



**Die Rolle der IGF-Achse in Kombination mit anderen
Wachstumsfaktor-Signalwegen bei der Resistenz
oder dem Ansprechen von kolorektalen Karzinomen
auf eine Radiochemotherapie**

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

im Grundprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Henning Seemann

aus Lüneburg

Göttingen, 2013

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Engel, Abteilung Humangenetik, Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Sigrid Hoyer-Fender, Abteilung Entwicklungsbiologie,

Johann-Friedrich-Blumenbach Institut für Zoologie und Anthropologie, Göttingen

Anleiter

Prof. Dr. Peter Burfeind, Abteilung Humangenetik, Universitätsmedizin Göttingen

Dr. Silke Kaulfuß, Abteilung Humangenetik, Universitätsmedizin Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Engel, Abteilung Humangenetik,
Universitätsmedizin Göttingen

Korreferentin: Prof. Dr. Sigrid Hoyer-Fender, Abteilung Entwicklungsbiologie,
Johann-Friedrich-Blumenbach Institut für Zoologie und Anthropologie,
Göttingen

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Peter Burfeind, Abteilung Humangenetik, Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Thomas Friedl, Abteilung Experimentelle Phykologie und Sammlung von
Algenkulturen, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Göttingen

Prof. Dr. Dieter Kube, Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Ernst A. Wimmer, Abteilung Entwicklungsbiologie, Johann-Friedrich-Blumenbach
Institut für Zoologie und Anthropologie, Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das kolorektale Karzinom.....	1
1.2	Die Therapieformen des kolorektalen Karzinoms.....	2
1.3	Der <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	4
1.4	Der <i>Insulin-like Growth Factor Receptor I</i>	6
1.5	Der <i>Platelet-derived Growth Factor Receptor-β</i>	7
1.6	Zielsetzung	9
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	12
2.2	Biochemikalien und Enzyme	13
2.3	Gebrauchswaren	14
2.4	Geräte	14
2.5	Sterilisationsverfahren	15
2.6	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	15
2.7	Lösungen.....	15
2.8	Medien für eukaryotische Zellkulturen	17
2.9	Biologisches Material	17
2.9.1	Eukaryotische Zelllinien	17
2.9.2	Mausstämme und Genehmigung der Tierversuche.....	18
2.9.3	Synthetische DNA-Oligonukleotide	18
2.9.4	Synthetische RNA-Oligonukleotide	20
2.9.5	Antikörper	21
2.9.5.1	Therapeutische Antikörper.....	21
2.9.5.2	Primäre Antikörper.....	21
2.10	Datenbanken	22
2.11	Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen und anschließende Konzentrationsbestimmung	22
2.12	Reverse Transkription	22

2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.13.1 Standard-PCR	23
2.13.2 Quantitative <i>real time</i> PCR-Analysen	24
2.14 Gelelektrophorese von DNA	26
2.15 Proteinchemische Methoden	26
2.15.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen	26
2.15.2 Konzentrationsbestimmung von Protein nach Bradford	26
2.15.3 Western Blot-Analyse von Proteinen	27
2.15.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
2.15.3.2 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	27
2.15.3.3 Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern	27
2.15.4 Co-Immunpräzipitation	28
2.16 Duolink® II Proximity Ligation Assays (PLA)	29
2.16.1 PLA an Zelllinien	30
2.16.2 PLA an Gewebeschnitten	31
2.17 Zellbiologische Methoden	32
2.17.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen	32
2.17.2 Bestimmung der Zellzahl	32
2.17.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen	32
2.17.4 Überprüfung der Zellkultur auf Kontamination mit Mycoplasmen	33
2.17.5 Transfektion eukaryotischer Zellen mit <i>small interfering</i> RNA (siRNA)	33
2.17.6 Bestimmung der Proliferationsrate mit Hilfe des CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)	33
2.17.7 Bestimmung der Todesrate mittels des LDH Cytotoxicity Assays (Roche)	34
2.17.8 Bestimmung der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie	34
2.17.9 Analyse der Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und wichtiger nachfolgender Signalmoleküle mit dem PathScan® RTK Signaling Antibody Array Kit	35
2.18 Aufarbeitung und Prozessierung von prätherapeutischen Biopsien bzw. Resektatproben von Rektumkarzinomen	36
2.18.1 Mechanische Aufarbeitung der Gewebeproben	36

2.18.2	Enzymatische Aufarbeitung der Gewebeprobe	36
2.18.3	Überführung der aufgearbeiteten Zellen in die Zellkultur	37
2.18.3.1	Beschichtung von Kulturschalen mit Rattenschwanzcollagen, Fibronectin oder Matrigel	37
2.18.3.2	Herstellung von konditioniertem Medium	37
2.18.4	Dreidimensionale-Zellkultur	37
2.18.5	Subkutane Injektion der aufgearbeiteten Zellen in immundefiziente Mäuse	37
2.18.6	Präparation von Metaphasechromosomen aus eukaryotischer Zellen	38
2.19	Histologische Techniken	38
2.19.1	Immunzytochemische Färbung eukaryotischer Zellen	39
2.19.2	Fixierung von Gewebe	39
2.19.3	Herstellung der Paraffinschnitte	39
2.19.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
2.19.5	Immunfluoreszenz-Färbung an Gewebeschnitten	40
2.20	Behandlung von kolorektalen Karzinomzelllinien mit AEW-541 und Erlotinib in Kombination mit einer Radiochemotherapie <i>in vitro</i>	41
2.21	Behandlung von kolorektalen Karzinomzelllinien mit AEW-541 und Erlotinib in Kombination mit einer Radiochemotherapie <i>in vitro</i>	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Generierung primärer Zelllinien aus humanen Rektumkarzinombiopsien	43
3.1.1	Aufarbeitung und Verwendung des Rektumkarzinommaterials	43
3.1.2	Ergebnisse der Zellkultur	44
3.1.3	Ergebnisse der subkutanen Injektion von Tumormaterial in immundefiziente Mäuse	45
3.1.4	Überprüfung der kultivierbaren primären Zelllinien mittels Immunzytochemie	50
3.1.5	Überprüfung der Gattungsherkunft primärer Zelllinien mittels Chromosomenanalyse	52
3.1.6	Generierung von primären Zelllinien aus humanen Rektumkarzinombiopsien mittels dreidimensionaler Zellkultur	52
3.2	Einfluss von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren auf den Erfolg der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen	53

3.2.1	Behandlung von kolorektalen Karzinomzelllinien mit AEW-541 und Erlotinib in Kombination mit einer Radiochemotherapie <i>in vitro</i>	54
3.2.2	Einfluss der Inhibition des EGFR und IGF-IR bei der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen <i>in vivo</i>	56
3.3	Analysen zum <i>crosstalk</i>-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR	58
3.3.1	Nachweis von Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation.....	59
3.3.2	Nachweis von Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe des <i>Proximity Ligation Assays</i>	60
3.3.3	Einfluss der jeweiligen Liganden auf die Hybridrezeptorbildung.....	62
3.3.4	Einfluss der Funktionsfähigkeit des EGFR und IGF-IR auf die Bildung von Heterodimeren.....	62
3.3.5	Nachweis von Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe des PLA in humanen Rektumtumoren	64
3.4	Der Einfluss des PDGFR-β in kolorektalen Karzinomzellen.....	65
3.4.1	Analyse der PDGFR- β -Expression in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien.....	65
3.4.2	Inhibition des PDGFR- β in SW480-Zellen.....	66
3.4.2.1	Überprüfung der Funktionsfähigkeit der PDGFR- β -spezifischen siRNAs	67
3.4.2.2	Einfluss der PDGFR- β -Inhibition auf die Expression des EGFR und des IGF-IR.....	68
3.4.2.3	Analyse der Viabilität von SW480-Zellen nach PDGFR- β -Inhibition.....	69
3.4.2.4	Bestätigung der Ergebnisse in der Rektumkarzinomzelllinie SW837.....	71
3.4.2.5	Analyse der nachfolgenden Signalwege des PDGFR- β nach dessen Inhibition in SW480-Zellen	72
3.4.2.6	Überprüfung der Zellmorphologie der SW480-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β	73
3.4.2.7	Analyse des Einfluss der PDGFR- β -Inhibition auf den Zellzyklus in SW480-Zellen <i>via</i> Durchflusszytometrie	74
3.4.2.8	Analyse der Ursache für die Veränderung der Zellzyklusphasen nach Inhibitorbehandlung in SW480-Zellen	75

3.4.2.9	Analyse der Expression weiterer Rezeptoren der PDGFR- β -Familie in kolorektalen Karzinomzelllinien.....	76
3.4.3	Inhibition des PDGFR- β in Caco-2- und DLD-1-Zellen.....	77
3.4.3.1	Überprüfung der Funktionsfähigkeit der PDGFR- β -spezifischen siRNAs in DLD-1- und Caco-2-Zellen.....	77
3.4.3.2	Analysen zur Viabilität der DLD-1- und Caco-2-Zellen nach PDGFR- β -Inhibition.....	79
3.4.3.3	Analyse der Zellzyklusphasen <i>via</i> Durchflusszytometrie in DLD-1- und Caco-2-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β	80
3.4.4	Inhibition von cKIT in SW480- und DLD-1-Zellen mittels siRNA.....	81
3.4.4.1	Überprüfung der Funktionsfähigkeit der cKIT-spezifischen siRNAs in SW480- und DLD-1-Zellen.....	81
3.4.4.2	Analysen zur Viabilität der SW480- und DLD-1-Zellen nach cKIT-Inhibition.....	83
3.4.4.3	Analyse der Zellzyklusphasen nach Inhibition von cKIT in SW480- und DLD-1-Zellen <i>via</i> Durchflusszytometrie.....	84
3.4.4.4	Analyse der Zellzyklusphasen nach gemeinsamer Inhibition von cKIT und PDGFR- β in SW480-Zellen <i>via</i> Durchflusszytometrie.....	85
3.4.5	Klärung der Ursache für den G2/M-Arrest in SW480-Zellen nach der Behandlung mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502.....	86
3.4.5.1	Analyse der Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und wichtiger nachfolgender Signalmoleküle nach der Behandlung mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 und PDGFR- β - bzw. cKIT-spezifischer siRNAs in SW480-Zellen.....	86
3.4.5.2	Überprüfung der Aktivität der Kinase SRC nach Behandlung von SW480- und DLD-1-Zellen mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502, PDGFR- β - bzw. cKIT-spezifischer siRNA und dem SRC-Inhibitor PP2.....	87
3.4.5.3	Überprüfung des Einflusses der Kinase SRC auf die Proliferation von SW480- und DLD-1-Zellen.....	90
4	Diskussion.....	92
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	92
4.2	Resistenzen bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms und die Suche nach Biomarkern.....	94

4.2.1	Therapiemöglichkeiten beim kolorektalen Karzinom	94
4.2.2	Resistenzen und Biomarker	95
4.2.3	Die Vorzüge eines <i>in vitro</i> -Systems	97
4.3	Die Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen als weitere Therapieoption beim kolorektalen Karzinom.....	100
4.3.1	Die anti-EGFR-Therapie bei soliden Tumoren	103
4.3.2	Der Einfluss anderer Rezeptortyrosinkinasen bei der Resistenz gegen die anti-EGFR-Therapie	108
4.3.2.1	Inhibition des EGFR und IGF-IR bei der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen <i>in vitro</i>	110
4.3.2.2	Inhibition des EGFR und des IGF-IR bei der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen <i>in vivo</i>	113
4.3.3	Aufklärung des <i>crossstalk</i> -Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR	115
4.4	Der Einfluss des PDGFR-β in kolorektalen Karzinomzellen.....	118
4.4.1	Einfluss der PDGFR- β -Inhibition auf zelluläre Prozesse	119
4.4.2	Vergleich der Auswirkungen der PDGFR- β -siRNA-Behandlung mit der Ki11502-Behandlung in Kolonkarzinomzellen mit unterschiedlich starker cKIT-Expression ..	123
4.4.3	Inhibition von SRC durch Ki11502	126
4.4.3.1	Nachweis der SRC-Inhibition durch Ki11502	128
4.5	Perspektiven.....	133
4.5.1	Etablierung von primären Rektumkarzinomzelllinien	133
4.5.2	5-FU-basierte Radiochemotherapie mit zusätzlicher Inhibition des EGFR und des IGF-IR <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	134
4.5.3	Der Einfluss der Heterodimerbildung zwischen dem EGFR und dem IGF-IR beim kolorektalen Karzinom	135
4.5.4	Der Einfluss der PDGFR- β -Inhibition im kolorektalen Karzinom.....	136
5	Zusammenfassung	137
5.1	Etablierung von primären Rektumkarzinomzelllinien.....	137
5.2	5-FU-basierte Radiochemotherapie mit zusätzlicher Inhibition des EGFR und des IGF-IR <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	138

5.3	Aufklärung des <i>crossstalk</i>-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR ..	139
5.4	Der Einfluss des PDGFR-β in kolorektalen Karzinomzellen.....	139
6	Literaturverzeichnis.....	142
7	Anhang.....	163

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des EGFR und der nachfolgenden Signalwege.....	4
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des IGF-IR und der nachfolgenden Signalwege.....	6
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des PDGFR- β und der nachfolgenden Signalwege.....	8
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Analyse der molekularen Ursachen der Resistenz von primären kolorektalen Karzinomzellen gegenüber der Radiochemotherapie.....	11
Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des Duolink [®] II Proximity Ligation Assays.....	30
Abbildung 3.1 Darstellung von angewachsenen Zellen der Rektumkarzinombiopsie P334.....	45
Abbildung 3.2 Darstellung des Tumors in einer SCID-Maus nach subkutaner Injektion von Biopsiematerial aus einem Rektumkarzinom des Patienten 310.....	46
Abbildung 3.3 Histopathologische Analysen des Xenografttumors SCID1.....	47
Abbildung 3.4 Darstellung von angewachsenen Zellen des induzierten Xenografttumors SCID1.....	47
Abbildung 3.5 Präparation des Tumors aus einer SCID-Maus nach subkutaner Injektion aufgearbeiteter Tumorzellen des Tumors SCID1.....	48
Abbildung 3.6 Histopathologische Analysen des Xenografttumors SCID1.2.....	49
Abbildung 3.7 Darstellung von angewachsenen Zellen des Xenografttumors SCID1.2.....	49
Abbildung 3.8 Immunzytochemische Analysen der etablierten primären Zelllinien.....	51
Abbildung 3.9 Beispielhafte Darstellung der Chromosomen einer Metaphase aus der Zelllinie SCID 1.	52
Abbildung 3.10 Darstellung einer Kolonie der primären Zelllinie der Rektumkarzinombiopsie P1425 in der dreidimensionalen Zellkultur.....	53
Abbildung 3.11 Ansprechen von kolorektalen Karzinomzelllinien auf die kombinierte Radiochemotherapie und die Inhibition des EGFR, des IGF-IR bzw. beider Rezeptoren in Kombination.....	56
Abbildung 3.12 Behandlungsschema der Xenografttumore.....	57
Abbildung 3.13 Tumorprogression von Xenografttumoren der Zelllinien DLD-1 und SW837 nach 5-FU- basierter Radiochemotherapie und Inhibition des EGFR des IGF-IR bzw. beider Rezeptoren in Kombination.....	58
Abbildung 3.14 Vergleich der EGFR- und IGF-IR-mRNA-Expression in verschiedenen kolorektalen Zelllinien.....	59
Abbildung 3.15 Nachweis der Interaktionen zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe der Co- Immunpräzipitation.....	60
Abbildung 3.16 Nachweis von Heterodimeren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR und der Induzierbarkeit dieser mit Hilfe des <i>Proximity Ligation Assays</i> (PLA).....	61
Abbildung 3.17 Nachweis der Notwendigkeit der Anwesenheit beider Liganden für die Induktion der EGFR/IGF-IR-Heterodimere mit Hilfe des PLA.....	62
Abbildung 3.18 Analysen zur Notwendigkeit der Funktionsfähigkeit beider Rezeptoren für die EGFR/IGF-IR-Hybridrezeptor-Bildung.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.19 Nachweis von Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe des PLA in humanen Rektumtumoren.	64
Abbildung 3.20 Expressionsanalysen des PDGFR- β in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien.	66
Abbildung 3.21 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der verwendeten PDGFR- β -spezifischen siRNAs mittels qRT-PCR- und Western Blot-Analyse.	68
Abbildung 3.22 Expressionsanalyse der EGFR- und IGF-IR-mRNA nach PDGFR- β -Inhibition in SW480-Zellen mit Hilfe der qRT-PCR.	69
Abbildung 3.23 Analysen zur Viabilität der SW480-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β	70
Abbildung 3.24 Analysen zur Viabilität der SW837-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β mittels des <i>small molecule</i> -Inhibitors Ki11502.	71
Abbildung 3.25 Analyse der nachfolgenden Signalwege nach PDGFR- β -Inhibition in SW480-Zellen mittels Western Blot-Analyse.	73
Abbildung 3.26 Analyse der Zellmorphologie von SW480-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β	74
Abbildung 3.27 Analyse des Einfluss der PDGFR- β -Inhibition auf den Zellzyklus in SW480-Zellen <i>via</i> Durchflusszytometrie.	75
Abbildung 3.28 Analyse des Zellzyklusregulators Cyclin B1 in SW480-Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor Ki11502.	76
Abbildung 3.29 Vergleich der Expression der PDGFR- β -Familienmitglieder cKIT, FLT3 und MCSF in kolorektalen Karzinomzelllinien.	77
Abbildung 3.30 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der PDGFR- β -spezifischen siRNAs in DLD-1- und Caco-2-Zellen.	78
Abbildung 3.31 Viabilität der DLD-1- und Caco-2-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β	80
Abbildung 3.32 Überprüfung der Zellzyklusphasen <i>via</i> Durchflusszytometrie nach Inhibitorbehandlung von DLD-1- und Caco-2-Zellen.	81
Abbildung 3.33 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der cKIT-spezifischen siRNAs in SW480- und DLD-1-Zellen.	83
Abbildung 3.34 Viabilität der SW480- und DLD-1-Zellen nach Inhibition des Rezeptors cKIT <i>via</i> siRNA.	84
Abbildung 3.35 Überprüfung der Zellzyklusphasen nach cKIT-Inhibition in SW480- und DLD-1-Zellen.	85
Abbildung 3.36 Überprüfung der Zellzyklusphasen nach simultaner cKIT/PDGFR- β -Inhibition in SW480-Zellen <i>via</i> Durchflusszytometrie.	86
Abbildung 3.37 Bestimmung der Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und nachfolgender Signalproteine nach PDGFR- β - oder cKIT-Inhibition mit Hilfe des <i>PathScan RTK signaling antibody array</i>	87
Abbildung 3.38 Analyse des Phosphorylierungszustandes von SRC in SW480-Zellen nach Blockade des PDGFR- β mittels siRNA oder des Inhibitors Ki11502.	89
Abbildung 3.39 Analyse des Phosphorylierungszustandes von SRC in DLD-1-Zellen nach Blockade des PDGFR- β mittels siRNA oder des Inhibitors Ki11502.	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.40 Proliferationsänderung nach der Inhibition von PDGFR- β , cKIT oder SRC in SW480- und DLD-1-Zellen.	91
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Einflusses der EGFR-Achse beim kolorektalen Karzinom.....	103
Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der Resistenzmechanismen gegen die anti-EGFR-Therapie.	110
Abbildung 4.3 Schematische Darstellung des Einflusses der Rezeptorinhibition auf die Induzierbarkeit von EGFR/IGF-IR-Heterodimeren in SW480-Zellen.	117
Abbildung 4.4 Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	122
Abbildung 4.5 Vergleich der Auswirkungen der PDGFR- β -siRNA-Behandlung mit der Ki11502-Behandlung in den Zelllinien Caco-2, SW480 und DLD-1.	125
Abbildung 4.6 Schematische Darstellung der SRC-Struktur (A) und der SRC-Signaltransduktion (B).	128
Abbildung 4.7 Einfluss des Inhibitors Ki11502 auf kolorektale Karzinomzellen.....	130

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
ad	addiere: aus der Chemie: auffüllen auf... mit...
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
Bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa (ungefähr)
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
cm	Zentimeter
c-Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
Ct	<i>threshold cycle</i> , Schwellenwertzyklus
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
DRF	Dosis reduzierender Faktor
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigungskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
Gy	Gray (durch ionisierende Strahlung aufgenommene Energiedosis)
h	Stunde

Abkürzungsverzeichnis

IGF-BP-3	<i>Insulin-like Growth Factor-I Binding Protein 3</i>
IGF-I/II	<i>Insulin-like Growth Factor-I/II</i>
IGF-IR	<i>Insulin-Like Growth Factor-I Receptor</i>
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LUC	Luciferase
μ	micro = 10 ⁻⁶
μg	Microgramm
μl	Microliter
μm	Micrometer
m	milli = 10 ⁻³
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA = Boten-RNA</i>
n	nano = 10 ⁻⁹
NEAA	<i>nonessential amino acids</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p	pico = 10 ⁻¹²
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBGD	<i>Porphobilinogen deaminase</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR-β	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor β</i>
Pen	Penicillin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR
RCT	Radiochemotherapie
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Src	<i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)</i>
Strep	Streptomycin
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Bindeprotein
TBS(-T)	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (mit Tween)
TGF- α	<i>transforming growth factor α</i>
TRG	Tumorregressionsgrad
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UV	ultraviolettes Licht
u.a.	unter anderem
V	Volt
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
vgl.	vergleiche
w/v	Massenprozent
z.T.	zum Teil
z.B.	zum Beispiel

Fachwortverzeichnis

In dieser Arbeit wurden z.T. englische Fachbegriffe verwendet ohne sie ins Deutsche zu übersetzen. Deutsche Übersetzungen dieser Fachbegriffe sind häufig nur eine Umschreibung dessen, was im Englischen mit einem Wort ausgedrückt werden kann. Die Bedeutung dieser Fachbegriffe wird hier aufgeführt, sofern dies nicht im Text geschieht.

