcinoma cells*. *Clin Oral Investig*, 2014. **18**(1): p. 189-97.
109. Cichocki, M., et al., *The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on EGFR and Stat3 activation in human HaCaT and A431 cells*. *Mol Cell Biochem*, 2014. **396**(1-2): p. 221-8.
110. Rehm, H. and T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 2009: Spektrum Akademischer Verlag.
111. Hartmann, S., et al., *Erlotinib and gefitinib responsiveness in head and neck cancer cell lines—a comparing analysis with cetuximab*. *Clin Oral Investig*, 2015.
112. Rigas, J.R. and K.H. Dragnev, *Targeted therapy with erlotinib prolongs survival in NSCLC*. *Community Oncology*, 2005. **2**(3): p. 207-209.
113. Mukohara, T., et al., *Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(16): p. 1185-94.
114. Becker, S.T., et al., *Quality of life in oral cancer patients—effects of mandible resection and socio-cultural aspects*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2012. **40**(1): p. 24-7.
115. Huang, S.M., J.M. Bock, and P.M. Harari, *Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Cancer Res*, 1999. **59**(8): p. 1935-40.
116. Baselga, J., 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): p. 904-14.
117. Licitra, L., et al., *Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head*

- and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(6): p. 1161-8.
118. Vermorken, J.B. and P. Specenier, *Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer*. *Ann Oncol*, 2010. **21 Suppl 7**: p. vii252-61.
  119. Cohen, R.B., *Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*. *Cancer Treat Rev*, 2014. **40**(4): p. 567-77.
  120. Smilek, P., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas*. *Neoplasma*, 2012. **59**(5): p. 508-15.
  121. Weber, A., et al., *Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Oncogene*, 2003. **22**(30): p. 4757-9.
  122. Srivastava, R.M., et al., *Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(7): p. 1858-72.
  123. Krawczyk, P.A. and D.M. Kowalski, *Genetic and immune factors underlying the efficacy of cetuximab and panitumumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer*. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2014. **18**(1): p. 7-16.
  124. Schneider-Merck, T., et al., *Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage*. *J Immunol*, 2010. **184**(1): p. 512-20.
  125. Giralt, J., et al., *Panitumumab plus radiotherapy versus chemoradiotherapy in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-2): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(2): p. 221-32.
  126. Vermorken, J.B., et al., *Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial*. *Lancet Oncol*, 2013. **14**(8): p. 697-710.
  127. Mesia, R., et al., *Chemoradiotherapy with or without panitumumab in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-1): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(2): p. 208-20.
  128. Montagut, C., et al., *Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer*. *Nature medicine*, 2012. **18**(2): p. 221-223.
  129. Boehrer, S., et al., *Erlotinib exhibits antineoplastic off-target effects in AML and MDS: a preclinical study*. *Blood*, 2008. **111**(4): p. 2170-80.
  130. Takada, Y. and K. Matsuo, *Gefitinib, but not erlotinib, is a possible inducer of Fra-1-mediated interstitial lung disease*. *Keio J Med*, 2012. **61**(4): p. 120-7.

131. Yamamoto, N., M. Honma, and H. Suzuki, *Off-target serine/threonine kinase 10 inhibition by erlotinib enhances lymphocytic activity leading to severe skin disorders*. *Mol Pharmacol*, 2011. **80**(3): p. 466-75.
132. Boehrer, S., et al., *Erlotinib antagonizes constitutive activation of SRC family kinases and mTOR in acute myeloid leukemia*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(18): p. 3168-75.
133. Boehrer, S., et al., *Erlotinib and gefitinib for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: a preclinical comparison*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(11): p. 1417-25.
134. Sen, M., et al., *JAK kinase inhibition abrogates STAT3 activation and head and neck squamous cell carcinoma tumor growth*. *Neoplasia*, 2015. **17**(3): p. 256-64.
135. Kupferman, M.E., et al., *Therapeutic suppression of constitutive and inducible JAK\STAT activation in head and neck squamous cell carcinoma*. *J Exp Ther Oncol*, 2009. **8**(2): p. 117-27.
136. Hemming, A.W., et al., *Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67*. *J Surg Oncol*, 1992. **51**(3): p. 147-52.
137. Damjanov, N. and N.J. Meropol, *Epidermal growth factor receptor inhibitors for the treatment of colorectal cancer: a promise fulfilled?* *Oncology (Williston Park)*, 2004. **18**(4): p. 479-88; discussion 488, 493, 497 passim.
138. Klijn, J.G., et al., *The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients*. *Endocr Rev*, 1992. **13**(1): p. 3-17.
139. Hambek, M., et al., *Prestimulation of head and neck cancer cells with growth factors enhances treatment efficacy*. *Anticancer Res*, 2006. **26**(2A): p. 1091-5.
140. Mandic, R., et al., *Cisplatin resistance of the HNSCC cell line UT-SCC-26A can be overcome by stimulation of the EGF-receptor*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(4): p. 1181-7.
141. Hambek, M., et al., *Enhancement of docetaxel efficacy in head and neck cancer treatment by G0 cell stimulation*. *Eur J Cancer*, 2007. **43**(10): p. 1502-7.
142. Siu, L.L., et al., *Phase I/II trial of erlotinib and cisplatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: a Princess Margaret Hospital phase II consortium and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(16): p. 2178-83.
143. Soulieres, D., et al., *Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(1): p. 77-85.
144. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
145. Tsao, M.S., et al., *Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(2): p. 133-44.