adjuvant	Abgeleitet vom lateinischen Wort „adjuvare“ für „unterstützen“, ergänzende Tumortherapie mittels Chemotherapie, Hormontherapie und Strahlentherapie
Amplifikation	Wörtlich übersetzt: Ausweitung Gezielte Vermehrung von DNA-Abschnitten
Annealing	Wörtlich übersetzt: glühen Anlagerung eines Primers an eine DNA-Sequenz
Assay	Wörtlich übersetzt: Test, Probe Versuch, Experiment
downstream	Wörtlich übersetzt: Stromabwärts <i>hier</i> : bezeichnet alle durch einen Rezeptor aktivierten, nachgeschalteten Signalwege
Elongation	Wörtlich übersetzt: Verlängerung <i>hier</i> : DNA-Strang-Verlängerung während einer PCR
housekeeping	Wörtlich übersetzt: Haushaltsgen Gen, das in den Zellen eines Organismus unabhängig vom Zelltyp, Zellzyklusstadium oder äußeren Einflüssen exprimiert wird
<i>in vitro</i>	Lateinisch für „Im Glas“ Bezeichnet Experimente, die in einer kontrollierten künstlichen Umgebung außerhalb eines lebenden Organismus durchgeführt werden
<i>in vivo</i>	Lateinisch für „Im Lebendigen“ Bezeichnet Experimente, die im lebenden Organismus ablaufen
<i>in situ</i>	Lateinisch für „am Ursprungsort“ Bezeichnet Experimente, die an Gewebe außerhalb eines lebenden Organismus durchgeführt werden
knockdown	Wörtlich übersetzt: Niederschlag Bezeichnet die Herunterregulierung der Expression eines Gens mittels RNA-Interferenz

neoadjuvant	zusammengesetzt aus dem griechischen Wort „neo“ für „neu“ und dem lateinischen Wort „adjuvare“ für „unterstützen“, bezeichnet die Tumorreduktion mittels Chemo- oder Strahlentherapie vor einem operativen Eingriff
palliativ	abgeleitet vom lateinischen ‚palliare‘ (mit einem Mantel umhüllen, verbergen), bezeichnet Therapien zur Verbesserung der Lebensqualität
Primer	Oligonukleotide, die bei der DNA-Synthese als Startpunkte für die Polymerase dienen
real time	Wörtlich übersetzt: Echtzeit Die <i>real time</i> PCR ermöglicht es, die Zunahme der Amplifikatmenge in Echtzeit zu analysieren
semi-dry	Wörtlich übersetzt: halb-trocken Semi-dry-Blot-System dient der elektrophoretischen Übertragung von Proteinen auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran
screening	Wörtlich übersetzt: (durch)sieben, untersuchen
template	Wörtlich übersetzt: Vorlage Matrize für die DNA-Synthese
threshold cycle	Wörtlich übersetzt: Schwellenwert-Zyklus beschreibt den Zyklus einer qRT-PCR, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt
well	Wörtlich übersetzt: das Bohrloch Hier: Vertiefung in einer Mikrotiterplatte

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

In der westlichen Welt stellen Tumorerkrankungen eines der wichtigsten Gesundheitsprobleme dar. In den USA entwickelt eine von drei Frauen und einer von zwei Männern während ihres Lebens eine Tumorerkrankung. Einer von vier Todesfällen in den USA ist tumorbedingt. Das kolorektale Karzinom ist mit jeweils 14% sowohl für Frauen als auch für Männer die dritthäufigste Tumorneuerkrankung. Auch bei den tumorbedingten Todesfällen steht das kolorektale Karzinom mit je 9% bei Männern und 14% bei Frauen an dritter Stelle (Siegel *et al.*, 2012). In der Bundesrepublik Deutschland werden für das Jahr 2012 insgesamt 486000 Tumorneuerkrankungen prognostiziert. Davon entfallen ca. 70000 Fälle (14%) auf das kolorektale Karzinom (Robert Koch-Institut (RKI) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID), 2012)

Etwa 90% der malignen Darmtumore stellen Adenokarzinome dar, die sich aus den Drüsen der Darmschleimhaut entwickeln. Dabei bilden sich zunächst Adenome (benigne Polypen), die maligne entarten können. Etwa ein Drittel der Erkrankungen treten in der Sigmaschlinge und im Rektum auf, ein Drittel im linken Anteil des Kolons. Das letzte Drittel betrifft den rechten Teil des Kolons und den Blinddarm (RKI und GEKID, 2012).

Ein hohes Alter sowie das Vorhandensein von Adenomen sind die wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten von kolorektalen Karzinomen. So werden 90% der kolorektalen Karzinome nach dem 50. Lebensjahr diagnostiziert. Übergewicht und eine fettreiche, ballaststoffarme Ernährung sowie regelmäßiger Alkohol- und Tabakkonsum erhöhen jedoch das Risiko. Desweiteren können auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, wie z.B. die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn sowie einige erbliche Syndrome wie das Lynch-Syndrom, die Familiäre Adenomatöse Polyposis, das Peutz-Jeghers-Syndrom und das Juvenile Polyposis-Syndrom zur Entstehung eines Karzinoms führen (Boyle und Langman, 2000, US-Preventive-Services-Task-Force, 2008, RKI und GEKID, 2012, Siegel *et al.*, 2012).

Um das Ausmaß der Tumorerkrankung, die Progression und die Prognoseeinschätzung beim kolorektalen Karzinom beschreiben zu können, werden der Tumor und dessen Ausbreitung nach den Kriterien der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) klassifiziert. Die Stadieneinteilung (*staging*) von I bis IV erfolgt hierbei auf der Grundlage der sogenannten TNM-Klassifikation, die die Ausprägung der Tiefeninvasion des Primärtumors (T), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) einbezieht. Jeder der drei Bereiche wird zunächst bewertet und ihm ein

Wert zugeteilt (Tabelle 1.1). Die Stadieneinteilung nach UICC setzt sich dann aus den Werten der TNM-Klassifikation zusammen (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.1 TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

T0	Keine Infiltration	N0	Keine Lymphknotenmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen
T1	Tumor infiltriert Submukosa	N1	<3 perikolische/perirektale Lymphknotenmetastasen	M1	Fernmetastasierung
T2	Tumor infiltriert <i>Muscularis propria</i>	N2	>3 perikolische/perirektale Lymphknotenmetastasen		
T3	Tumor infiltriert durch die <i>Muscularis propria</i> in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe				
T4	Tumor infiltriert Organe/Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum				

Tabelle 1.2 UICC Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms auf der Grundlage der TNM-Klassifikation

Stadium Ia	T1	N0	M0
Stadium Ib	T2	N0	M0
Stadium II	T3, T4	N0	M0
Stadium III	Alle T	N1, N2	M0
Stadium IV	Alle T	Alle N	M1

1.2 Die Therapieformen des kolorektalen Karzinoms

Die durchzuführende Therapie und die erwartete Überlebensprognose nach Abschluss der Behandlung hängen beim kolorektalen Karzinom vom Stadium der Erkrankung sowie von der Lage des Tumors ab. Die wichtigste Therapieoption ist die vollständige operative Entfernung des tumortragenden Darmabschnitts sowie des umgebenden Lymphabflusssystems. Bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf kann als weitere Therapieoption eine kombinierte Radiochemotherapie durchgeführt werden, bei der

zusätzlich zur Bestrahlung Zytostatika wie 5-Fluoruracil oder Oxaliplatin verabreicht werden. Momentan ist in Deutschland und weiten Teilen von Europa und den USA für fortgeschrittene Rektumkarzinome der UICC- Klassifikation Stufe II und III die Standardbehandlung die präoperative Radiochemotherapie mit 5-Fluoruracil. Adjuvant zur Operation wird dem Patienten außerdem noch eine vier-monatige Chemotherapie mit 5-Fluoruracil verabreicht (Rodel *et al.*, 2012). Die Prognose nach der Therapie ist abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors und dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen. Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 40% bis 60% (Siegel *et al.*, 2012). Auffällig ist jedoch, dass ein und dieselbe Therapie bei manchen Patienten mit einem kolorektalen Karzinom zu einer vollständigen Heilung, bei anderen Patienten jedoch zu keiner Verbesserung des Krankheitsbildes führt (Sauer *et al.*, 2004, Minsky 2009). Hier stellt sich die Frage, welche genetischen oder epigenetischen Unterschiede dieser Beobachtung zugrunde liegen könnten. In den letzten Jahren wird daher die Individualisierung der Therapie von kolorektalen Karzinomen in den Vordergrund laufender Forschungsarbeiten gestellt. Ein konkretes Ziel ist hier der molekulargenetische Vergleich der Karzinome von Patienten mit gutem Therapieansprechen (*responder*) mit denen von Patienten mit schlechtem Therapieansprechen (*non-responder*), um sogenannte Biomarker zu identifizieren (Kuremsky *et al.*, 2009). Langfristig könnten diese Biomarker dafür eingesetzt werden, vor Therapiebeginn das Karzinom zu analysieren und anhand dieser Daten eine für den Patienten vielversprechende individuelle Therapie zu wählen.

Ein erhebliches Problem bei der kombinierten Radiochemotherapie ist der Umstand, dass alle eingesetzten Zytostatika nicht ausschließlich gegen Tumorzellen wirken. Die wachstums- und zellteilungsinhibierenden Effekte wirken auf alle proliferierenden Zellen des Körpers. Deshalb führt der Einsatz von Zytostatika oft zu teilweise massiven Nebenwirkungen wie Magen- und Darmproblemen, Myelosuppression und Haarausfall (Sauer *et al.*, 2004, Rodel *et al.*, 2012). Auch das zentrale Nervensystem wird durch den Einsatz der Zytostatika häufig geschädigt. So ist für das Zytostatikum 5-Fluoruracil bereits bekannt, dass es die Myelinscheiden angreift (Han *et al.*, 2008). Neue Therapieansätze versuchen daher karzinomspezifische Ziele in die Behandlung mit aufzunehmen. Ein Beispiel dafür ist die Hemmung der Tumor-Vaskularisierung mit spezifischen Angiogenesehemmern (Puthillath *et al.*, 2009). Ein weiteres mögliches Ziel stellen die Rezeptortyrosinkinasen und deren Liganden dar. Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Tumorwachstum, Tumorangiogenese und Metastasenbildung spielen (Yarden 2001, Pollak 2004, Samani *et al.*, 2007, Uberall *et al.*, 2008).

1.3 Der *Epidermal Growth Factor Receptor*

Ein wichtiger Vertreter der Rezeptortyrosinkinasen beim kolorektalen Karzinom ist der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). Der EGFR ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne und zwei extrazellulären Ligandenbindungsdomänen, die zusammen als Bindungsstelle für den Liganden dienen (Spano *et al.*, 2005). Der EGFR (oder HER1) ist ein Mitglied der EGFR-Familie der Rezeptortyrosinkinasen, zu der auch HER2, HER3 und HER4 gehören. Der EGFR liegt als Homodimer oder als Heterodimer mit einem der anderen Familienmitglieder in der Zellmembran vor. Neben dem EGFR-familienpezifischen Liganden EGF können auch eine ganze Reihe weiterer Liganden, wie der *Transforming Growth Factor α* , Amphiregulin, Epiregulin und Neuregulin 1-4 die EGFR-Achse aktivieren (Citri und Yarden 2006). Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor führt zur Stabilisierung der Bindung und zu einer Konformationsänderung, in deren Folge es zu einer Transphosphorylierung kommt. Dadurch wird die Tyrosinkinasedomäne des EGFR phosphoryliert, die anschließend weitere nachfolgende Signalwege aktiviert (Yarden 2001, Citri und Yarden 2006) (Abbildung 1.1). Die beiden wichtigsten *downstream* Signalwege sind der Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K-) und der *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Signalweg. Der PI3K-Signalweg fördert das Überleben der Tumorzellen durch die Aktivierung antiapoptotischer Signale. Der MAPK-Signalweg beeinflusst den Zellzyklus und die Zellproliferation (Yarden und Sliwkowski 2001, Uberall *et al.*, 2008).

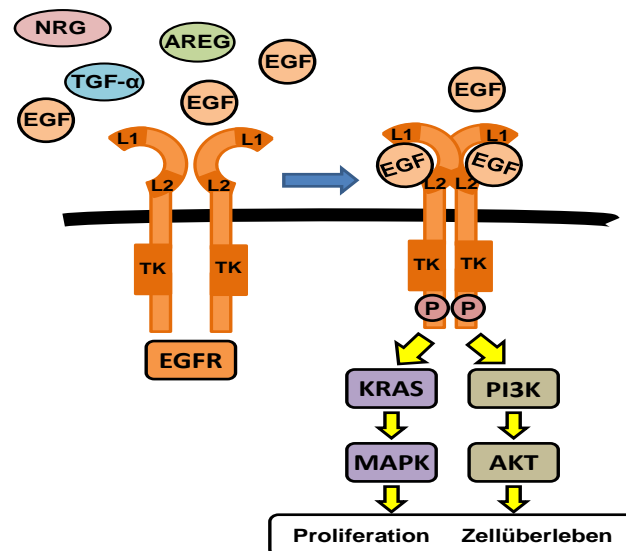


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des EGFR und der nachfolgenden Signalwege.

Die Bindung des Liganden (z.B. EGF) an die Ligandenbindungsdomänen L1 und L2 bewirkt eine Konformationsänderung des EGFR, die zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne TK führt. Dies führt wiederum zur Aktivierung des MAPK- und des PI3K-Signalwegs und fördert so die Zellproliferation und das Zellüberleben. AREG: Amphiregulin, TGF- α : *Transforming Growth Factor α* , NRG: Neuregulin; modifiziert nach (Citri und Yarden 2006).

Bei bis zu 82% aller Patienten mit einem kolorektalen Karzinom wird der EGFR überexprimiert. Eine hohe EGFR-Expression steht im Zusammenhang mit einer schlechten Überlebensprognose und einem schlechten Ansprechen von Patienten mit lokalem Rektumkarzinom auf die Radiotherapie (Spano *et al.*, 2005, Debucquoy *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des EGFR führt, in deren Folge proliferationsfördernde Signalwege aktiviert werden (Bowers *et al.*, 2001). Die Inhibierung des EGFR-Signalwegs wird in der Tumorthherapie bereits angewandt. Mit monoklonalen Antikörpern gegen die Ligandenbindungsstelle des EGFR (z.B. Cetuximab und Panitumumab) kann diese blockiert und so eine Ligandenbindung verhindert werden. Dies inhibiert wiederum eine Aktivierung der nachfolgenden MAPK- und PI3K-Signalwege (Berardi *et al.*, 2010). Es besteht auch die Möglichkeit, die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR mit spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren zu blockieren (z.B. Erlotinib und Gefitinib) und so die nachfolgende Signalkaskade zu inhibieren. Aufgrund ihrer geringen Größe sind diese sogenannten *small molecule* Inhibitoren in der Lage, in die Zelle einzudringen und den Rezeptor zu inaktivieren (Hammerman *et al.*, 2009). Die Inhibition des EGFR-Signalwegs führt in Tiermodellen für kolorektale Karzinome zu einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums aufgrund einer verringerten Tumorproliferation und einer erhöhten Apoptoserate der Tumorzellen (Prewett *et al.*, 2002). In der Therapie des kolorektalen Karzinoms ist die Inhibition des EGFR-Signalwegs unter der Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen den EGFR bereits gut etabliert (Cunningham *et al.*, 2004). Die Inhibition des EGFR zeigt jedoch keinen Effekt bei kolorektalen Tumoren, bei denen durch eine Mutation im nachfolgenden Signalweg der PI3K- oder MAPK-Signalweg konstitutiv aktiviert ist. Hierbei sind besonders die Kinasen KRAS, BRAF und PI3K zu nennen (Cunningham *et al.*, 2010, Debucquoy *et al.*, 2010). Desweiteren kann es während der Behandlung des kolorektalen Karzinoms mit EGFR-Inhibitoren zur Ausbildung von Resistenzen kommen. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des EGFR in verschiedenen Karzinomzelllinien (z.B. Ovarialkarzinom und nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom) zu einer erhöhten Expression der verwandten Rezeptoren HER2 und HER3 führen (Christensen *et al.*, 2001, Wheeler *et al.*, 2008). Aber auch andere Rezeptortyrosinkinasen haben einen Einfluss auf ein Ansprechen der anti-EGFR-Therapie. Ein Beispiel hierfür ist der *Insulin-like Growth Factor Receptor I* (IGF-IR). Für den IGF-IR konnte für verschiedene Tumorentitäten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität des Signalwegs mit einer Resistenz gegen die anti-EGFR-Therapie korreliert (Chakravarti *et al.*, 2002, Jones *et al.*, 2004). Außerdem existiert in kolorektalen Karzinomzellen eine direkte Interaktion (*crosstalk*) zwischen dem EGFR und dem IGF-IR (Hu *et al.*, 2008, Kaulfuss *et al.*, 2009). Neben den bekannten Mutationen beim

Resistenzmechanismus gegen die anti-EGFR-Therapie scheinen auch andere Rezeptortyrosinkinasen und besonders der IGF-IR eine Resistenz vermitteln zu können.

1.4 Der *Insulin-like Growth Factor Receptor I*

Der IGF-IR ist ein Transmembranprotein und besteht aus zwei kovalent gebundenen Polypeptidketten mit je einer extrazellulären α -Einheit mit den Ligandenbindungsdomänen und einer transmembranen β -Einheit mit der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne (Ullrich *et al.*, 1986). Der IGF-IR kann Homodimere oder Heterodimere mit einer der Isoformen des Insulin-Rezeptors (IR-A/IR-B) bilden. Im Gegensatz zum EGFR sind diese Dimere über Disulfidbrücken kovalent verbunden. Die Ligandenbindung von *Insulin-like Growth Factor I* (IGF-I) oder *Insulin-like Growth Factor II* (IGF-II) führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, so dass sich die beiden β -Einheiten gegenseitig transphosphorylieren können. Der aktive Rezeptor phosphoryliert und aktiviert dann weitere Signalwege, wie den PI3K- und den MAPK-Signalweg, und hat so großen Einfluss auf Zellüberleben und Proliferation (Sachdev und Yee 2007, Hu *et al.*, 2008). Die verfügbare Menge an bindungsfähigen Liganden wird durch bestimmte IGF-Bindeproteine (IGFBP) reguliert. Diese Proteine binden an freies IGF-I oder IGF-II und sorgen so dafür, dass diese für die Rezeptoraktivierung nicht mehr zur Verfügung stehen (Abbildung 1.2).

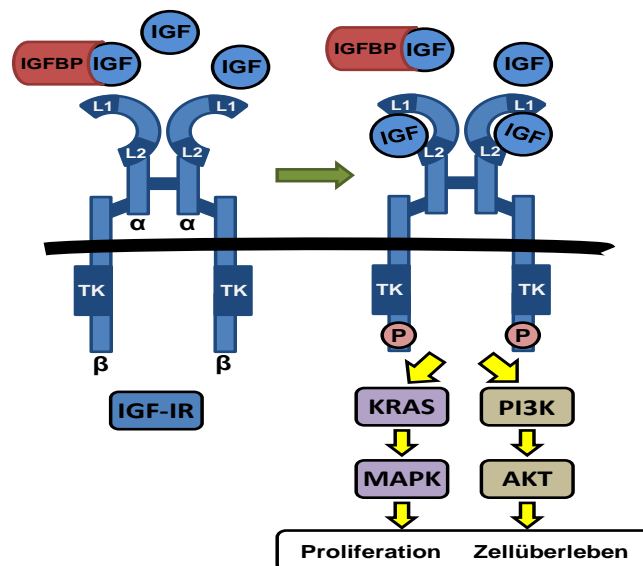


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des IGF-IR und der nachfolgenden Signalwege.

Der IGF-IR besteht aus einer α - und einer β -Einheit, die kovalent verbunden sind. Auch die IGF-IR-Dimere liegen kovalent gebunden in der Zellmembran vor. Die Bindung des Liganden (IGF-I oder IGF-II) an die Ligandenbindungsdomänen L1 und L2 führt zu einer Konformationsänderung des IGF-IR, die in der Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne TK resultiert. Dies führt zur Aktivierung des MAPK- und des PI3K-Signalwegs und fördert so die Proliferation und das Zellüberleben. Durch IGF-Bindeproteine (IGFBP) gebundene IGFs stehen für die Rezeptoraktivierung nicht mehr zur Verfügung; modifiziert nach (Malaguarnera und Belfiore 2011).

Der IGF-IR liegt bei mehr als 90% aller Patienten mit einem kolorektalen Adenokarzinom überexprimiert vor (Hakam *et al.*, 1999). Es gibt vielfache Hinweise darauf, dass der IGF-IR eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps von kolorektalen Tumorzellen spielt (Hakam *et al.*, 1999, Pollak 2004). So fördert die IGF-IR-Achse die Transformation, Tumorgenese und Tumovaskularisierung im kolorektalen Karzinom (Reinmuth *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2002, Samani *et al.*, 2007, Tao *et al.*, 2007). Die Promotorregion des IGF-IR ist außerdem eine Zielsequenz für wichtige Onkogene wie z.B. den Transkriptionsfaktor c-Myc. Bestimmte Mutationen im c-Myc-Gen führen außerdem zu einer gesteigerten Expression des IGF-IR (Reiss *et al.*, 1991). In nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen führt die Inhibierung des IGF-IR zu einer Strahlensensibilisierung der Zellen (Iwasa *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse ist auch der IGF-IR zu einem attraktiven Ziel in der Behandlung von Tumoren geworden.

Immunhistochemische Analysen an Darmkrebs-Gewebeschnitten zeigten eine inter- und intratumorale Heterogenität der Expression von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGFR, dem *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2* (VEGFR2) und dem *Platelet-derived Growth Factor Receptor-β* (PDGFR-β) (Kuwai *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die alleinige Inhibition einer Rezeptortyrosinkinase während der Tumorthherapie keine optimalen Ergebnisse erzielen kann. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die gemeinsame Inhibition von EGFR und IGF-IR in kolorektalen Tumorzellen zu einem deutlich stärkeren therapeutischen Effekt führt als die Inhibition nur eines Rezeptors (Kaulfuss *et al.*, 2009). Daher lässt sich die Hypothese aufstellen, dass es effektiver ist, während der Tumorthherapie verschiedene Rezeptortyrosinkinasen gleichzeitig zu inhibieren. Der PDGFR-β könnte hierbei ein weiterer vielversprechender Kandidat bei der Therapie kolorektaler Karzinome sein.

1.5 Der *Platelet-derived Growth Factor Receptor-β*

Auch der PDGFR ist ein Transmembranrezeptor mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität. Es existieren zwei verschiedene Formen des Rezeptors, die α -Form und die β -Form. Beide können sowohl Homo- als auch Heterodimere miteinander bilden. Es existieren vier verschiedene Liganden (PDGF-A/B/C/D), welche nur als Dimere vorkommen. Die Homodimere PDGF-BB/DD und das Heterodimer PDGF-AB sind in der Lage, den PDGFR- β zu aktivieren. Jede der PDGF-Einheiten bindet dabei an eine Ligandenbindungsstelle. Dadurch werden die Teile des Rezeptordimers zusammengeführt und können sich gegenseitig phosphorylieren (Heldin und Westermark 1999). Wie der EGFR und der IGF-IR reguliert der PDGFR- β über den PI3K- und den MAPK-Signalweg die Zellproliferation und das Zellüberleben (Nishioka *et al.*, 2008, Shim *et al.*, 2010).

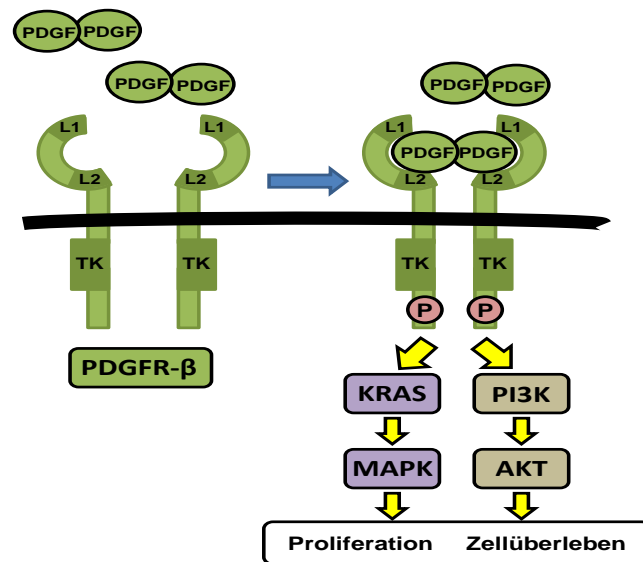


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des PDGFR- β und der nachfolgenden Signalwege.

Die Bindung des Ligandendimers an die Ligandenbindungsdomänen L1 und L2 bringt die beiden Teile des Rezeptordimers eng zusammen und ermöglicht so die gegenseitige Transphosphorylierung der beiden Dimerpartner. Dies aktiviert die Tyrosinkinasedomäne TK und führt so zur Aktivierung des MAPK- und des PI3K-Signalwegs, wodurch die Zellproliferation und das Zellüberleben gefördert werden; modifiziert nach (Chen *et al.*, 2012).

Der PDGFR- β wird in einigen Glioblastomen und Prostatakarzinomen überexprimiert und fördert dort das Tumorstadium (George 2003). Es wurde gezeigt, dass der PDGFR- β die Funktion des IGF-IR beeinflusst. In Lebermyofibroblasten konnte außerdem ein direkter *crossstalk* zwischen dem PDGFR- β und dem IGF-IR nachgewiesen werden (DeAngelis *et al.*, 1995, Novosyadlyy *et al.*, 2006, Bielen *et al.*, 2011). In peripheren Nervenscheidentumoren findet eine Heterodimerisierung von PDGFR- β mit dem EGFR statt (Perrone *et al.*, 2009). Eine Expression des PDGFR- β und seiner Liganden konnte sowohl in kolorektalen Tumorzellen (Kim *et al.*, 2005, Yokoi *et al.*, 2005) als auch in tumorassoziierten endothelialen Zellen wie z.B. Perizyten sowie in anderen Stromazellen in Kolonkarzinomen nachgewiesen werden (Lindmark *et al.*, 1993, Sundberg *et al.*, 1993, Kitadai *et al.*, 2006). Zusammen bilden alle diese Zellen eine geeignete Umgebung, die für das Wachstum und das Überleben der Tumorzellen wichtig ist (Radinsky und Fidler 1992, Liotta und Kohn 2001). Beim Kolonkarzinom scheint das Expressionslevel des PDGFR- β im Tumorgewebe mit der Angiogenese, Invasion und Metastasenbildung des Tumors assoziiert zu sein (Song *et al.*, 2005, Kitadai *et al.*, 2006, Mancuso *et al.*, 2006).

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen in kolorektalen Karzinomzellen näher analysiert werden. Dabei ergaben sich vier verschiedene Zielsetzungen:

- 1) Untersuchung des Einflusses von Rezeptortyrosinkinasen auf den Therapieerfolg der 5-Fluoruracil-basierten Radiochemotherapie und die Entstehung von Resistenzen unter Verwendung von primären Zelllinien
- 2) Untersuchung, ob der *crosstalk* zwischen dem EGFR und IGF-IR ein möglicher Resistenzmechanismus auf die kombinierte Radiochemotherapie darstellen könnte, und ob eine gemeinsame Inhibition des EGFR und des IGF-IR zu einer Verbesserungsmöglichkeit für die 5-Fluoruracil-basierte Radiochemotherapie führen könnte
- 3) Aufklärung des *crosstalk*-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR
- 4) Untersuchung des Einflusses des PDGFR- β in kolorektalen Karzinomzellen

1) Nicht alle Patienten profitieren im selben Maße von einer kombinierten Radiochemotherapie. So existieren auf der einen Seite Patienten, die optimal auf die Therapie ansprechen (*responder*) und andererseits gibt es Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen (*non-responder*). Um die molekularen Ursachen für das unterschiedliche Ansprechverhalten zu untersuchen, sollten zunächst primäre Zelllinien aus Rektumkarzinombiopsien generiert werden. Diese Zelllinien sollten anhand der klinischen Patientendaten in *responder*- und *non-responder*-Zelltypen eingeteilt und hinsichtlich molekularer Unterschiede analysiert werden (Abbildung 1.4).

Zu 2) Sowohl die Inhibition des EGFR wie auch des IGF-IR werden mittlerweile als Therapieoption bei der Behandlung von Tumoren eingesetzt. Aufgrund der großen Bedeutung von Rezeptortyrosinkinasen beim kolorektalen Karzinom hat unsere Arbeitsgruppe den Einfluss des EGFR und des IGF-IR auf kolorektale Karzinomzellen näher analysiert. Die Inhibition der Expression bzw. der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR und des IGF-IR in kolorektalen Tumorzelllinien führt zu einer verminderten Proliferationsrate und zu einem vermehrten Absterben der Zellen. Diese Effekte waren bei gleichzeitiger Inhibition des EGFR und des IGF-IR deutlich stärker ausgeprägt. Außerdem konnte ein *crosstalk* zwischen den beiden Rezeptoren nachgewiesen werden (Kaulfuss *et al.*, 2009). Dies führte zu der Hypothese, dass die Interaktion des EGFR mit dem IGF-IR einen möglichen Resistenzmechanismus gegen die Radiochemotherapie darstellen könnte. Um dies zu

überprüfen und um zu analysieren, ob die kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR einen Therapienutzen aufweist, sollte der Einfluss der Inhibition der Rezeptoren auf die Radiochemotherapie *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Dafür sollte die Überlebensrate verschiedener kolorektaler Karzinomzelllinien nach einer kombinierten Radiochemotherapie mit zusätzlicher Inhibition des EGFR, des IGF-IR oder beider Rezeptoren gemeinsam bestimmt werden. Der Einfluss der kombinierten Radiochemotherapie und der Rezeptorinhibition *in vivo* sollte mit Hilfe von Xenografttumoren der verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien untersucht werden. Dafür sollte das Progressionsverhalten der Tumore während und nach der Therapie bestimmt werden.

3) Die Analysen der nachfolgenden Signalwege nach der Inhibition des EGFR und des IGF-IR in kolorektalen Karzinomzellen zeigten, dass die Stimulation des IGF-IR mit IGF-I nur dann zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs führte, wenn der EGFR in der Zelle anwesend und funktionsfähig war. Eine Stimulierung des EGFR war in diesem Fall nicht notwendig (Kaufuss *et al.*, 2009). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, den Mechanismus dieses *crossstalks* aufzuklären. Da beide Rezeptoren in der Lage sind, Hybridrezeptoren mit ihren jeweiligen Familienmitgliedern zu bilden, sollte zunächst überprüft werden, ob es auch zu Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR kommen kann. Um das Vorhandensein von Hybridrezeptoren nachzuweisen, sollte eine Co-Immunpräzipitation an Zelllysaten verschiedener kolorektaler Karzinomzelllinien durchgeführt werden. Um die Hybridrezeptoren auch auf zellulärer Ebene nachweisen zu können, sollte als zweite unabhängige Methode der *Proximity Ligation Assay* (PLA) etabliert und verwendet werden. Dieser auf immunhistochemischen Methoden beruhende Assay erlaubt es, Proteininteraktionen auch in der Zelle visuell darzustellen. Desweiteren sollte untersucht werden, ob die Inhibition der Rezeptoren mit Antikörpern oder *small molecule*-Inhibitoren einen Einfluss auf eine Hybridbildung ausübt.

4) Aufgrund der Erkenntnisse zur Bedeutung des EGFR und des IGF-IR im kolorektalen Karzinom sollte der Einfluss weiterer Rezeptortyrosinkinasen untersucht werden. Ein vielversprechender Kandidat ist hierbei der PDGFR- β , da Interaktionen des PDGFR- β sowohl mit dem EGFR als auch mit dem IGF-IR nachgewiesen werden konnten (DeAngelis *et al.*, 1995, Perrone *et al.*, 2009). Zunächst war es das Ziel, den Einfluss des PDGFR- β im kolorektalen Karzinom zu untersuchen. Dazu sollte die Expression des PDGFR- β in verschiedenen kolorektalen Tumorzelllinien untersucht werden. Anschließend sollte der Einfluss der Inhibition des PDGFR- β auf die Proliferationsrate und das Überleben der Karzinomzellen sowie der Mechanismus hinter etwaigen Veränderungen analysiert werden. Der PDGFR- β sollte mit Hilfe von siRNAs oder eines spezifischen *small molecule*-Inhibitors in kolorektalen Karzinomzellen blockiert werden. Daran anschließend sollten

Proliferationsassays und Zytotoxizitätstests an den behandelten Karzinomzellen durchgeführt werden. Weiterhin sollte mittels Western Blot-Experimenten untersucht werden, ob die Inhibition des PDGFR- β zu einer verminderten Aktivierung der nachfolgenden Signalwege in den Karzinomzellen führt. Außerdem sollten durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen in den behandelten Karzinomzellen durchgeführt werden.

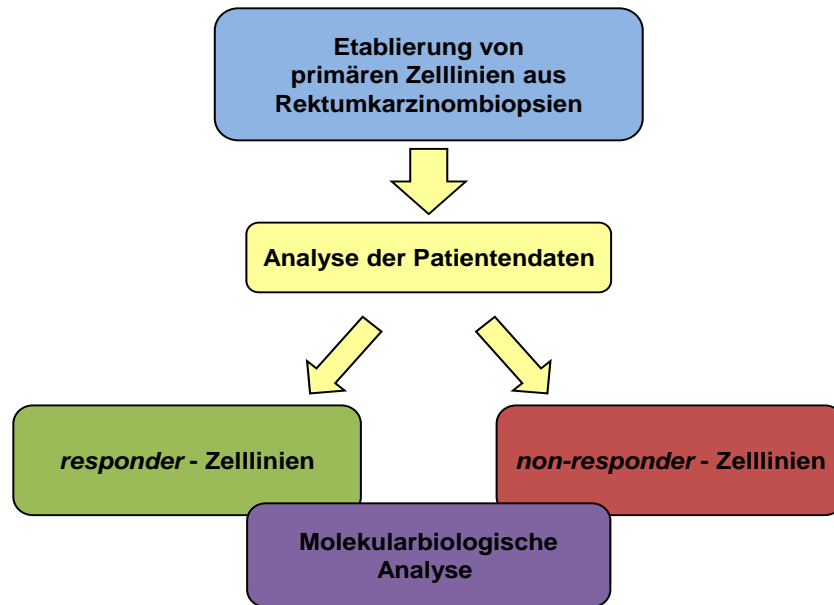


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Analyse der molekularen Ursachen der Resistenz von primären kolorektalen Karzinomzellen gegenüber der Radiochemotherapie.

Um die molekularen Mechanismen, die für die Resistenzentwicklung gegenüber der Radiochemotherapie verantwortlich sind, zu untersuchen, sollten zunächst primäre Zelllinien aus Rektumkarzinombiopsien generiert werden. Anhand der zugehörigen Patientendaten sollten diese Karzinomzelllinien dann in sogenannte *responder*- und *non-responder*-Zelllinien eingeteilt werden. Anschließend sollten diese molekularbiologisch analysiert werden, um Unterschiede zwischen den Karzinomzelllinien aufzuzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle nicht aufgeführten Substanzen wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Chemikalie	Hersteller
5-Fluoruracil	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose	Life Technologies, Darmstadt
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Colcemidlösung	Biochrom KG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
dNTPs (100mM)	Life Technologies, Darmstadt
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (DPBS)	PAN, Aidenbach
Erlotinib	Roche, Mannheim
Ethanol	Chemie Vertrieb Hannover, Hannover
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eukitt	O.Kindler GmbH, Freiburg
Formaldehyde	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck Millipore, Darmstadt
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Igepal CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NuPAGE™ MES Running buffer (20x)	Life Technologies, Darmstadt
NuPAGE™ LDS Sample buffer (4x)	Life Technologies, Darmstadt
NuPAGE™ See Blue Plus2	Life Technologies, Darmstadt
NVP-AEW541	Novartis, Nürnberg
OligoFectamine	Life Technologies, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
Opti-MEM	Life Technologies, Darmstadt
PDGFR <i>Tyrosine Kinase Inhibitor V</i> (Ki11502)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAN, Aidenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase-Inhibitor	MBI, St. Leon-Rot
Roticlear	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti [®] -Nanoquant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	PAN, Aidenbach
Trypsinlösung 2,5% (w/v)	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Merck, Darmstadt
VectaShield mit DAPI	VectorLab, Burlingame, USA
Zellkulturmedien	PAN, Aidenbach; Life Technologies GmbH Darmstadt
Zitronensäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.2 Biochemikalien und Enzyme

Biochemikalie	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Collagenase Typ IV	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNAse I	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (SeraPlus)	PAN, Aidenbach
Fibronectinlösung	Life Technologies, Darmstadt
Mango <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Matrigel [™]	BD Bioscience, San Jose, USA
MEM Non-essential Amino Acid Solution (MEM-NEAA)	Life Technologies, Darmstadt
Nu-Serum [™]	BD Bioscience, San Jose, USA
Phalloidin, FITC-markiert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reverse Transkriptase SuperScript II	Life Technologies, Darmstadt

Biochemikalie	Hersteller
RNase A	AppliChem GmbH, Darmstadt
T4 DNA Ligase	Life Technologies, Darmstadt

2.3 Gebrauchswaren

Gebrauchsware	Hersteller
6-, 12-, 24- oder 96-well-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nürnberg Corning Inc., New York, USA
384-well-Platten, weiß	ABgene, Hamburg
Blottingpapier GB 002, 003, 004	Schleicher & Schüll, Dassel
Deckgläser 24x60mm	Menzel Gläser, Braunschweig
Einmalkanülen (Sterican®)	Braun Melsungen AG, Melsungen
FALCON culture slides	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
flachbödige 96well-Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neubauer improved Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gele	Life Technologies, Darmstadt
Objektträger Superfrost® Plus	Schütt, Göttingen
Petrischalen	Greiner Nunc., Nürtingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
PVDF-Membran	GE Healthcare, München
Quarz-Küvetten	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter (Minisart®)	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg

2.4 Geräte

Aufgeführt sind Geräte für spezielle Anwendungen aus dem Institut für Humangenetik, der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie und der Universitätsklinik Göttingen.

Gerät	Hersteller
FACSCalibur™	BD Bioscience, San Jose, USA
FluorChem® Q	Alpha Innotech, Logan, Utah, USA
HT7900 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt

Gerät	Hersteller
Konfokales Laser-scanning-Mikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Synergy Mx	Bio Tek, Bad Friedrichshall
Irradiation device 225A	Gulmay medical, Camberley, England

2.5 Sterilisationsverfahren

Gebrauchswaren, Lösungen und Kulturmedien wurden bei 121°C und 1,5 Bar autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert.

2.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller
CellTiter 96 [®] AQueous Non-Radioactive Proliferation Assay (MTS)	Promega, Mannheim
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Cytotoxicity Detection Kit plus (LDH)	Roche, Mannheim
Duolink Proximity Ligation Assay	Olink Bioscience, Uppsala, Sweden
ECL Plus	GE Healthcare, Freiburg
Myco Alert [®] Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Köln
PathScan [®] RTK Signaling Antibody Array Kit (Fluorescent Readout)	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main
peqGold Total RNA Kit	PeqLab, Erlangen
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	Roche, Mannheim
Pierce Co-Immunoprecipitation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
Zeba [™] Spin Desalting Columns, 7K MWCO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.7 Lösungen

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook et al., (1989) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäß in bidestilliertem oder DEPC- behandeltem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder steril filtriert.

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Blockpuffer I (Western Blot)	1x TBS-Tween 5% Magermilchpulver
Blockpuffer II (Immunhistochemie)	1x PBS 3% BSA
Citratpuffer	1,8µM Zitronensäure 8,2µM Natriumcitrat
Formalin-Lösung 4%	12mM Na ₂ HPO ₄ 55mM NaH ₂ PO ₄ 4% Formaldehyd
Lysispuffer I für Proteine (modified RIPA)	150mM NaCl 1mM EDTA 50mM Tris-HCl, pH 7.4 1% NP-40 0,25% Natriumdeoxycholat Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail 1% PhosSTOP Phosphatase Inhibitor
10x PBS	1,37M NaCl 81mM Na ₂ HPO ₄ 27mM KCl 14,7mM KH ₂ PO ₄
10x TBS	1,37M NaCl 100mM Tris mit HCl auf pH 7.6
1x TBS-Tween (TBS-T)	1x TBS 0,1% Tween 20
Transferpuffer IIa (Western Blot)	25mM Tris pH 8.3 150mM Glycin 20% Methanol
20x Turbo-Puffer	0,2M NaOH mit festem H ₃ BO ₃ auf pH 8.0
Waschlösung I (Western Blot)	1x TBS-Tween 2,5% Magermilchpulver

2.8 Medien für eukaryotische Zellkulturen

Alle für die Zellkultur verwendeten Medien wurden von den Firmen PAN (Aidenbach) und Life Technologies (Darmstadt) bezogen.

Zelllinie	Zusammensetzung des Mediums
Caco-2	MEM 20% FKS 1,2% Pen/Strep
DLD-1	RPMI 1640 10% FKS 1,2% Pen/Strep
SW480	RPMI 1640 10% FKS 1,2% Pen/Strep
SW837	RPMI 1640 10% FKS 1,2% Pen/Strep
MRC-5	DMEM 10% FKS 1,2% Pen/Strep
Primärzellen (Standardmedium)	Advanced DMEM 8% Nu-Serum 10% FKS 80 µg/ml Gentamycin 1% Glutamin

Zur Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurde das entsprechende Medium mit 10% DMSO versetzt.

2.9 Biologisches Material

2.9.1 Eukaryotische Zelllinien

DLD-1 Humane, kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC, Rockville, USA

Caco-2 Humane, kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC, Rockville, USA

SW480	Humane, kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie, generiert aus einer Lymphknotenmetastase, ATCC, Rockville, USA
SW837	Humane, rektale Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC, Rockville, USA
MRC-5	Humane Lungenfibroblasten-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Frau M. Rave-Fränk, Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen

2.9.2 Mausstämme und Genehmigung der Tierversuche

Alle *in vivo*-Untersuchungen wurden nach § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt.

Genehmigung für die subkutane Injektion von primären Rektumkarzinomzellen:

33.9-42502-04-10/0110

Genehmigung für die Behandlung von Xenografttumoren mittels Radiochemotherapie:

33.9-42502-04-11/0469

Die immundefizienten Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. R. Dressel (Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie Georg-August-Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt oder bei der Firma Charles River Laboratories International Inc, (Wilmington, USA) bzw. bei The Jackson Laboratory (Maine, USA) käuflich erworben. Die Tiere wurden unter sterilen Bedingungen mit einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22°C und 55 ± 5% relativer Luftfeuchtigkeit im Tierstall des Instituts für Humangenetik bzw. des Universitätsklinikums Göttingen gehalten. Das Tierfutter wurde von der Firma ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen. Futter und Trinkwasser wurden vor der Verwendung autoklaviert.