146. Clause, A.L., K. Vanderheyde, and T. Pieters, [*Safety of reintroduction of erlotinib at low doses following hand-foot syndrome induced by erlotinib treatment for a Pancoast-Tobias tumour*]. *Rev Mal Respir*, 2014. **31**(7): p. 628-31.
147. Horiike, A., et al., *Phase II study of erlotinib for acquired resistance to gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer*. *Anticancer Res*, 2014. **34**(4): p. 1975-81.
148. Lacouture, M.E. and B.L. Melosky, *Cutaneous reactions to anticancer agents targeting the epidermal growth factor receptor: a dermatology-oncology perspective*. *Skin Therapy Lett*, 2007. **12**(6): p. 1-5.
149. Polychronidou, G. and P. Papakotoulas, *Long-Term Treatment with Erlotinib for EGFR Wild-Type Non-Small Cell Lung Cancer: A Case Report*. *Case Rep Oncol*, 2013. **6**(1): p. 189-96.
150. Yoshida, T., et al., *Comparison of adverse events and efficacy between gefitinib and erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis*. *Med Oncol*, 2013. **30**(1): p. 349.
151. Maruyama, K., et al., *Minimal change nephrotic syndrome associated with gefitinib and a successful switch to erlotinib*. *Intern Med*, 2015. **54**(7): p. 823-6.
152. Yonesaka, K., et al., *Erlotinib is a well-tolerated alternate treatment for non-small cell lung cancer in cases of gefitinib-induced hepatotoxicity*. *Anticancer Res*, 2014. **34**(9): p. 5211-5.
153. Araya, T., et al., *Successful treatment with erlotinib of severe neutropenia induced by gefitinib in a patient with advanced non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2013. **80**(3): p. 344-6.
154. Harding, J. and B. Burtness, *Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody*. *Drugs Today (Barc)*, 2005. **41**(2): p. 107-27.
155. Hasselbalch, B., et al., *Cetuximab insufficiently inhibits glioma cell growth due to persistent EGFR downstream signaling*. *Cancer Invest*, 2010. **28**(8): p. 775-87.
156. Taylor, R.J., et al., *Ex vivo antibody-dependent cellular cytotoxicity inducibility predicts efficacy of cetuximab*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(5): p. 567-74.
157. Kumai, T., et al., *Assessment of the change in cetuximab-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of natural killer cells by steroid*. *Head Neck*, 2014.
158. Cook, R.T., *Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system--a review*. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998. **22**(9): p. 1927-42.
159. Massarelli, E., et al., *Phase II trial of everolimus and erlotinib in patients with platinum-resistant recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma*. *Ann Oncol*, 2015.
160. Rodriguez, C.P., et al., *Single-arm phase II study of multiagent concurrent chemoradiotherapy and gefitinib in locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Head Neck*, 2012. **34**(11): p. 1517-23.