Mausstamm	Genauere Bezeichnung
Fox Chase SCID® Mouse	CB17/Icr-Prkdc ^{scid} /IcrCrl
Fox Chase SCID® Beige Mouse	CB17.Cg-Prkdc ^{scid} Lyst ^{bg-J} /Crl
JAX Rag1	B6.129S7-Rag1 ^{tm1Mom} /J
NU/NU	Crl:NU-Foxn1 ^{nu}

2.9.3 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Die für die PCR, die cDNA-Synthese und die quantitative *real time* PCR verwendeten synthetischen Primer wurden von der Firma Eurofins MWG (Huntsville, USA) bezogen.

Porphobilinogen Deaminase (PBGD)

PBGD Fw 5'-GCAATGCGGCTGCAACGGCGGAAG-3'
 PBGD Rev 5'-CCTGTGGTGGACATAGCAATGATT-3'

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

GAPDH-Fw 5'-CCA GCA AGA GCA CAA GAG GAA GAG-3'
 GAPDH-Rev 5'-AGC ACA GGG ATA CTT TAT TAG ATG-3'

TATA-Bindeprotein (TBP)

TBP Fw 5'-AGCCTGCCACCTTACGCTCAG-3'
 TBP Rev 5'-TGCTGCCTTTGTTGCTCTTCCA-3'

Platelet-derived Growth Factor Receptor β (PDGFR- β)

hPDGFRB-Q1-Fw 5'-AGCATCTTCAACAGCCTCTACACC-3'
 hPDGFRB-Q1-Rev 5'-TCAAACCTTCTCTTCCCAGCACTTC-3'
 PDGFRB-Q6-Fw 5'-CAGCAATGCTCTGCCCGTTGGGCT-3'
 PDGFRB-Q6-Rev 5'-GCAGGTCCTCTCAGGGGCAGAGGG-3'

v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (c-KIT)

CKIT-Q4-Fw 5'-TGCACTTGGGCGAGAGCTGGAACG-3'
 CKIT-Q4-Rev 5'-ACAGCCTAATCTCGTCGCCACGC-3'
 CKIT-Q5-Fw 5'-CTCGCGGCGCCTGGGATTTTCTCT-3'
 CKIT-Q5-Rev 5'-CTAATCTCGTCGCCACGCGGACT-3'
 CKIT-Q7-Fw 5'-CCGAAGGAGGCACTTACACATTCCT-3'
 CKIT-Q7-Rev 5'-AGAGCATCTCTGCTCAGTTCCTGGAC-3'
 CKIT-Q11-Fw 5'-CTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATG-3'
 CKIT-Q11-Rev 5'-AACTCAGCCTGTTCTGGGAACTCC-3'

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

hEGFR-Q1-Fw 5'-CAATAACTGTGAGGTGGTCCTTGG-3'
 hEGFR-Q1-Rev 5'-CTCCTTCAGTCCGGTTTTATTTGC-3'
 hEGFR-Q2-Fw 5'-AGGCACGAGTAACAAGCTCAC-3'
 hEGFR-Q2-Rev 5'-CAATGAGGACATAACCAGCCAC-3'

Insulin-like Growth Factor Receptor I (IGF₁IR)

hIGF-IR-Q3-Fw 5'-GAGAACCCCAAGACTGAGGTGTGT-3'
 hIGF-IR-Q3-Rev 5'-GGTCGGTGATGTTGTAGGTGTCTG-3'
 hIGF-IR-Q4-Fw 5'-AAGGGGACATAAACACCAGGAACA-3'
 hIGF-IR-Q4-Rev 5'-CCTGCCCATCATACTCTGTGACAT-3'

fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3)

FLT3-Q1-Fw 5'-CCAGCTGCCGCTGCTCGTTGTTTTT-3'
 FLT3-Q1-Rec 5'-TCTGGGGTCTCAACGCACACCCGA-3'

colony stimulating factor 1 (MCSF)

MCSF-Q1-Fw 5'-TGGGCAATGGCAGCGTGGAAATGGG-3'
 MCSF-Q1-Rev 5'-AGGGCCGGGCAGGGTCTTTGACAT-3'

2.9.4 Synthetische RNA-Oligonukleotide

Die verwendeten *small interfering* RNAs wurden von der Firma Life Technologies (Darmstadt) erworben.

Luciferase

Zielsequenz 5'-CGUACGCGGAAUACUUCG ATT-3'
 Erster Strang 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGATT-3'
 Zweiter Strang 5'-GCAUGCGCCUUAUGAAGCUAA-3'

Humanes PDGFR-β 37

Zielsequenz 5'-UGUAGAGGCUGUUGAAGAUGCUCUC-3'
 Erster Strang 5'-UGUAGAGGCUGUUGAAGAUGCUCUC-3'
 Zweiter Strang 5'-GAGAACAGCAUCUUCAACAGCCUCUACA-3'

Humanes PDGFR-β 58

Zielsequenz 5'-UUCCCGAUCACAAUGCACAUGAGGG-3'
 Erster Strang 5'-UUCCCGAUCACAAUGCACAUGAGGG-3'
 Zweiter Strang 5'-CCCUCAUGUGCAUUGUGAUCGGGAA-3'

Humanes PDGFR-β 60

Zielsequenz 5'-CGGAAGCAGAGGGAUAGCUUCCUGUA-3'
 Erster Strang 5'-CGGAAGCAGAGGGAUAGCUUCCUGUA-3'
 Zweiter Strang 5'-UACAGGAAGCUAUCCUCUGCUUCCG-3'

Humanes c-Kit 20

Zielsequenz 5'-CCUGCAGCGAUAGUACUAAUGAGUA-3'
 Erster Strang 5'-CCUGCAGCGAUAGUACUAAUGAGUA-3'
 Zweiter Strang 5'-UACUCAUUAGUACUAUCGCUGCAGG-3'

Humanes c-Kit 21

Zielsequenz 5'-CAUGGACAUGAAACCUGGAGUUUCU-3'
 Erster Strang 5'-CAUGGACAUGAAACCUGGAGUUUCU-3'
 Zweiter Strang 5'-AGAAACUCCAGGUUUCAUGUCCAUG-3'

Humanes c-Kit 22

Zielsequenz 5'-CCAGAGACAUCAAGAAUGAUUCUAA-3'
 Erster Strang 5'-CCAGAGACAUCAAGAAUGAUUCUAA-3'
 Zweiter Strang 5'-UUAGAAUCAUUCUUGAUGUCUCUGG-3'

Humanes c-Kit 6

Zielsequenz	5'-CUCGCACCUUCCAAAGUUA-3'
Erster Strang	5'-CUCGCACCUUCCAAAGUUA-3'
Zweiter Strang	5'-UUAACUUUGGAAAGGUGCGAG-3'

2.9.5 Antikörper**2.9.5.1 Therapeutische Antikörper**

Antikörper	Hersteller
Cetuximab	Merck, Darmstadt
Mab391	R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA

2.9.5.2 Primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller
AKT, monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main
c-Kit, monoklonaler Antikörper, Maus	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main
ERK, monoklonaler Antikörper, Maus	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main
EGFR, polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Santa cruz Biotechnology, California, USA
IGF-IR, monoklonaler Antikörper, Maus	Abcam, Milton, GB
IGF-IR, polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Santa cruz Biotechnology, California, USA
PDGFR β , monoklonaler Antikörper, Maus	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main
Vimentin monoklonaler Antikörper, Maus	Ventana [®] Roche, Mannheim
EpCAM monoklonaler Antikörper, Maus	Ventana [®] Roche, Mannheim
α -Tubulin, monoklonaler Antikörper, Maus	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
p-AKT, monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main
p-ERK, monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main
pSRC, monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main
SRC, monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling Technology [®] , Frankfurt am Main

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti Maus IgG (H+L) HRP (<i>horse radish peroxidase</i>) konjugiert, Kaninchen	Dianova, Hamburg, Jackson ImmunoResearch
Anti Kaninchen IgG (H+L) HRP konjugiert, Ziege	Dianova, Hamburg, Jackson ImmunoResearch

2.10 Datenbanken

Protein- und cDNA-Sequenzen
Bioinformatik

Ensembl v32 (<http://www.ensembl.org/>)
National Center for Biotechnology
Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)

Auswahl von Oligonukleotiden

Primer-BLAST
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)

2.11 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen und anschließende Konzentrationsbestimmung

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kits der Firma PEQLAB (Erlangen). Zunächst wurden die Zellen mit DPBS gewaschen. Dann wurde das DPBS abgenommen und der RNA-Lysepuffer direkt auf die Zellen gegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Die aufgereinigte RNA wurde bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf, Hamburg). Dafür wurde das Absorptionsmaximum bei 260nm bestimmt und gleichzeitig die Verunreinigung durch Proteine (bei 280nm) und Salze (bei 320nm) ermittelt. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte über das Lambert'sche Gesetz.

2.12 Reverse Transkription

Um mRNA in cDNA umzuschreiben, wurde die Reverse Transkriptase (RT)-PCR verwendet. Hierbei paaren oligo(dT)-Primer mit den Poly(A)-Sequenzen der mRNA, was der Reversen Transkriptase die Möglichkeit gibt, den cDNA-Strang komplementär zur mRNA zu synthetisieren.

10µl RT-PCR-Ansatz:

2-5µg RNA

0,5µl oligo(dT)-Primer (0,5µg/µl)

0,5µl dNTPs (10nM)

ad 6µl H₂O

➤ 65°C für 10min Inkubation

2µl 5X First Strand buffer

1µl DTT (0,1M)

➤ 42°C für 2min Inkubation

0,25µl SuperScript II (Reverse Transkriptase)

0,75µl H₂O

➤ 42°C für 50min reverse Transkription

➤ 70°C für 15min Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase

Die synthetisierte cDNA wurde anschließend mit 10µl H₂O verdünnt und bei 4°C gelagert. Um zu überprüfen, ob die reverse Transkription erfolgreich war, wurde eine Standard-PCR mit Primern für das sog. *housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt.

2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich spezifische DNA-Fragmente *in vitro* amplifizieren. Dabei wird zunächst die doppelsträngige DNA mittels hoher Temperaturen denaturiert. Die anschließende Absenkung der Temperatur ermöglicht es, dass spezifische Oligonukleotide (Primer) an die DNA binden können (sog. Annealing). Eine DNA-Polymerase kann dann diese Oligonukleotide komplementär zur Matrizen-DNA verlängern (sog. Elongation). Durch die Wiederholung dieses Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird das DNA-Fragment exponentiell vermehrt.

2.13.1 Standard-PCR

Mittels der Standard-PCR wurde in dieser Arbeit der Erfolg der cDNA-Synthese nach der Reverse Transkriptase-PCR überprüft (siehe 3.12). Zur Kontrolle wurden neben der zu überprüfenden Probe stets eine Positivkontrolle (positiv getestete cDNA) und eine Negativkontrolle (H₂O) mitgeführt.

25µl PCR-Ansatz:

0,5µl cDNA
 5µl 5X Puffer
 2µl dNTPs (2mM)
 Je 0,5µl FW-/ Rev-Primer (Konz.)
 0,75µl MgCl₂ (50mM)
 0,5µl Mango Taq DNA-Polymerase (1U/µl)
 14,25µl H₂O

Der Ansatz wurde in einem Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

	95°C	2min	Initiale Denaturierung	
35x	{	95°C	30sec	Denaturierung
		60°C	30sec	Annealing
		72°C	30sec	Elongation
		72°C	5min	Finale Elongation
	8°C	∞	Aufbewahrung	

Mit der Gelelektrophorese (2.14) wurde anschließend die Anwesenheit des DNA-Fragments überprüft.

2.13.2 Quantitative *real time* PCR-Analysen

Die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) bezeichnet ein PCR-Verfahren, bei dem während der PCR die Zunahme der entstehenden Produkte in Echtzeit gemessen wird und die eine relative Quantifizierung der in den Zellen vorhandenen verschiedenen mRNAs erlaubt.

Die Messung der Produktzunahme wird durch einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht, der nur an doppelsträngige DNA bindet. Nach jedem PCR-Zyklus wird das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Stärke des Signals korreliert hierbei mit der Menge an PCR-Produkt. In der exponentiellen Phase der Reaktion, in der die volle Aktivität der Polymerase vorherrscht und genügend Materialien (Primer, MgCl₂) vorliegen, wird der sog. *threshold*-Wert bestimmt und anhand des PCR-Zyklus, in dem dieser erreicht wird, werden die anschließenden Berechnungen zur Quantifizierung vorgenommen (Ct-Wert).

In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR verwendet, um die relative Expression verschiedener mRNAs zu untersuchen. Die cDNA wurde zunächst 1:20 mit H₂O verdünnt. Für die qRT-PCR wurden der PCR-Mastermix Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with Rox (Life

Technologies, Darmstadt) und der qRT-PCR-Thermocycler ABI Prism 7900HT Sequence Detection Systems verwendet.

10µl Ansatz:

2,5µl cDNA
 2,5µl Primer (Fw + Rev je 100pmol/µl)
 5,0µl SYBR Green

Der Ansatz wurde wie folgt inkubiert:

	50°C	2min	Initiale Denaturierung	
	95°C	3min	Aktivierung der Taq-Polymerase	
40x	}	94°C	15sec	Denaturierung
		60°C	30sec	Annealing
		72°C	30sec	Elongation
		95°C	15sec	Finale Elongation
		60°C	15sec	
	60-95°C	2°C/min	Schmelzkurve	

Nach der Messung wurden die Daten mit Hilfe des SDS-Programms (SDS Version 2.1, PE Applied Biosystems) ausgewertet und für weitere Berechnungen in Excel (Microsoft) exportiert.

Für die Untersuchungen an cDNA wurde die relative Expression mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bestimmt. Hierzu wurden folgende Formeln verwendet:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{GOI}) - \text{Ct} (\text{HKG})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{CTR}) - \Delta\text{Ct} (\text{SOI})$$

$$\text{relative expression} = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$$

GOI = gene of interest; HKG = housekeeping-Gene; CTR = control; SOI = sample of interest

Die mRNA-Expression der *housekeeping*-Gene TBP (TATA-Bindeprotein) und PBGD (*porphobilinogen deaminase*) wurden hierbei zur Normalisierung verwendet.

2.14 Gelelektrophorese von DNA

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Der Agaroseanteil der Gele lag bei 0,7% (w/v). Zunächst wurde die Agarose durch Kochen in 1X Turbo-Puffer gelöst. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente wurde der Lösung dann DNA Stain G (Serva, Heidelberg) zugesetzt und diese in den Gelträger überführt. Nach der vollständigen Aushärtung des Gels wurde dieses mit 1X Turbo-Puffer überschichtet. Neben den Proben wurde ein Längenstandard (1kb DNA-*ladder*, Life Technologies, Darmstadt) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 200V und einer max. Stromstärke von 200mA durchgeführt.

2.15 Proteinchemische Methoden

2.15.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen

Für die Isolierung des Gesamtproteins wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen. Dann wurde pro 6-*well* 150µl oder pro 25cm²-Kulturflasche 400µl Lysepuffer I zugegeben. Nach dem Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß wurde der Ansatz in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 16000xg für 10min und 4°C entfernt. Der die Zellproteine enthaltende Überstand wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration ermittelt (siehe 3.15.2). Das Lysat wurde in geeigneten Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Eine Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

2.15.2 Konzentrationsbestimmung von Protein nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford mit Hilfe der Roti[®]-Nanoquant-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) bestimmt. Hierbei bindet der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau in saurer Lösung an Proteine, was mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 495nm auf 595nm einhergeht. Zunächst wurde mittels einer Standardreihe mit einem Proteinstandard eine Eichgerade extrapoliert. Die zu messenden Proteinlösungen wurden 1:100 verdünnt und jeweils 50µl der Verdünnung mit 200µl der 1X Roti[®]-Nanoquant-Lösung in einem *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte gemischt. Nach 5min Inkubationszeit wurde die Extinktion der Lösung bei 480/595nm mit dem Plattenlesegerätes SynergyMx (BioTek, Friedrichshall) bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der Eichgeraden mittels des dazugehörigen PC-Programms Gene5 bestimmt.

2.15.3 Western Blot-Analyse von Proteinen

2.15.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit Hilfe des NuPAGE®-Systems der Firma Life Technologies (Darmstadt) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Technik können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Proteinproben wurden zunächst mit $\frac{1}{4}$ Volumen des Probenpuffers (LDS Sample Buffer) mit 10% DTT gemischt und 10min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel überführt. Als Größenstandard wurde der gefärbte Marker NuPAGE® See Blue Plus2 (Life Technologies, Darmstadt) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Molekulargewicht des untersuchten Proteins bei 160V und 160mA für 1-2h in MES-Puffer.

2.15.3.2 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit einem semi-dry Blot auf PDVF-Membranen übertragen. Hierfür wurde eine auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnittene PVDF-Membran für 10sek in 100% Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer IIa 10min äquilibriert. Für den Aufbau des Blots wurden drei auf Membrangröße zurechtgeschnittene und in Transferpuffer IIa getränkte Whatman-Filter auf die Anode eines Elektrobloppers (Biometra, Göttingen) gelegt. Darauf wurden zunächst die PDVF-Membran und dann das Polyacrylamidgel platziert. Als Abschluss wurden weitere drei mit Transferpuffer IIa getränkte Whatman-Filter aufgelegt und der Blotter mit der Kathode geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei 25V und 220mA für 1,5h.

2.15.3.3 Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die PDVF-Membran nach dem Proteintransfer zunächst 1h in Blockpuffer I bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrfach in TBS-T geschwenkt. Die Inkubation mit dem in TBS-T verdünnten primären Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 2.1) erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran zweimal für 15min mit Waschlösung I gewaschen und mit in Blockpuffer I verdünntem Sekundärantikörper in der Konzentration von 1:10000 für 2h bei RT inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal 15min in Waschlösung I und 5min in TBS-T gewaschen. Abschließend wurde die Detektionslösung ECL Prime (GE Healthcare, Freiburg) frisch angesetzt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die Signale wurden dann mit dem Detektionsgerät FluorChem® Q. (Alpha Innotech, Logan, USA) aufgenommen.

Tabelle 2.1 Übersicht der Verdünnungen der verwendeten primären Antikörper bei der Western Blot-Analyse

Antikörper	Verdünnung
AKT	1:4000
cKIT	1:2000
Cyclin B1	1:2000
EGFR	1:4000
ERK	1:4000
IGF-IR	1:4000
PDGFR- β	1:2000
p-AKT	1:4000
p-ERK	1:4000
p-SRC	1:4000
SRC	1:4000
α -Tubulin	1:20000

2.15.4 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Mit Hilfe eines primären Antikörpers, der durch Protein A/G an ein festes Substrat (z.B. Agarose- / Sepharosekügelchen die sogenannten *beads*) gebunden ist, wird zunächst ein spezifisches Protein aus dem zu untersuchenden Proteinlysate aufgereinigt. Im Falle einer Komplexbildung wird dadurch auch das gebundene Protein mit aufgereinigt und kann mittels eines Western Blots nachgewiesen werden. Dafür müssen die aufgereinigten Proteine jedoch zuvor durch Kochen von den *beads* getrennt werden. Die *beads* können dann durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt werden. Durch das Kochen der Lösung werden jedoch auch die Antikörper in die einzelnen Ketten aufgetrennt. Diese verbleiben in der Lösung und können sich störend bei der Western Blot-Analyse auswirken. In dieser Arbeit wurde das *Co-Immunoprecipitation Kit* der Firma Pierce (vertrieben durch Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Hierbei erfolgt die Bindung des Antikörpers an die *beads* im Gegensatz zur klassischen Co-IP nicht durch Protein A/G. Die Agarose-*beads* des Kits tragen Aldehydgruppen, an die der primäre Antikörper über seine eigenen Aminogruppen spontan binden kann (Imin-Bindung). Durch die Behandlung mit Natriumcyanoborhydrid wird diese Bindung in eine stabilere sekundäre Aminbindung umgewandelt. Nach der Aufreinigung der zu untersuchenden Proteine werden diese mit Hilfe eines speziellen Elutionspuffers von den Antikörper-*bead*-Komplexen getrennt. Dadurch wird die Proteinlösung nicht durch Teile des Antikörpers oder Protein A/G verunreinigt.

Für die Co-IP wurden die Zellen in 75cm²-Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Nach Erreichen dieser Konfluenz wurden die Zellen 24h unter reduzierten Serumkonditionen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 10min mit 10ng/ml EGF und 10nM IGF1 stimuliert und nach Protokollangaben die Proteine isoliert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Bradford-Methode (2.15.2). Für die Co-IP wurden 2mg Protein eingesetzt. Die für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper (EGFR Sc03, monoklonaler Antikörper, Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology California, USA und IGF-IR 3C8B1, monoklonaler Antikörper, Maus, Abcam Milton, GB) wurden zunächst mit Hilfe der *Zeba™ Spin Desalting Columns* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben gereinigt. 10µg dieser Antikörper wurden dann für die IP eingesetzt. Die Durchführung der Co-IP erfolgte nach Herstellerangaben.

Für die Zelllinien wurde die Präzipitation sowohl für den EGFR als auch für den IGF-IR durchgeführt. Außerdem wurde als Kontrolle eine Präzipitationsreaktion mit sog. Kontroll-*beads* durchgeführt, die nicht mit einem Antikörper verbunden waren. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend zusammen mit nicht präzipitiertem Kontrolllysat mit Hilfe einer Western Blot-Analyse ausgewertet (2.15.3).

2.16 Duolink[®] II Proximity Ligation Assays (PLA)

Der *Proximity Ligation Assay* ist eine immuncytochemische Methode, die es erlaubt, Protein-Protein-Interaktionen direkt in der fixierten Zelle aufzuzeigen. Dafür werden zunächst die beiden zu untersuchenden Proteine jeweils mit einem spezifischen primären Antikörper markiert. Dabei ist es jedoch wichtig, dass die verwendeten Antikörper in verschiedenen Gattungen produziert wurden, damit die verwendeten sekundären Antikörper spezifisch nur an ein Ziel binden. Im nächsten Schritt werden die beiden primären Antikörper mit je einem spezifischen, mit einer einzelsträngigen DNA-Sequenz gekoppelten sekundären Antikörper markiert. Die DNA-Sequenzen der beiden sekundären Antikörper sind hierbei unterschiedlich (bezeichnet mit +/-). Mit Hilfe zweier DNA-Oligonukleotide, die in ihren terminalen Bereichen komplementär zu den DNA-Sequenzen der sekundären Antikörper sind, werden die beiden DNA-Sequenzen dann verbunden. Die Länge der verschiedenen DNA-Fragmente ist so gewählt, dass es nur dann zu einer Hybridisierung kommen kann, wenn die Proteine, an die die Antikörper gebunden haben, sehr nah (<40nm) nebeneinander vorliegen. Durch die Hybridisierung entsteht ein zum Teil doppelsträngiger DNA-Ring direkt bei den interagierenden Proteinen, der durch eine Ligasereaktion geschlossen wird. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase kann dann die Sequenz des DNA-Rings amplifiziert werden (*rolling circle PCR*). Anschließend wird diese DNA mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde, die gegen diese Sequenz gerichtet ist, markiert. So entsteht direkt neben den Proteinen ein

Fluoreszenzsignal, welches mit einem Fluoreszenzmikroskop detektierbar ist (Abbildung 2.1).

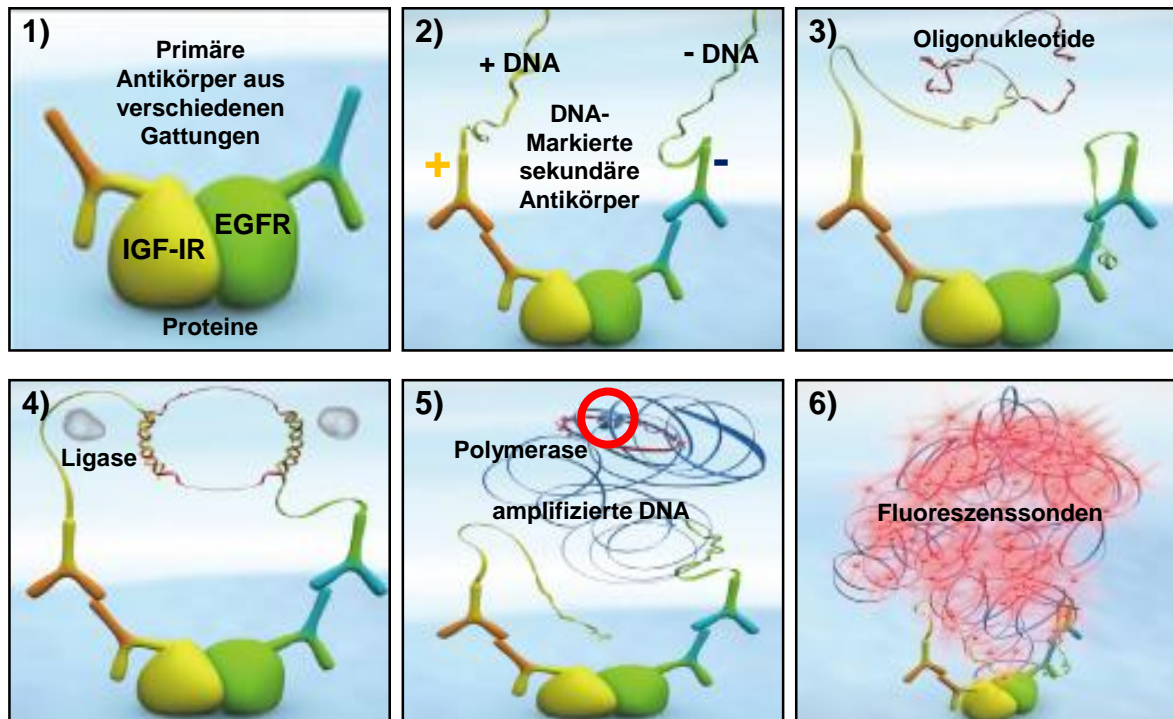


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des Duolink® II Proximity Ligation Assays.

1) Zunächst werden die Zielproteine mit primären Antikörpern aus verschiedenen Gattungen markiert. 2) Die primären Antikörper werden mit spezifischen, DNA-gekoppelten sekundären Antikörpern markiert. 3) Durch die Zugabe zweier DNA-Oligonukleotide, die in ihren terminalen Bereichen komplementär zu den DNA-Sequenzen der sekundären Antikörper sind, werden diese DNA-Sequenzen verbunden. 4) Mit einer Ligasereaktion wird der entstandene DNA-Ring geschlossen. 5) Mittels einer DNA-Polymerase wird die DNA-Sequenz des Rings amplifiziert. 6) Die Amplifizierte DNA wird mit einer fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde hybridisiert. Das Signal kann mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (modifiziert nach Duolink® II User Manual v. 2.1 2011, Olink Bioscience, Uppsala, Schweden).

2.16.1 PLA an Zelllinien

Für den PLA wurden zunächst entweder 4×10^4 Zellen pro Kammer auf einem 4-Kammer-Zellkulturobjektträger oder 2×10^2 Zellen pro Kammer auf einem 8-Kammer-Objektträger in Kulturmedium ausplattiert. Nach 24h wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und dann für weitere 24h mit serumreduziertem Medium (Kulturmedium ohne FKS) inkubiert. Anschließend wurden einige der Zellen für 2 oder 5min mit 10ng/ml EGF, 10nM IGF-I oder der Kombination stimuliert. Durch vorsichtiges Pipettieren wurde das Medium in der Kammer gemischt. Sollten der EGFR oder der IGF-IR inhibiert werden, dann wurden die Zellen 2h vor der Stimulation mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern (anti-EGFR: Cetuximab 5mg/ml, anti-IGF-IR: mAb391 5mg/ml) oder Tyrosinkinaseinhibitoren (EGFR-Inhibitor: Erlotinib 1µg/ml, IGF-IR-Inhibitor: AEW-541 1µM) behandelt.

Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit 4°C kaltem DPBS gewaschen und dann 20min in 3,7% Formaldehydlösung in DPBS bei RT fixiert. Nach 10min Waschen mit DPBS bei RT wurden die Zellen zur Permeabilisierung der Membran 10min mit 0,1% Triton X-100-Lösung in DPBS behandelt und erneut 10min in DPBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen 30min bei RT in DPBS mit 3% BSA inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper in entsprechender Konzentration in DPBS mit 3% BSA auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der verwendete monoklonale Antikörper EGFR Sc03 (Santa cruz Biotechnology California, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt, der monoklonale Antikörper IGF-IR 3C8B1 (Abcam Milton, GB) in einer Verdünnung von 1:2000.

Die Durchführung des PLA am folgenden Tag erfolgte dann nach Herstellerangaben. Um das Zytoskelett anzufärben wurden die Zellen vor dem letzten Waschschrift für 30min mit 0,5ng/ml FITC-Phalloidin in DPBS behandelt. Zum Schluss wurden die Objektträger unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur getrocknet, mit einer möglichst geringen Menge DAPI/Vectashield eingedeckelt und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die Objektträger wurden bei -20°C gelagert.

Die Auswertung des Assays erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM). Um die Anzahl der Heterodimere pro Zelle zu bestimmen, wurden mit dem LSM Bilder aufgenommen und auf diesen die Zellen und die detektierten Heterodimere ausgezählt. Die Auszählung der Heterodimere erfolgte dabei automatisch mit der Software AlphaView-FluorChem Q SA Version 3.2.2 der Firma Cell Biosciences (Santa Clara, USA).

2.16.2 PLA an Gewebeschnitten

Um den PLA an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten durchzuführen, wurden diese zunächst zweimal für 10min bei RT in Xylol deparaffiniert. Mit einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte anschließend rehydriert. Die Behandlung erfolgte wie folgt:

2x	100% Ethanol	5min
1x	98% Ethanol	5min
1x	95% Ethanol	5min
2x	70% Ethanol	5min
1x	H ₂ O	10min

Um die Bindungsstellen für die Antikörper zu demaskieren, wurden die Gewebeschnitte dann für 60min in Zitratpuffer in einem Dampfgarer (FS 20, Braun, Kronberg) inkubiert. Nachdem der Puffer abgekühlt war, wurden die Schnitte einmal 10min mit DPBS bei RT gewaschen.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen 30min bei RT in DPBS mit 3% BSA inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper in entsprechender Konzentration in DPBS mit 3% BSA auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der verwendete monoklonale Antikörper EGFR Sc03 (Santa cruz Biotechnology California, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt, der monoklonale Antikörper IGF-IR 3C8B1 (Abcam Milton, GB) in einer Verdünnung von 1:200.

Die weitere Behandlung erfolgte wie bereits unter 2.16.1 beschrieben.

2.17 Zellbiologische Methoden

2.17.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent und wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die jeweils verwendeten Nährmedien (siehe 2.8) wurden je nach Zelldichte alle zwei bis drei Tage gewechselt. Je nach Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal in der Woche geteilt. Dafür wurden die Zellen zunächst einmal mit DPBS gewaschen und anschließend in Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Kulturgefäß gelöst hatten und vereinzelt vorlagen, wurde die Zellsuspension je nach Zelldichte und Proliferationsrate im Verhältnis 1:5 bis 1:10 mit Kulturmedium verdünnt und wieder in Kultur gebracht.

2.17.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden 10µl der Suspension auf eine Neubauer *improved* Zählkammer gegeben. Unter einem Mikroskop wurden vier Felder der Kammer ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser Wert entsprach der Anzahl Zellen/0,1µl der Suspension.

2.17.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst bis zu einer Konfluenz von ca. 80% inkubiert und dann wie unter 3.11.1 beschrieben mittels Trypsin/EDTA in Suspension gebracht. Diese wurde dann mit Kulturmedium im Verhältnis 1:5 gemischt und die Zellen bei 1000rpm für 5min pelletiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium mit 10% DMSO resuspendiert und die Zellsuspension in spezielle 2ml-Kryogefäße überführt. Unter Verwendung der Einfrierhilfe Mr. Frosty (Thermo Scientific, Langenselbold) wurden die Zellen bei -80°C jeweils 1°C pro Minute heruntergekühlt bis eine Temperatur von -80°C

erreicht war. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Revitalisierung wurden die Zellen bei 37°C rasch aufgetaut und in die dreifache Menge, auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000rpm für 5min pelletiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und in Kulturgefäße überführt.

2.17.4 Überprüfung der Zellkultur auf Kontamination mit Mycoplasmen

Ungefähr einmal pro Monat wurden die eukaryotischen Zelllinien hinsichtlich einer Verunreinigung mit Mycoplasmen getestet. Hierfür wurde das MycoAlert® Mycoplasma Detektions Kits (Lonza, Köln) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Test basiert auf der Aktivitätsmessung von mycoplasmenspezifischen Enzymen durch ATP-Bestimmung vor und nach Zugabe eines spezifischen Substrats.

2.17.5 Transfektion eukaryotischer Zellen mit *small interfering* RNA (siRNA)

Für die Transfektion mit siRNA wurden 4×10^5 Zellen der jeweiligen Zelllinie in 25cm²-Kulturflaschen über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend mit 1ml Opti-MEM bedeckt. 12µl Oligofectamine und 78µl Opti-MEM wurden vermischt und 10min bei RT inkubiert. 10µl der jeweiligen (20 µM) siRNA wurden mit 400µl Opti-MEM gemischt, zum Oligofectamine-Gemisch gegeben und 20min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig auf die mit Opti-MEM bedeckten Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen dann mit normalem Kulturmedium weiterkultiviert oder für andere Analysen verwendet.

2.17.6 Bestimmung der Proliferationsrate mit Hilfe des CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)

Der CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay beruht darauf, dass schwach gefärbte Tetrazoliumsalze (MTS) von den aktiven Mitochondrien in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden. Die Messung der Farbintensität lässt dadurch Rückschlüsse auf die Zellproliferation zu.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proliferationsrate verschiedener Zelllinien nach siRNA-Transfektion oder der Behandlung mit einem Tyrosinkinaseinhibitor bestimmt. Für die Analysen der mit siRNA transfizierten Zellen wurden diese am Tag nach der Transfektion (2.17.5) mit Trypsin/EDTA vereinzelt (2.17.1), 3000 Zellen pro *well* in 100µl Kulturmedium in

einer flachbodigen 96-*well*-Platte ausplattiert. Nach Adhärenz der Zellen (2h) wurde der Assay für die Nullwertbestimmung nach Herstellerangaben durchgeführt. Weitere Messungen erfolgten dann im Abstand von jeweils 24h. Für die Analyse der Inhibitorbehandlung wurden 3000 nicht behandelte Zellen pro *well* in 50µl Kulturmedium in einer flachbodigen 96-*well*-Platte ausplattiert. Nach Adhärenz der Zellen (2h) wurden vorsichtig 50µl Kulturmedium mit dem Inhibitor in der entsprechenden Konzentration zugegeben und der Assay für die Nullwertbestimmung nach Herstellerangaben durchgeführt. Weitere Messungen erfolgten dann im Abstand von jeweils 24h. Für die Messung der Farbintensität wurde das Plattenphotometer Synergy Mx (Bio Tek, Bad Friedrichshall) verwendet.

2.17.7 Bestimmung der Todesrate mittels des LDH Cytotoxicity Assays (Roche)

Der LDH Cytotoxicity Assay (Roche, Mannheim) beruht darauf, dass sterbende Zellen Lactat-Dehydrogenase freisetzen. Diese katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Lactat, bei der NADH^+ entsteht. Die Menge an NADH^+ wird durch ein im Reagenz enthaltenes Salz in einer Farbreaktion dargestellt und kann gemessen werden. Die Stärke der Farbreaktion ist hierbei proportional zur Anzahl der sterbenden Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Absterben verschiedener Zelllinien nach siRNA-Transfektion oder der Behandlung mit einem Tyrosinkinaseinhibitor quantifiziert. Dafür wurden je 3000 siRNA-transfizierte oder nicht behandelte Zellen pro *well* in 100µl (siRNA) oder 50µl (Inhibitor) Kulturmedium in einer flachbodigen 96-*well*-Platte ausplattiert. Nach 24h wurde zu den mit Inhibitor zu behandelnden Zellen 50µl Kulturmedium mit der entsprechenden Konzentration des Inhibitors zugegeben. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Farbintensität wurde mit dem Plattenphotometer Synergy Mx (Bio Tek, Bad Friedrichshall) durchgeführt.

2.17.8 Bestimmung der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird dafür verwendet, in Zellpopulationen Zellen mit bestimmten Eigenschaften zu detektieren und zu quantifizieren. Bestimmt werden können Größe, Granularität und die Intensität eines Fluoreszenzsignals. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Zellzyklusstatus von verschiedenen behandelten Zellen untersucht werden. Dafür wurde die DNA der Zellen mit dem interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid gefärbt. Die Intensität des gemessenen Signals ist dabei proportional mit der DNA-Menge innerhalb der Zelle. Da Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen eine unterschiedliche Menge an DNA

besitzen, lässt sich so anhand der Signalstärke die Zellzyklusphase bestimmen, in der sich eine Zelle befindet.

Zunächst wurden 4×10^5 Zellen in normalem Kulturmedium in 25cm²-Kulturflaschen 24h inkubiert. Dann wurden die Zellen entweder mit siRNA transfiziert (2.17.5) oder es wurde der PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 in der entsprechenden Konzentration ins Medium gegeben. Nach weiteren 72h Inkubation wurde das Medium abgenommen und die darin enthaltenen Zellen 5min bei 200 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die adhärenen Zellen wurden mit EDTA/Trypsin vereinzelt (2.17.1) und dem Pellet der im Medium enthaltenen Zellen zugefügt. Die Zellsuspension wurde mit 10ml DPBS aufgefüllt, die Zellen erneut 5min bei 200 x g und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Nun wurde das Pellet in 1ml DPBS resuspendiert, in 10ml -20°C kalten Ethanol gegeben und mindestens 2h bei -20°C fixiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen 5min bei 200 x g und 4°C pelletiert. Dann wurden die Zellen in 10ml DPBS resuspendiert und erneut 5min bei 200 x g und 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 μ l DPBS mit 10 μ g/ml Propidiumiodid und 100 μ g/ml RNase A resuspendiert und 30min bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Zellen wurde dann von Prof. Dr. med. R. Dressel aus der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen in einem Durchflusszytometer (FACSCalibur™, BD Bioscience, San Jose, USA) durchgeführt. Dabei wurden für jede Fraktion 10^4 Zellen analysiert.

2.17.9 Analyse der Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und wichtiger nachfolgender Signalmoleküle mit dem PathScan® RTK Signaling Antibody Array Kit

In dieser Arbeit sollte die Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und wichtiger nachfolgender Signalmoleküle nach der Behandlung mit spezifischen siRNAs gegen den PDGFR- β bzw. cKIT oder nach der Behandlung mit dem Inhibitor Ki11502 untersucht werden. Der PathScan® RTK Signaling Antibody Array (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA) ist ein Antikörper basierter Array, bei dem auf einem mit Nitrozellulose beschichtetem Objektträger verschiedene primäre Antikörper aufgebracht sind. Im Falle einer Proteinbindung können diese mittels eines HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers detektiert werden. Die Signalstärke korreliert dabei mit der Menge des gebundenen Proteins.

Für die Analyse wurden jeweils 4×10^5 SW480-Zellen in 25cm²-Kulturflaschen 24h inkubiert. Die Zellen wurden entweder mit dem Inhibitor Ki11502 behandelt oder mit siRNA gegen PDGFR β , cKit oder der Kombination beider transfiziert (2.17.5). Jeweils 48h nach der

Behandlung wurden die Zellen für weitere 24h unter reduzierten Serumbedingungen inkubiert. Dann wurden die Zellen für 10min mit 10% FKS stimuliert und anschließend das Protein nach Herstellerangaben isoliert. Die Durchführung des Arrays erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Auswertung wurden mit Hilfe des Kamerasystems FluorChem® Q (Alpha Innotech, Logan, Utah, USA) Bilder der Fluoreszenz-Signale auf den Objektträgern gemacht und die Signalstärke gemessen.

2.18 Aufarbeitung und Prozessierung von prätherapeutischen Biopsien bzw. Resektatproben von Rektumkarzinomen

2.18.1 Mechanische Aufarbeitung der Gewebeproben

Die erhaltenen Gewebeproben wurden zunächst 10min bei RT in DPBS mit 1,2% Penicillin/Streptomycin und 100µg/ml Gentamycin inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit DPBS gewaschen. Dann wurden die Gewebeproben mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke von <3mm geschnitten. Um die Gewebestücke weiter zu dissoziieren, wurden diese je nach Menge in 1 bis 2ml 4°C kaltes DPBS überführt und mit einer 1ml-Injektionsspritze durch eine Reihe kleiner werdender Kanülen gezogen. Die Reihenfolge der Kanülen war wie folgt: G20 ø 0,9mm, G21 ø 0,8mm, G22 ø 0,7mm G23 ø 0,6mm und G24 ø 0,55mm. Anschließend wurden die Gewebestücke bei 300 x g und 4°C 10min pelletiert. Die Zellen wurden dann subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert bzw. direkt in die Zellkultur übernommen (siehe 2.18.3, 2.18.5).

2.18.2 Enzymatische Aufarbeitung der Gewebeproben

Die erhaltenen Gewebeproben wurden zunächst 10min bei RT in DPBS mit 1,2% Penicillin/Streptomycin und 100µg/ml Gentamycin inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit DPBS gewaschen und mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke von mindestens <3mm geschnitten. Für die enzymatische Aufarbeitung wurden die Gewebestücke je nach Menge für 30 bis 60min unter Rühren in 1 bis 3ml Medium 199 mit 50mg/ml Collagenase Typ IV, 50% Trypsin/EDTA und 1000U/ml DNase bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Proben bei 300 x g und 4°C für 10min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1ml kaltem PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Dies wurde zweimal wiederholt. Die Zellen wurden dann subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert bzw. direkt in die Zellkultur übernommen (siehe 2.18.3, 2.18.5).

2.18.3 Überführung der aufgearbeiteten Zellen in die Zellkultur

Um die mechanisch oder enzymatisch aufgearbeiteten Zellen in die Zellkultur zu übernehmen, wurde das Zellpellet (siehe 2.18.1, 2.18.2) je nach Zellmenge in 1ml bis 5ml Kulturmedium resuspendiert, in *6-well*-I oder *12-well*-Kulturschalen überführt und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Kulturschalen waren zum Teil vorher mit Rattenschwanzcollagen, Fibronectin oder Matrigel beschichtet worden. Außerdem wurden gelegentlich besondere Medienzusätze wie 1% NEAA-Lösung (*nonessential amino acids*), 20% konditioniertes Medium von DLD-1-Zellen oder 20% FKS dem Medium beigefügt.

2.18.3.1 Beschichtung von Kulturschalen mit Rattenschwanzcollagen, Fibronectin oder Matrigel

Für die Beschichtung der Kulturschalen wurde so viel der jeweiligen Lösung in die *wells* gegeben, bis der Boden bedeckt war. Nach 2h Inkubation bei 37°C wurde der flüssige Überstand entnommen und die Kulturschalen verwendet.

2.18.3.2 Herstellung von konditioniertem Medium

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden 10⁶ Zellen der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 in 15ml Kulturmedium in 75cm²-Kulturflaschen ausplattiert und für fünf Tage inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und mit einem Filter mit einer Porengröße von 0,45µm steril filtriert.