161. Bontognali, S., et al., *Analysis of the EGFR mutation status in head and neck squamous cell carcinoma before treatment with Gefitinib*. *Onkologie*, 2013. **36**(4): p. 161-6.
162. Erjala, K., et al., *Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(13): p. 4103-11.
163. Zhang, L., et al., *ERBB3/HER2 signaling promotes resistance to EGFR blockade in head and neck and colorectal cancer models*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(5): p. 1345-55.
164. Kondo, N., et al., *Antitumor effects of lapatinib (GW572016), a dual inhibitor of EGFR and HER-2, in combination with cisplatin or paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2010. **23**(4): p. 957-63.
165. Li, D., et al., *BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models*. *Oncogene*, 2008. **27**(34): p. 4702-11.
166. Kim, H.S., et al., *Phase II clinical and exploratory biomarker study of dacomitinib in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(3): p. 544-52.
167. Seiwert, T.Y., et al., *A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(9): p. 1813-20.
168. Machiels, J.P., et al., *Rationale and design of LUX-Head & Neck 1: a randomised, Phase III trial of afatinib versus methotrexate in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma who progressed after platinum-based therapy*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 473.
169. Kim, Y., et al., *Differential Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors on Normal and Oncogenic EGFR Signaling and Downstream Effectors*. *Mol Cancer Res*, 2015. **13**(4): p. 765-74.
170. Cohen, E.E., et al., *Phase II trial of gefitinib 250 mg daily in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(23): p. 8418-24.

## IX. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 1. Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Die TNM-Klassifikation von Kopf-Hals-Karzinomen ..... | 5  |
| Tabelle 2: Chemikalien .....                                     | 18 |
| Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien, Nährmedien und Puffer .....    | 19 |
| Tabelle 4: Geräte .....  | 20 |
| Tabelle 5: Software .....  | 21 |
| Tabelle 6: Ergebnisse Cetuximab .....                            | 31 |
| Tabelle 7: Ergebnisse der Kombination 1 .....                    | 50 |
| Tabelle 8: Ergebnisse der Kombination 2 .....                    | 52 |

### 2. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Übersicht über die ErbB-Familie und den EGFR-Pathway .....      | 13 |
| Abbildung 2: Strukturformeln von Erlotinib und Gefitinib im Vergleich .....  | 16 |
| Abbildung 3: Ergebnisse Cetuximab 1 .....                                    | 30 |
| Abbildung 4: Ergebnisse Cetuximab 2 .....                                    | 32 |
| Abbildung 5: Ergebnisse Cetuximab 3 .....                                    | 33 |
| Abbildung 6: Log 2 Verdünnungsreihe von A 431 .....                          | 37 |
| Abbildung 7: Log 3 Verdünnungsreihe von PCI-1 .....                          | 38 |
| Abbildung 8: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-1 .....                          | 39 |
| Abbildung 9: Log 3 Verdünnungsreihe von PCI-13 .....                         | 40 |
| Abbildung 10: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-13 .....                        | 41 |
| Abbildung 11: Log 3 Verdünnungsreihe von PC 52 .....                         | 42 |
| Abbildung 12: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-52 .....                        | 43 |
| Abbildung 13: Log 3 Verdünnungsreihe von PCI-9 .....                         | 44 |
| Abbildung 14: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-9 .....                         | 45 |
| Abbildung 15: Log 3 Verdünnungsreihe von PCI-68 .....                        | 46 |
| Abbildung 16: Log 2 Verdünnungsreihe von PCI-68 .....                        | 47 |
| Abbildung 17: Kombination 1 .....  | 49 |
| Abbildung 18: Kombination 2 .....  | 54 |
| Abbildung 19: Vergleich von klinisch relevanten Serumkonzentrationen 1 ..... | 56 |
| Abbildung 20: Vergleich von klinisch relevanten Serumkonzentrationen 2 ..... | 56 |
| Abbildung 21: Vergleich von klinisch relevanten Serumkonzentrationen 3 ..... | 57 |
| Abbildung 22: Western Blot Analyse .....                                     | 58 |

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich diejenigen erwähnen, welche mich bei der Durchführung der Versuche sowie dem Erstellen der Arbeit unterstützt haben.

Danken möchte ich zunächst Herrn Prof. Kübler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Urs Müller-Richter für die Überlassung des Promotionsthemas und die freundliche, stets zeitnahe Unterstützung und kompetente Betreuung. Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Eva-Bettina Bröcker für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Dr. Stefan Hartmann und Dr. Axel Seher für die freundschaftliche Zusammenarbeit und das stets offene Ohr, insbesondere in Fragen der konkreten Versuchsplanung und praktischen Umsetzung, bedanken. Vielen Dank auch an Frau Margit Schleyer und Sabine Wilhelm für die Einweisung und Unterstützung im Laboralltag.

Herzlicher Dank gebührt außerdem meiner Familie, welche mich immer unterstützt, gefördert und in meiner Motivation bestärkt hat. Besonders möchte ich mich außerdem bei meiner Freundin bedanken. Sie hatte mit ihrer liebevollen und kompetenten Unterstützung über den gesamten Zeitraum großen Anteil an dieser Arbeit.