2.18.4 Dreidimensionale-Zellkultur

Zunächst wurde der Boden von *12-well*-Kulturplatten mit Agarose beschichtet. Dafür wurde H₂O mit 1% (w/v) Agarose versetzt und gekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach der vollständigen Aushärtung der Agarose konnten die Kulturplatten verwendet werden. Die mechanisch oder enzymatisch aufgearbeiteten Zellen (siehe 2.18.1, 2.18.2) wurden in 1ml bis 5ml Kulturmedium mit 0,5mg/ml Matrigel aufgenommen und jeweils 0,5ml der Suspension in ein *12-well* überführt. Dann wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die entstandenen Gele vorsichtig mit 0,5ml Kulturmedium überschichtet und weiter inkubiert.

2.18.5 Subkutane Injektion der aufgearbeiteten Zellen in immundefiziente Mäuse

Für die subkutane Injektion in eine immundefiziente Maus wurden die Zellpellets nach mechanischem oder enzymatischem Aufschluss mit PBS oder mit PBS plus 0,5mg/ml Matrigel auf ein Volumen von 180µl gebracht. Die Injektion erfolgte dann mit einer G26-

Kanüle subkutan, ventral in den Abdomen einer Maus. Enzymatisch aufgearbeitetes Material wurde dabei auf der rechten-, mechanisch aufgearbeitetes Material auf der linken Körperseite injiziert. Einmal wöchentlich wurde kontrolliert, ob sich ein Tumor in den injizierten Tieren bildete. Hatte ein Tumor eine Größe zwischen 500mm^3 und 1000mm^3 erreicht, wurden die Tiere abgetötet und der Tumor präpariert. Der Tumor wurde dann für die weitere Verwendung in drei Teile geteilt. Ein Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für zukünftige Analysen bei -80°C gelagert, ein Teil wurde aufgearbeitet (siehe 2.18.1, 2.18.2) und in die Zellkultur und ein neues Tier überführt und ein Teil wurde für histologische Analysen aufgearbeitet.

2.18.6 Präparation von Metaphasechromosomen aus eukaryotischer Zellen

Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst in 25cm^2 -Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% herangezogen. Dann wurden $180\mu\text{l}$ Colcemidlösung ($10\mu\text{g/ml}$; Biochrom KG, Berlin) hinzugegeben und die Zellen fünf Stunden inkubiert. Dieser Mitosehemmer verhindert die Ausbildung der Spindelfaser während der Mitose. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen vereinzelt (2.17.1) und 10min bei $500 \times g$ pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 10ml 0,5% KCl-Lösung resuspendiert, 12min bei 37°C inkubiert und erneut pelletiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Pellet in 5ml einer Fixierungslösung aus Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1 resuspendiert und 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Abschließend wurde das Zellpellet in 1ml Fixierlösung resuspendiert, und die Zellsuspension aus einer Höhe von ca. 2cm nebeneinander auf entfettete, feuchte und kalte Objektträger getropft. Die Objektträger wurden dann über Nacht auf einer Heizplatte bei 60°C getrocknet.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger 1min in einer 2,5% Trypsinlösung (w/v) (Biochrom KG, Berlin) inkubiert und anschließend in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung geschwenkt. Dann wurden die Objektträger 10min in Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Merck Millipore, Darmstadt) inkubiert, in H_2O gespült und getrocknet. Über Nacht wurden die Objektträger dann in Roticlear (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) inkubiert, erneut getrocknet und mit Eukitt (O.Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte dann unter dem Mikroskop.

2.19 Histologische Techniken

Die folgenden histologischen Methoden wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Peter Middel (Abteilung Pathologie, Universität Göttingen) durchgeführt.

2.19.1 Immunzytochemische Färbung eukaryotischer Zellen

Für die immunzytochemische Färbung wurden zunächst entweder 4×10^4 Zellen pro Kammer auf einem 4-Kammer-Zellkulturobjektträger oder 2×10^4 Zellen pro Kammer auf einem 8-Kammer-Objektträger in Kulturmedium ausplattiert. Nach 24h wurden die Zellen mit 4°C kaltem DPBS gewaschen und dann 20min in 3,7% Formaldehydlösung in DPBS bei RT fixiert. Nach 10min waschen mit DPBS bei RT wurden die Zellen zur Permeabilisierung der Membran 10min mit 0,1% Triton X-100-Lösung in DPBS behandelt und erneut 10min in DPBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen 30min bei RT in DPBS mit 3% BSA inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper in entsprechender Konzentration in DPBS mit 3% BSA auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate zweimal 10min mit DPBS gewaschen und mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (REAL biotinylated secondary antibodies, Dako, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurde Streptavidin-alkalische Phosphatase hinzugegeben. Als Chromogen wurde Fast Red (Dako, Hamburg) verwendet. Die Präparate wurden nach Gegenfärbung mit Meyer's Hämatoxilin mit Hilfe eines Lichtmikroskops fotografiert.

2.19.2 Fixierung von Gewebe

Das frisch präparierte Material wurde, je nach Größe des Präparates, für eine Stunde bis zu 2 Tagen in 4% gepuffertem Formalin bei RT fixiert. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90% und 96%) wurde das Gewebe entwässert. Um das Ethanol vor der Einbettung in das Paraffin vollständig zu entfernen, wurde das Gewebe über Nacht in Methylbenzoat inkubiert. Für die Einbettung wurde das Paraffin im Wasserbad bei 58°C geschmolzen. Die Einbettung erfolgte in mehreren Schritten, die sämtlich bei 58°C durchgeführt wurden. Für die Entfernung des Methylbenzoats wurde das Gewebe zweimal mit Benzol und zweimal in einem 1:1 Benzol/Paraffin-Gemisch jeweils für 1h inkubiert. Zur vollständigen Durchdringung des Gewebes mit dem Paraffin wurde das Präparat anschließend zweimal für 1h in Paraffin inkubiert. Im Anschluss daran wurde die auf 58°C temperierte Einbettungsform etwa zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffin gefüllt, das Gewebe in die Form überführt und mit Paraffin aufgefüllt. Nach der Aushärtung über Nacht wurde der Paraffinblock aus der Form entnommen und bei 4°C gelagert.

2.19.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke mit dem fixierten Gewebe wurden zu Quadern geeigneter Größe zurechtgeschnitten. Mit einem Mikrotom (JUNG RM 2035, Leica) wurden dann Scheiben mit einer Schnittdicke von 5-7 μm erstellt. Mit Hilfe eines feinen Pinsels wurden die Schnitte auf

58°C warmes Wasser gelegt, mit einem Objektträger aufgenommen und getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei 4°C gelagert.

2.19.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zweimal 10min in Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Behandlung erfolgte wie folgt:

2x	100% Ethanol	5min
1x	98% Ethanol	5min
1x	95% Ethanol	5min
2x	70% Ethanol	5min
1x	H ₂ O	10min

Dann wurden sie 7min in Hämalau inkubiert und unter fließendem Leitungswasser 10min gebläut. Danach wurden die Schnitte 15sec in 1%iger Eosin-Lösung inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 2min je 70%, 96% Ethanol und 2x 2min 100% Ethanol) wurden die Schnitte dehydriert und danach in Xylol geschwenkt und mit Vitro-Clud (Langenbrinck) eingedeckelt. Diese Färbung dient der Unterscheidung verschiedener Gewebe- und Zellstrukturen.

2.19.5 Immunfluoreszenz-Färbung an Gewebeschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten wurden zunächst zweimal für 10min bei RT in Xylol deparaffiniert. Mit einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte anschließend rehydriert (2.19.4).

Um die Bindungsstellen für die Antikörper zu demaskieren, wurden die Gewebeschnitte dann für 60min in Zitratpuffer in einem Dampfgerät (FS 20, Braun, Kronberg) inkubiert. Nachdem der Puffer abgekühlt war, wurden die Schnitte einmal 10min mit DPBS bei RT gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen 30min bei RT in DPBS mit 3% BSA inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper in entsprechender Konzentration in DPBS mit 3% BSA auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte zweimal 10min in DPBS gewaschen, und anschließend mit einem Cy3-gekoppelter sekundären Antikörper in Blockpuffer II inkubiert. Nach zwei weiteren 10minütigen Waschschritten mit DPBS und einem 10minütigen Waschschriff in H₂O, wurden die Präparate mit Vectashield/DAPI

eingedeckt und mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop FluoView1000 (Olympus, Hamburg) fotografiert.

2.20 Behandlung von kolorektalen Karzinomzelllinien mit AEW-541 und Erlotinib in Kombination mit einer Radiochemotherapie *in vitro*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Ansprechen der drei kolorektalen Karzinomzelllinien DLD-1, SW837 und Caco-2 auf die kombinierte Radiochemotherapie in Anwesenheit der Kinaseinhibitoren AEW-541 (IGF-IR) und Erlotinib (EGFR) überprüft werden.

Dafür wurden definierte Zellzahlen (siehe Tabelle 2.2) der zu analysierenden Zellen in 6-well-Zellkulturplatten ausplattiert und 8h inkubiert. Nach der Inkubation wurden dem Medium 3 μ M 5-Fluoruracil und die Inhibitoren zugesetzt (Erlotinib 1 μ M, AEW-541 1 μ g/ml). Nach weiteren 16h Inkubationszeit wurden die Zellen dann in einem Bestrahlungsgerät (Irradiation device 225A, Gulmay medical, Camberley, England) mit 2Gy, 4Gy, oder 8Gy bestrahlt. Auch die nicht bestrahlte Kontrolle wurde für 2min in das Gerät gestellt. Nach weiteren 8h Inkubation wurde die Zellen mit DPBS gewaschen und mit Medium ohne 5-Fluoruracil, jedoch mit den Inhibitoren, bedeckt. Nach weiteren sechs bis 13 Tagen wurden die Zellen gewaschen und 10min mit Hämalaun behandelt. Dann wurden die Kulturplatten getrocknet und alle Kolonien ab einer Größe von ca. 50 Zellen gezählt. Für die Auswertung wurde zunächst die Anzahl der entstandenen Kolonien gegen die Anzahl der ausplattierten Zellen normalisiert (Plattierungseffizienz). Anschließend wurde bei den Berechnungen diskriminiert zwischen der reinen „Sensibilisierung“ (Überlebensraten in Relation zur jeweiligen nicht bestrahlten Kontrolle) und des Therapieeffektes (Überlebensraten in Relation zur nicht bestrahlten und mit DMSO behandelten Kontrolle). Für beide Gruppen wurde der Dosis-reduzierende Faktor berechnet (DRF), der angibt, um welchen Faktor die Strahlendosis reduziert werden könnte, um den gleichen Effekt zu erzielen.

Tabelle 2.2 Anzahl der Ausplattierten Zellen für die kombinierte Radiochemotherapie in Anwesenheit der Kinaseinhibitoren *in vitro* für die Zelllinien DLD-1, SW837 und Caco-2

Zelllinie	Ausplattierte Zellen für die Bestrahlung mit:			
	\emptyset	2Gy	4Gy	8Gy
DLD-1	200	200	200	200
SW837	750	750	750	750
Caco-2	500	1000	2000	4000

2.21 Behandlung von kolorektalen Karzinomzelllinien mit AEW-541 und Erlotinib in Kombination mit einer Radiochemotherapie *in vitro*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Xenografttumore der Zelllinien DLD-1 und SW837 einer 5-Fluoruracil-basierten Radiochemotherapie mit zusätzlicher Inhibition des EGFR und IGF-IR unterzogen.

Zunächst wurden pro Körperseite $7,5 \times 10^5$ Zellen in Kulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin subkutan ventral in den Abdomen immundefizienter Nacktmäuse (CD1-Foxn1^{NU}) injiziert. Direkt nach der Injektion wurden die Mäuse randomisiert den verschiedenen Behandlungsgruppen zugeordnet und weiter gehalten, bis die Tumoren ein durchschnittliches Volumen von 200mm^3 erreicht hatten.

An den ersten drei Behandlungstagen wurden alle Tiere mit 25mg/kg Körpergewicht 5-Fluoruracil und 1,8Gy behandelt, wobei die Gabe von 5-Fluoruracil 1h vor der Bestrahlung intraperitoneal erfolgte. Auch die Behandlung mit den Inhibitoren begann am ersten Behandlungstag und wurde über zwei Wochen fortgesetzt. Die Inhibitoren wurden oral mit einer Schlundsonde verabreicht, wobei die Dosierung bei Erlotinib und AEW-541 bei 20mg/kg Körpergewicht lag. Die Kontrolltiere bekamen das Lösungsmittel verabreicht. Die Tumore wurden mit Beginn der Behandlung täglich mit einer Schieblehre vermessen, wobei zur Bestimmung des Tumolvolumens die Formel $V = \text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times 0,5$ angewendet wurde. Hatte eines der Tiere ein Tumolvolumen von 1500mm^3 erreicht, so wurde der Versuch beendet. Nachdem die Tiere abgetötet worden waren, wurden die Tumoren präpariert und vermessen. Die eine Hälfte eines Tumors wurde jeweils in Formalin fixiert, die andere Hälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung primärer Zelllinien aus humanen Rektumkarzinombiopsien

Um auf molekularer Ebene spezifische Unterschiede der Tumorzellen von Patienten, die auf eine kombinierte Radiochemotherapie ansprechen (*responder*), und denen, die nicht auf die Therapie ansprechen (*non-responder*), zu identifizieren, sollten zunächst primäre Zelllinien aus Rektumkarzinombiopsien generiert werden. Diese Zelllinien sollten anschließend anhand der Patientendaten in *responder*- und *non-responder*-Zelltypen eingeteilt und bezüglich molekularer Merkmale verglichen werden.

3.1.1 Aufarbeitung und Verwendung des Rektumkarzinommaterials

Um primäre Zelllinien aus humanem Rektumkarzinommaterial zu generieren, wurden zwei verschiedene Strategien angewendet. Zum einen wurde versucht, die aufgearbeiteten Biopsieproben direkt in Zellkulturgefäßen zu kultivieren, zum anderen wurden die aufgearbeiteten Biopsieproben subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert, um die Zellen zunächst *in vivo* zu vermehren.

Für die Etablierung von primären Rektumkarzinomzelllinien wurden prospektiv prätherapeutische Biopsien von Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom gesammelt, die in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen behandelt wurden. Alle Patienten wurden in die CAO/ARO/AIO-04-Studie der Deutschen Rektumkarzinom-Studiengruppe aufgenommen und entsprechend behandelt. Außerdem wurden insgesamt neun Gewebeproben von nicht vorbehandelten, komplett entnommenen Rektumtumoren aus dem oberen Rektumdrittel (T1 bis T9) der GAST-05-Studie für diese Experimente zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden die Biopsie- bzw. Tumorproben 20min in PBS mit 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Gentamycin bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestücke zweimal 10min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen, bevor sie mit Hilfe eines Skalpells in möglichst kleine Stücke zerschnitten wurden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte dann entweder enzymatisch oder mechanisch (siehe 2.18). Bei kleineren Biopsiepräparaten wurde lediglich eine der beiden Aufarbeitungsmethoden durchgeführt.

Für die direkte Übernahme der Zellen in Kultur, wurde das aufgearbeitete Material je nach Menge mit 1 bis 5ml Kulturmedium gemischt und in 6-*well*- oder 12-*well*-Kulturschalen überführt. Diese waren zum Teil vorher mit Rattenschwanzcollagen, Fibronectin oder

Matrigel™ beschichtet worden. Außerdem wurden gelegentlich besondere Medienzusätze wie NEAA (*nonessential amino acids*), DLD-1-konditioniertes Medium oder 20% FKS getestet (Tabelle 3.1). Für die subkutane Injektion in eine immundefiziente Maus wurden die aufgearbeiteten Zellen mit PBS oder mit PBS plus 0,5mg/ml Matrigel auf ein Volumen von 180µl gebracht. Die Injektion erfolgte dann mit einer G26-Kanüle subkutan, ventral in das Abdomen einer Maus. Enzymatisch aufgearbeitetes Material wurde auf der rechten Körperseite, mechanisch aufgearbeitetes Material auf der linken Körperseite injiziert. Getestet wurden die immundefizienten Mausstämme Fox Chase SCID® Mouse (SCID), Fox Chase SCID® Beige Mouse (Beige), JAX Rag1 (Rag1) und NU/NU Nude Mouse (Nude). Probeninjektionen und die verwendeten Mausstämme sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst dargestellt. Eine genaue Auflistung aller Parameter befindet sich im Anhang.

Tabelle 3.1 Auflistung der erhaltenen Gewebeproben und deren Verwendung. Die erhaltenen Gewebeproben wurden enzymatisch oder mechanisch aufgearbeitet und anschließend direkt kultiviert bzw. subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert. Es ist dargestellt, wie viele Proben auf welche Weise aufgearbeitet und weiter behandelt wurden und wie viele Proben direkt kultiviert bzw. injiziert wurden. Mech: mechanische Aufarbeitung, RZC: Rattenschwanzcollagen, FN: Fibronectin, IrEZM: lamininreiche extrazelluläre Matrix, NEAA: *nonessential amino acids*, kon. Medium: konditioniertes Medium.

		Biopsiepräparate	Tumorresektatpräparate
	Gesamtzahl	86	9
	enzymatisch aufgearbeitet	52	9
	mechanisch aufgearbeitet	72	9
Zellkultur			
Plattenbeschichtung:	ohne	82	9
	RZC	61	9
	FN	13	9
	IrEZM	9	7
Besondere Zusätze	20% FKS	10	0
	NEAA	4	0
	Kon.Medium	5	1
Kultivierbarkeit	angewachsen	19	7
	> 6 Wochen kultivierbar	0	4
Injektion in eine Maus	insgesamt	46	6
Mauslinie:	SCID	18	1
	Beige	16	5
	Rag1	3	
	Nude	9	
	entstandene Tumore	1	0

3.1.2 Ergebnisse der Zellkultur

Insgesamt wurden 86 Rektumkarzinombiopsien und neun Gewebeproben von rektalen Tumorresektaten in die Zellkultur gebracht (Tabelle 3.1). 19 der Biopsieproben und sieben

der Resektatproben wuchsen zunächst in den Kulturschalen an und begannen sich zu teilen und Kolonien zu bilden. Dies ist in Abbildung 3.1 beispielhaft für die Kultur P334 dargestellt. Die Proben, die anwuchsen, taten dies unter allen für die jeweiligen Proben verwendeten Aufarbeitungsmethoden und Kulturbedingungen. Es ließ sich jedoch feststellen, dass sich in den mit Rattenschwanzcollagen und Fibronektin beschichteten Kulturschalen mehr Kolonien bildeten. Ein Einfluss der verschiedenen Medienzusätze konnte nicht ermittelt werden. Nur vier der Resektat- und keine der Biopsiekulturen ließen sich länger als sechs Wochen kultivieren (T1, T2, T6 und T8). Die Zellen der übrigen Kulturen zeigten nach drei bis vier Wochen kein Wachstum mehr und starben ab. Zusätzliches Passagieren der Zellen beschleunigte diesen Prozess.

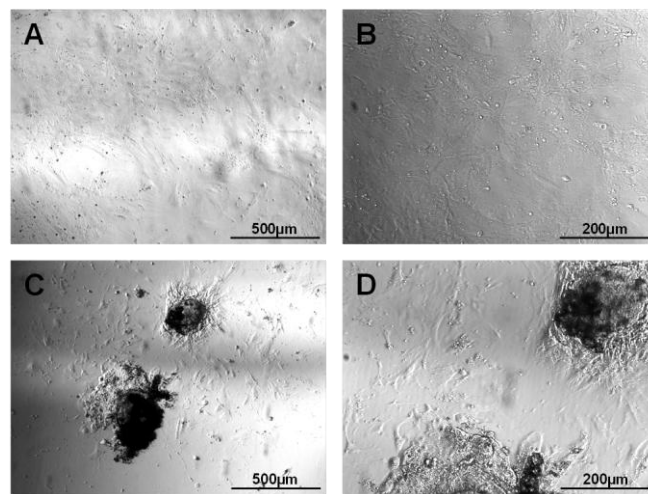


Abbildung 3.1 Darstellung von angewachsenen Zellen der Rektumkarzinombiopsie P334.

Die Rektumkarzinombiopsie P334 wurde sowohl enzymatisch als auch mechanisch aufgearbeitet und in Kultur überführt. Es wurden nicht beschichtete wie auch mit Rattenschwanzcollagen (RZC) beschichtete Kulturschalen verwendet. (A, B) Enzymatisch aufgearbeitete Zellen in RZC-beschichteten Kulturschalen. (C, D) Mechanisch aufgearbeitete Zellen in nicht beschichteten Kulturschalen.

3.1.3 Ergebnisse der subkutanen Injektion von Tumormaterial in immundefiziente Mäuse

Insgesamt wurde Material von 46 Rektumkarzinombiopsien und sechs Gewebeproben kolorektaler Tumorsektate in immundefiziente Mäuse injiziert (Tabelle 3.1). Die Injektion von der Biopsie P310 führte in einer SCID-Maus zu einem Tumor. Dieser war ca. 23 Wochen nach der Injektion tastbar. 27 Wochen nach der Injektion wurde die Maus getötet und der Tumor präpariert (Abbildung 3.2). Die Biopsie stammte von einem mucinösem Karzinom mit der UICC-Klassifizierung II. (Der prätherapeutische pathologische Befund war: mucinöses Karzinom bei 4-9,5 cm, uT3, uNx, G2. Der posttherapeutische pathologische Befund lautete: ypT3a, ypN0 (0/14) R0, L0, V0, TRG 3).

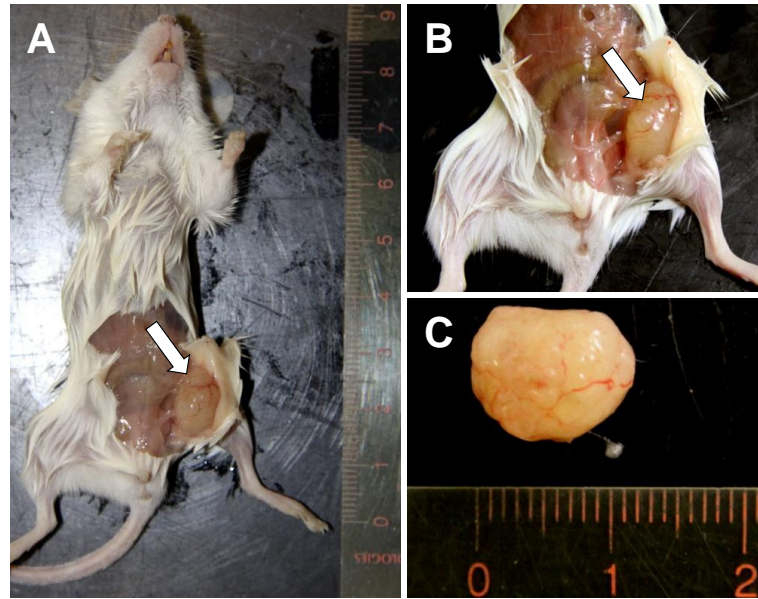


Abbildung 3.2 Darstellung des Tumors in einer SCID-Maus nach subkutaner Injektion von Biopsiematerial aus einem Rektumkarzinom des Patienten 310.

Um das Tumormaterial der Rektumkarzinombiopsie 310 zu vermehren, wurde dieses enzymatisch bzw. mechanisch aufgearbeitet und subkutan ventral in das Abdomen einer immundefizienten SCID-Maus injiziert. Das enzymatisch aufgearbeitete Material wurde auf der rechten, das mechanisch aufgearbeitete Material auf der linken Körperseite injiziert. 27 Wochen nach der Injektion wurde die Maus getötet und präpariert. Auf der linken Körperseite hatte sich ein Tumor mit einem Volumen von 508mm^3 und einem Gewicht von $0,59\text{g}$ gebildet. (A) Gesamtdarstellung der präparierten Maus. (B) Vergrößerte Darstellung des tumortragenden Bereichs. (C) Darstellung des präparierten Tumors.

Der Tumor (SCID1) ist aus dem mechanisch aufgearbeiteten Material entstanden und hatte ein Volumen von 508mm^3 und ein Gewicht von $0,59\text{g}$. Die Injektion des enzymatisch aufgearbeiteten Materials führte zu keiner Tumorentstehung. Zur weiteren Kultivierung wurde ein Großteil des Tumors aufgearbeitet und in die Zellkultur überführt. Außerdem wurde ein Teil des Tumormaterials wieder in eine immundefiziente Maus (SCID) reinjiziert. Ein weiterer Teil des Tumors wurde für spätere Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um einen Tumor gehandelt hat, wurde ein Teil des Tumors histopathologisch aufgearbeitet und in Zusammenarbeit mit PD Dr. Peter Middel (Abteilung Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen) ausgewertet. Die histopathologische Analyse ergab, dass es sich um ein mittelgradig differenziertes, teils schleimbildendes Adenokarzinom handelte (Abbildung 3.3 A-D), so wie es bereits beim Patienten beschrieben worden war. Der Tumor war umhüllt von einer bindegewebsartigen Pseudokapsel. Eine Invasion des umgebenden Mausegewebes war nicht zu beobachten. Desweiteren wurde an einem Gewebeschnitt eine immunhistochemische Färbung mit dem Epithelmarker α -Zytokeratin durchgeführt. Diese Färbung zeigte deutlich, dass im Gegensatz zu den Zellen der Pseudokapsel die tieferliegenden Zellen epithelialen Ursprungs waren (Abbildung 3.3 E, F).

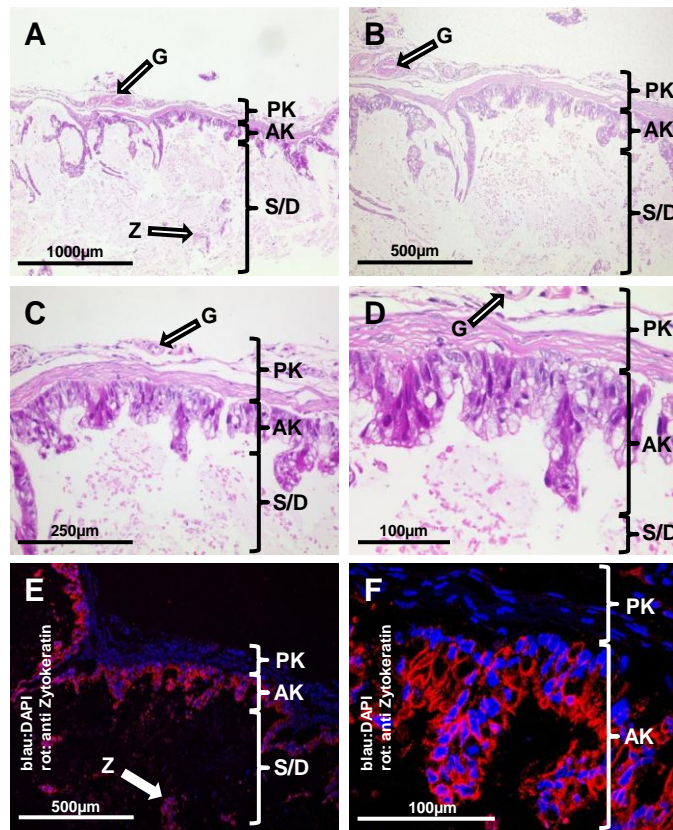


Abbildung 3.3 Histopathologische Analysen des Xenografftumors SCID1.

Von dem aus injiziertem Biopsiematerial entstandenen Tumor wurden Gewebeschnitte angefertigt und einer Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung unterzogen (A-D). Die histopathologische Analyse ergab, dass es sich um ein mittelgradig differenziertes, teils schleimbildendes Adenokarzinom handelte. Der Tumor war umhüllt von einer bindegewebsartigen Pseudokapsel. Eine Invasion des umgebenden Mausegewebes war nicht auszumachen. Die Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Epithelmarker α -Zytokeratin (E, F) zeigte, dass im Gegensatz zu den Zellen der Pseudokapsel die tieferliegenden Zellen epithelialen Ursprungs waren. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. G: Blutgefäße, Z: Zellpopulation, PK: Pseudokapsel, AK: Adenokarzinom, S/D: Schleim und Detritus

Die aufgearbeiteten Zellen des Tumors SCID1 wuchsen in der Zellkultur an und ließen sich langfristig kultivieren (Abbildung 3.4).

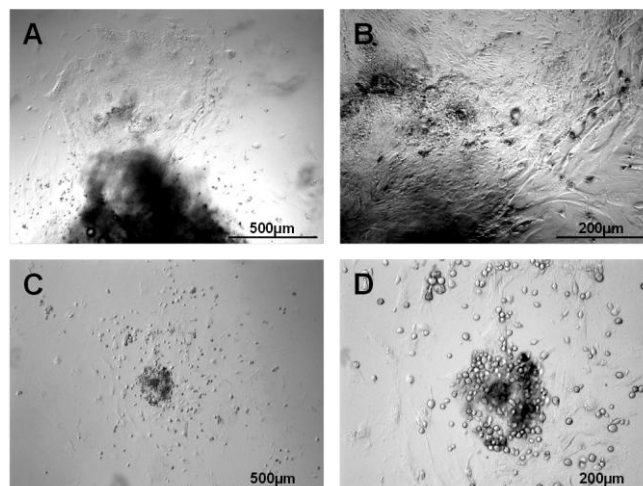


Abbildung 3.4 Darstellung von angewachsenen Zellen des induzierten Xenografftumors SCID1.

Der induzierte Xenografttumor SCID1 wurde sowohl enzymatisch wie auch mechanisch aufgearbeitet und in Kultur überführt. Für die Kultur wurden nicht beschichtete, wie auch mit Rattenschwanzcollagen (RZC) oder Fibronektin beschichtete Kulturschalen verwendet. (A, B) Mechanisch aufgearbeitete Zellen in RZC-beschichteten Kulturschalen. (C, D) Enzymatisch aufgearbeitete Zellen in nicht beschichteten Kulturschalen.

Die subkutane Injektion der aufgearbeiteten Zellen aus dem Tumor der ersten SCID-Maus (SCID1) führte auch in einer weiteren SCID-Maus nach ca. 23 Wochen zu einem tastbaren Tumor. Bei der Präparation wies der Tumor ein Volumen von 480mm^3 und ein Gewicht von $0,33\text{g}$ auf (Abbildung 3.5). Auch dieser Tumor war aus mechanisch aufgearbeitetem Material entstanden. Bei gleicher Vorgehensweise wurde auch dieser Tumor in die Zellkultur überführt und in eine weitere Maus injiziert, die allerdings nach 8 Wochen an einem Infekt verstarb. Die histopathologische Aufarbeitung bestätigte wie beim Tumor SCID1 ein mittelgradig differenziertes, teils schleimbildendes Adenokarzinom ohne Invasion in umliegendes Gewebe (Abbildung 3.6). Die Zellen aus SCID1.2 konnten ebenfalls längerfristig in Kultur gehalten werden (Abbildung 3.7).

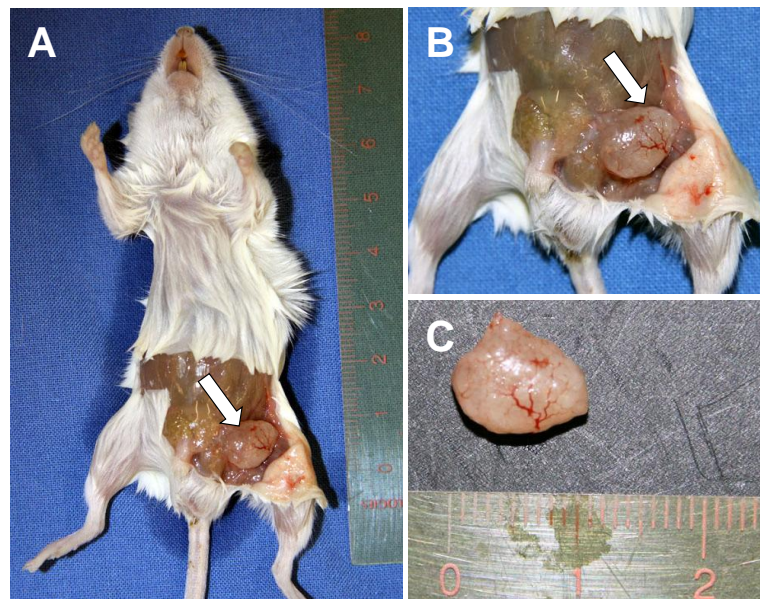


Abbildung 3.5 Präparation des Tumors aus einer SCID-Maus nach subkutaner Injektion aufgearbeiteter Tumorzellen des Tumors SCID1.

Das Tumormaterial aus SCID1 wurde enzymatisch bzw. mechanisch aufgearbeitet und subkutan ventral in das Abdomen einer immundefizienten SCID-Maus injiziert. Das enzymatisch aufgearbeitete Material wurde auf der rechten, das mechanisch aufgearbeitete Material auf der linken Körperseite injiziert. 27 Wochen nach der Injektion wurde die Maus getötet und präpariert. Auf der linken Körperseite hatte sich ein Tumor mit einem Volumen von 480mm^3 und einem Gewicht von $0,33\text{g}$ gebildet. Auf der rechten Seite war kein Tumor entstanden. (A) Gesamtdarstellung der präparierten Maus. (B) Vergrößerte Darstellung des tumortragenden Bereichs. (C) Darstellung des präparierten Tumors.

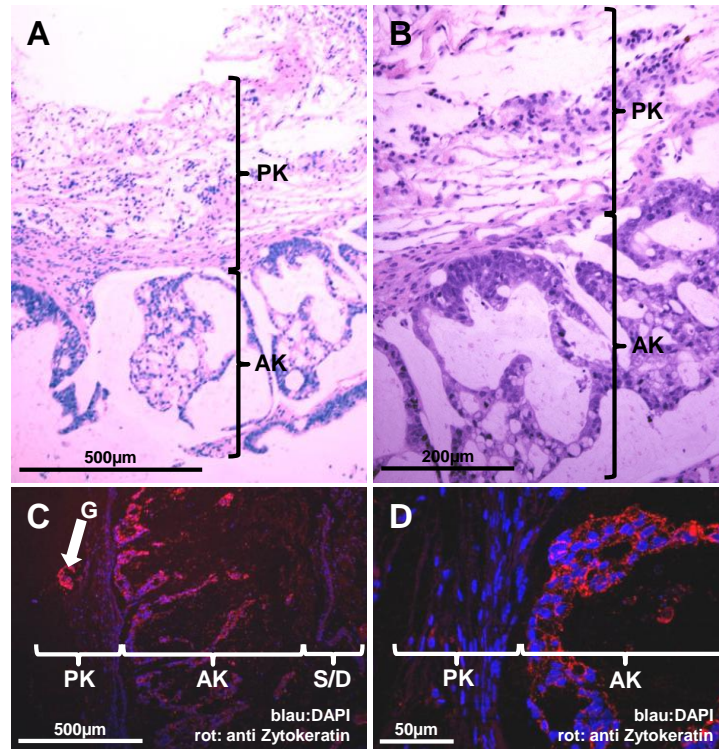


Abbildung 3.6 Histopathologische Analysen des Xenografttumors SCID1.2.

(A, B) HE-Färbung an Gewebeschnitten des Xenografttumors SCID1.2. (C,D) Immunhistochemische Färbung mit dem Epithelmarker α -Zytokeratin an Gewebeschnitten des Xenografttumors SCID1.2. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Es handelt sich bei dem Tumor um ein mittelgradig differenziertes, teils schleimbildendes Adenokarzinom ohne Invasion in umliegendes Gewebe. G: Blutgefäße, PK: Pseudokapsel, AK: Adenokarzinom, S/D: Schleim und Detritus

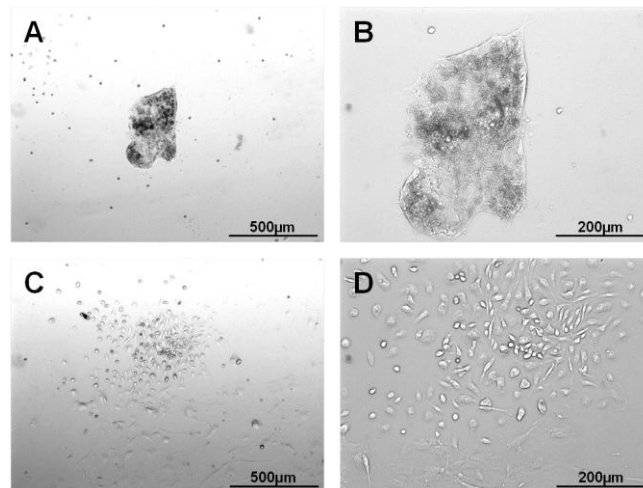


Abbildung 3.7 Darstellung von angewachsenen Zellen des Xenografttumors SCID1.2.

(A, B): Mechanisch aufgearbeitete Zellen in nicht beschichteten Kulturschalen. (C, D) Enzymatisch aufgearbeitete Zellen in nicht beschichteten Kulturschalen.

3.1.4 Überprüfung der kultivierbaren primären Zelllinien mittels Immunzytochemie

Insgesamt ließen sich die vier Tumorresektatzelllinien T1, T2, T6 und T8 sowie die aus der Biopsie P310 hervorgegangenen Xenografttumorzelllinien SCID1 und SCID1.2 langfristig kultivieren. Um zu überprüfen, ob es sich bei den etablierten primären Zellen um Karzinomzellen handelte, wurden diese immunzytochemisch analysiert. Als Marker für mesenchymale Zellen wurde ein Antikörper gegen das humane Typ 3 Intermediärfilament Vimentin verwendet, das in allen Zellen mesenchymaler Herkunft vorkommt. Als Marker für epitheliale Zellen wurde ein Antikörper gegen das humane Zelloberflächenprotein EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) verwendet, welches viele epitheliale Tumore exprimieren. Als Kontrollen wurden die Kolonkarzinomzelllinie SW480, die Rektumkarzinomzelllinie SW837 und die humane Fibroblastenzelllinie MRC-5 mitgeführt (Abbildung 3.8). Die Auswertung der immunhistochemischen Analysen zeigte, dass die primären Zelllinien T1, T2, T6 und T8, die aus den Tumorresektaten gewonnen wurden, positiv für den mesenchymalen Marker Vimentin und negativ für den epithelialen Marker EpCAM waren. Die zwei Zelllinien SCID1 und SCID1.2, die aus Tumoren subkutan injizierter Mäuse gewonnen worden waren, waren schwach positiv für Vimentin und negativ für EpCAM.

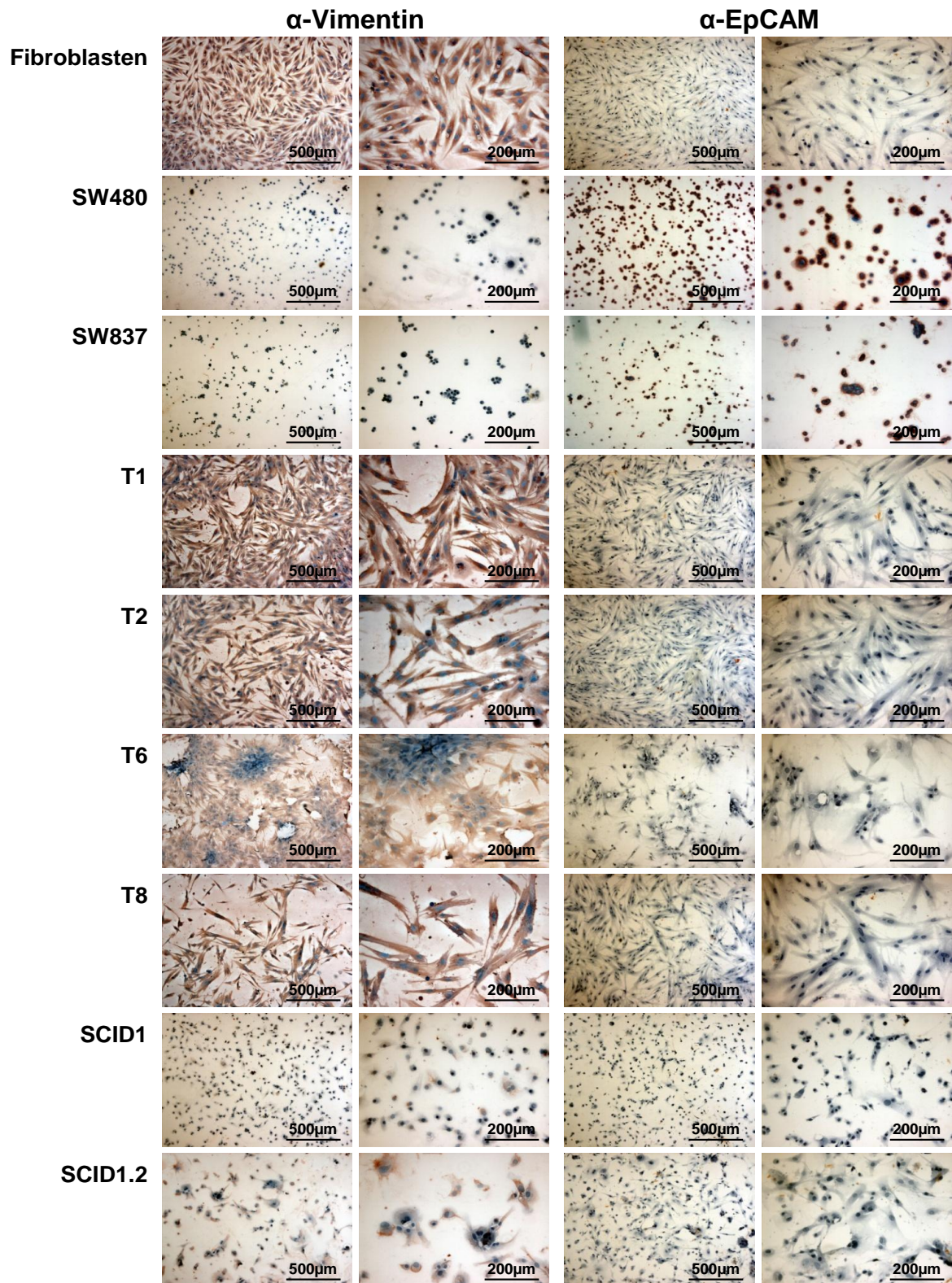


Abbildung 3.8 Immunzytochemische Analysen der etablierten primären Zelllinien.

An den primären Primärzelllinien wurde eine immunzytochemische Färbung mit dem mesenchymalen Marker Vimentin und dem epithelialen Marker EpCAM durchgeführt. Als Kontrolle wurden die humane Fibroblastenzelllinie MRC-5, die Kolonkarzinomzelllinie SW480 und die rektale Karzinomzelllinie SW837 mitgeführt. Die aus den Tumorsektaten gewonnenen Zelllinien T1, T2, T6 und T8 waren alle positiv für Vimentin und negativ für EpCAM. Die aus den Tumoren subkutan injizierter Mäuse gewonnenen Zelllinien SCID1 und SCID1.2 waren schwach positiv für Vimentin und negativ für EpCAM.

3.1.5 Überprüfung der Gattungsherkunft primärer Zelllinien mittels Chromosomenanalyse

Um zu klären, ob die primären Zelllinien SCID1 und SCID1.2 humanen oder murinen Ursprungs waren, wurden die Anzahl und die Struktur der Chromosomen der Zellen analysiert (Abbildung 3.9). Beide Zelllinien zeigten nur Zellen murinen Ursprungs, da alle analysierten Zellen lediglich akrozentrische Chromosomen aufwiesen.

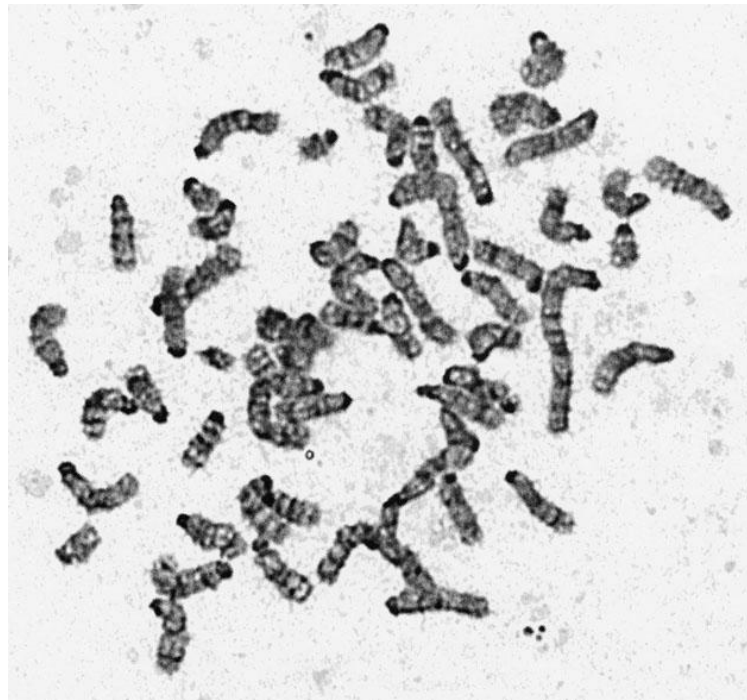


Abbildung 3.9 Beispielhafte Darstellung der Chromosomen einer Metaphase aus der Zelllinie SCID 1.

Alle untersuchten Metaphasen der Zelllinien SCID1 und SCID1.2 waren murinen Ursprungs, da nur akrozentrische Chromosomen detektiert werden konnten.

3.1.6 Generierung von primären Zelllinien aus humanen Rektumkarzinombiopsien mittels dreidimensionaler Zellkultur

Eine weitere Technik die zur Etablierung von primären Zelllinien aus Rektumkarzinombiopsien angewandt wurde, war die dreidimensionale Zellkultur. Hierzu wurden die enzymatisch bzw. mechanisch aufgearbeiteten Gewebeprobe in Kulturmedium mit 0,5mg/ml lamininreicher extrazellulärer Matrix (IrEZM; Matrigel[®]) eingebettet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Auflistung der Gewebeproben für die dreidimensionale Zellkultur. Die erhaltenen Gewebeproben wurden enzymatisch oder mechanisch aufgearbeitet und direkt in Kulturmedium und 0,5mg/ml lamininreicher extrazellulärer Matrix kultiviert. Es ist zusätzlich aufgeführt, ob die Zellen in der Zellkultur angewachsen sind und länger als 6 Wochen kultivierbar waren. P-Nr.: anonymisierte Patienten-Nr. der Biopsie,ENZ: enzymatische Aufarbeitung, Mech: mechanische Aufarbeitung

P-Nr.	Aufarbeitung		Zellkultur	
	Enz	Mech	angewachsen	kultivierbar
1276	JA	JA	X	X
1288	JA	JA	X	X
1356	JA	JA	X	X
1452	JA	JA	JA	12 Wochen
1470	JA	JA	X	X
1537	JA	JA	X	X
1570	JA	JA	X	X
1561	JA	JA	X	X
1624	JA	JA	X	X
1629	JA	JA	X	X
1631	JA	JA	X	X
1649	JA	JA	X	X

Insgesamt wurden 12 Rektumkarzinombiopsien für die dreidimensionale Zellkultur verwendet. Eine der verwendeten Biopsien wuchs an und ließ sich 12 Wochen kultivieren und passagieren. Die Kolonien wuchsen dabei in kugelförmigen Strukturen (Abbildung 3.10).

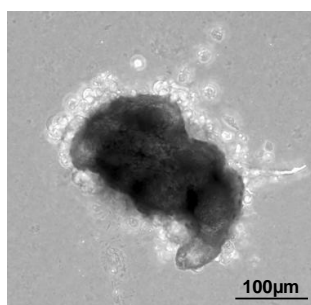


Abbildung 3.10 Darstellung einer Kolonie der primären Zelllinie der Rektumkarzinombiopsie P1425 in der dreidimensionalen Zellkultur.

Die Rektumkarzinombiopsie P1425 wurde sowohl enzymatisch wie auch mechanisch aufgearbeitet und in die dreidimensionale Zellkultur überführt. Zu erkennen ist eine kugelförmige Zellkolonie.

3.2 Einfluss von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren auf den Erfolg der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen

Aufgrund der großen Bedeutung von Rezeptortyrosinkinasen beim kolorektalen Karzinom hat unsere Arbeitsgruppe den Einfluss des EGFR und des IGF-IR näher charakterisiert. Dafür wurden die Expression bzw. die Aktivität des EGFR und des IGF-IR in kolorektalen Zelllinien inhibiert und die Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen untersucht. Die Inhibition

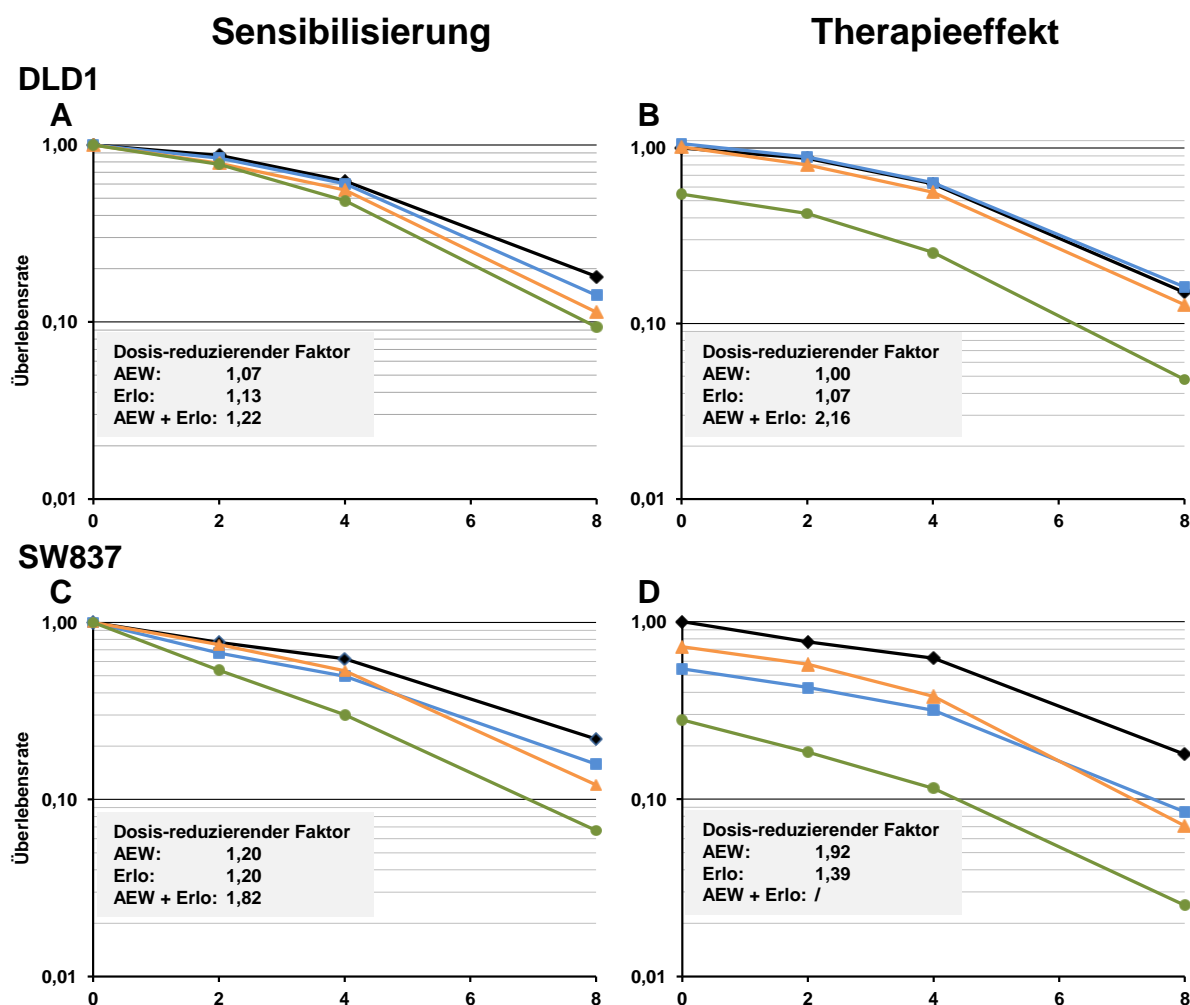
der Rezeptoren erfolgte einzeln und in Kombination. Die Herunterregulierung der Expression bzw. die Inhibition der Aktivität der Rezeptoren führten zu einer deutlich verminderten Proliferationsrate und einem gesteigerten Absterben der untersuchten Zelllinien. Bei der gleichzeitigen Inhibition des EGFR und des IGF-IR waren diese Effekte deutlich stärker ausgeprägt. Analysen der nachfolgenden Signalwege zeigten, dass die Stimulation des IGF-IR mit IGF-I nur zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs führte, wenn EGFR in der Zelle anwesend und funktionsfähig ist. Eine Stimulierung des EGFR war in diesem Fall nicht notwendig (Kaulfuß *et al.*, 2009). Der Nachweis dieses *crosstalks* führte zu der Hypothese, dass die Interaktion des EGFR mit dem IGF-IR einen möglichen Resistenzmechanismus auf die Radiochemotherapie darstellen könnte. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss der Inhibition der Rezeptoren auf den Erfolg der Radiochemotherapie *in vitro* und *in vivo* untersucht.

3.2.1 Behandlung von kolorektalen Karzinomzelllinien mit AEW-541 und Erlotinib in Kombination mit einer Radiochemotherapie *in vitro*

Um das Ansprechen der drei kolorektalen Karzinomzelllinien DLD-1, SW837 und Caco-2 auf die kombinierte Radiochemotherapie in Anwesenheit der Tyrosinkinaseinhibitoren AEW-541 (IGF-IR-spezifisch) und Erlotinib (EGFR-spezifisch) zu überprüfen, wurden definierte Zellzahlen (2.20) der drei Zelllinien in 6-well-Zellkulturplatten ausplattiert und einer kombinierten Radiochemotherapie mit 3µM 5-Fluoruracil (5-FU) unterzogen. Die Zellen wurden dabei mit 2, 4 und 8Gy bestrahlt bzw. nicht bestrahlt. Anschließend wurden *colony formation assays* durchgeführt. Die Inhibitoren AEW-541 und Erlotinib lagen während des gesamten Experiments in Konzentrationen von 1µM bzw. 1µg/ml vor. Für die Auswertung wurde zunächst die Anzahl der entstandenen Kolonien gegen die Anzahl der ausplattierten Zellen normalisiert (Plattierungseffizienz). Anschließend wurde bei den Berechnungen diskriminiert zwischen der reinen Sensibilisierung (Überlebensraten in Relation zur jeweiligen nicht bestrahlten Kontrolle) und des Therapieeffektes (Überlebensraten in Relation zur nicht bestrahlten und mit DMSO behandelten Kontrolle) (Abbildung 3.11). Für beide Gruppen wurde der Dosisreduzierende Faktor berechnet (DRF), der angibt, um welchen Faktor die Strahlendosis reduziert werden könnte, um den gleichen Effekt zu erzielen. Es wurden für alle Zelllinien drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Die Inhibition des EGFR oder des IGF-IR führte in DLD-1-Zellen nur zu einer geringen Sensibilisierung der Zellen und hatte keinen Einfluss auf den Therapieeffekt. Der Effekt der simultanen Inhibition des EGFR und des IGF-IR war hingegen deutlich. Die Behandlung führte zu einer Sensibilisierung der Zellen und einem DRF von 1,22. Der Therapieeffekt war deutlich größer, hier wurde durch die doppelte Inhibition ein DRF von 2,16 erreicht. In den

SW837-Zellen führte auch die alleinige Inhibition des EGFR oder IGF-IR zu einer Sensibilisierung der Zellen. Der DRF betrug hier jeweils 1,2. Die kombinierte Inhibition hatte eine noch stärkere Sensibilisierung mit einem DRF von 1,82 zur Folge. Für den Therapieeffekt zeigte sich, dass schon die Inhibition von nur einem der Rezeptoren zu einem stärkeren Therapieerfolg führt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (DRF AEW-541: 1,92, DRF Erlotinib: 1,39). Der Effekt auf die Therapie durch die gemeinsame Inhibition von EGFR und IGF-IR war so groß, dass die Bestrahlung keinen zusätzlichen Nutzen mehr aufwies. Der DRF war deshalb nicht mehr zu bestimmen. Für die Caco-2-Zellen war keine Sensibilisierung der Zellen auf die Radiochemotherapie nachzuweisen. Dies lag zum Teil daran, dass der Therapieeffekt durch die Rezeptor-Inhibition sehr ausgeprägt war. Für die EGFR-Inhibition betrug der DRF 2,64. Für die IGF-IR-Inhibition und die kombinierte Inhibition war der Effekt so stark ausgeprägt, dass die Bestrahlung keinen zusätzlichen Nutzen mehr aufwies. Der DRF war deshalb nicht mehr zu bestimmen. Der Effekt der kombinierten Inhibition war allerdings noch deutlich stärker als der durch die alleinige IGF-IR-Inhibition hervorgerufene Effekt. Hier lag die Sterberate der Caco-2-Zellen bei über 99%.



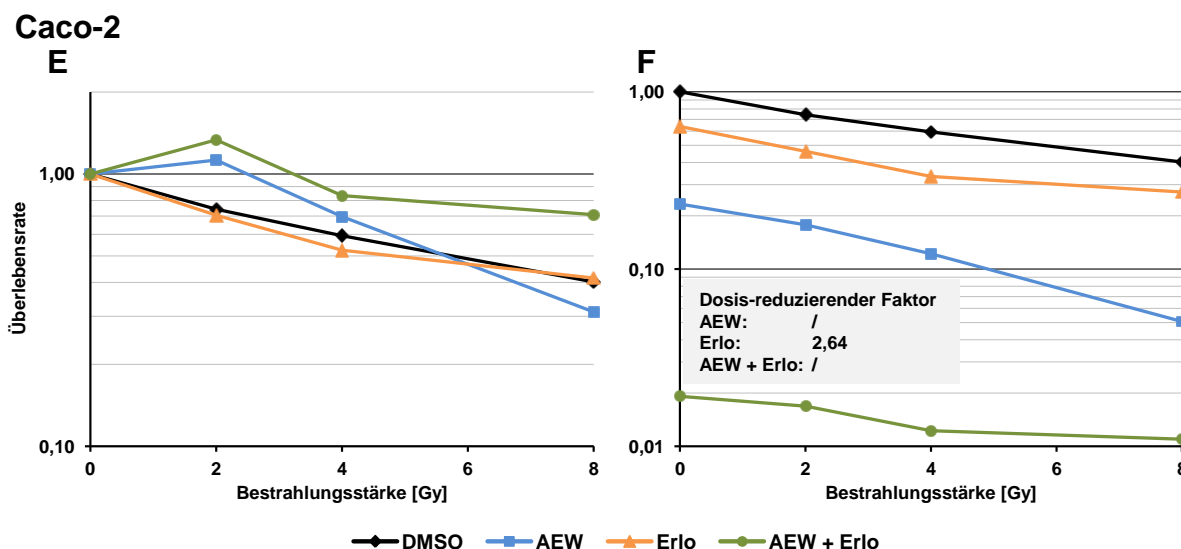


Abbildung 3.11 Ansprechen von kolorektalen Karzinomzelllinien auf die kombinierte Radiochemotherapie und die Inhibition des EGFR, des IGF-IR bzw. beider Rezeptoren in Kombination.

Definierte Zellzahlen (2.20) der drei Zelllinien DLD-1 (A, B), SW837 (C, D) und Caco-2 (E, F) wurden einer kombinierten Radiochemotherapie mit 3 μ M 5-Fluoruracil und 0, 2, 4 oder 8Gy unterzogen. Zusätzlich wurden die Zellen durchgehend mit 1 μ g/ml des EGFR-Inhibitors Erlotinib (Erlo), 1 μ M des IGF-IR-Inhibitors AEW 541 (AEW) oder der Kombination aus beiden Inhibitoren behandelt. Anschließend wurde die Überlebensrate der Zellen bestimmt. Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Bei den Berechnungen wurde diskriminiert zwischen der reinen Sensibilisierung (Überlebensraten in Relation zur jeweiligen nicht bestrahlten Kontrolle A, C, E) und dem Therapieeffekte (Überlebensraten in Relation zur nicht bestrahlten und mit DMSO behandelten Kontrolle B, D, F). Für beide Gruppen wurde ebenfalls der Dosisreduzierende Faktor (DRF) berechnet. Es wurden für alle Zelllinien drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt. Die simultane Inhibition des EGFR und des IGF-IR führte in DLD-1-Zellen zu einer Sensibilisierung der Zellen und zu einem deutlichen Therapieeffekt. In SW837-Zellen führte die alleinige Inhibition des EGFR oder IGF-IR zu einer Sensibilisierung und einem besseren Therapieansprechen der Zellen. Der Effekt der gemeinsamen Inhibition war deutlich stärker. Die Bestrahlung brachte keinen zusätzlichen Therapienutzen, und der DRF war nicht mehr zu bestimmen. Für die Caco-2-Zellen war aufgrund des hohen Therapieeffekts durch die Rezeptor-Inhibition keine erhöhte Sensibilisierung nachzuweisen. Für die IGF-IR-Inhibition und die kombinierte Inhibition war der Effekt so groß, dass die Bestrahlung keinen zusätzlichen Nutzen mehr aufwies. Der DRF war deshalb nicht mehr zu bestimmen. Die Sterberate bei kombinierter Inhibition lag bei über 99%.

3.2.2 Einfluss der Inhibition des EGFR und IGF-IR bei der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen *in vivo*

Um zu überprüfen, ob die Inhibition des EGFR, des IGF-IR oder die kombinierte Inhibition beider Rezeptoren auch *in vivo* zu einer erhöhten Sterblichkeit und Sensibilisierung der bestrahlten Zellen führt, wurde eine kombinierte 5-FU-basierte Radiochemotherapie an Xenografttumoren aus DLD-1- bzw. SW837-Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Tiere mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib, dem IGF-IR-Tyrosinkinaseinhibitor AEW-541 oder einer Kombination aus beiden Inhibitoren behandelt. Den Kontrolltieren wurden lediglich die jeweiligen Lösungsmittel der Inhibitoren verabreicht. Zunächst wurden 7,5 x 10⁵ Zellen

subkutan ventral in den Abdominalbereich immundefizienter Nacktmäuse (CD1-Foxn1^{NU}) auf beiden Körperseiten injiziert. Direkt nach der Injektion wurden die Mäuse randomisiert den verschiedenen Behandlungsgruppen zugeordnet und so lange weiter gehalten, bis die Tumore ein durchschnittliches Volumen von 200mm³ erreicht hatten. Alle Gruppen wurden an den ersten drei Behandlungstagen mit 25mg/kg Körpergewicht 5-FU und 1,8Gy behandelt. Die Gabe von 5-FU erfolgte eine Stunde vor der Bestrahlung intraperitoneal. Die Behandlung mit den Inhibitoren startete ebenfalls am ersten Behandlungstag und wurde über zwei Wochen fortgesetzt (siehe Behandlungsschema Abbildung 3.12). Die Inhibitoren wurden oral mit einer Schlundsonde verabreicht, wobei die Dosierung bei Erlotinib und AEW-541 bei 20mg/kg Körpergewicht lag. Bei den DLD-1-Tumoren wurden vier Tiere mit Erlotinib, fünf Tiere mit AEW-541 und fünf Tiere mit der Kombination der Inhibitoren behandelt. Sieben Tiere bekamen nur die jeweiligen Lösungsmittel verabreicht. Für die SW837-Tumore konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich ein Vorversuch durchgeführt werden. Zwei Tiere erhielten die Lösungsmittelkontrolle und drei die Inhibitorkombination AEW-541 und Erlotinib. Die Tumore wurden mit Beginn der Behandlung täglich mit einer Schieblehre vermessen, wobei zur Bestimmung des Tumolvolumens die Formel $V = \text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times 0,5$ angewendet wurde. Hatte ein Tier die Abbruchkriterien erreicht (Tumolvolumen = 1500mm³), so wurde der Versuch beendet.

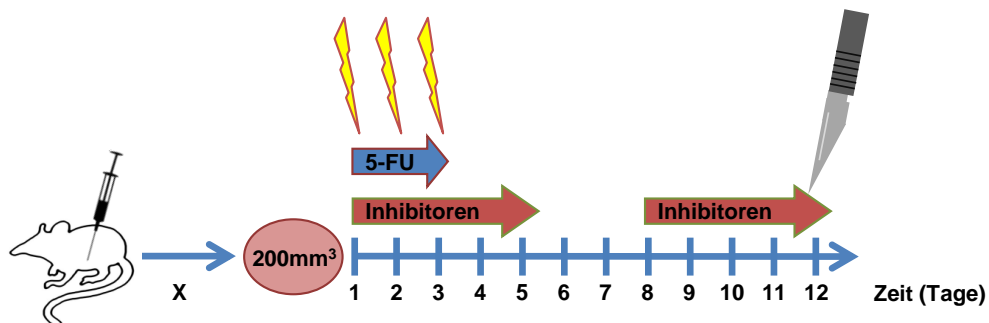


Abbildung 3.12 Behandlungsschema der Xenograftumore.

Zunächst wurden die Tumorzellen subkutan ventral in den Abdominalbereich immundefizienter Nacktmäuse injiziert. Bei einer durchschnittlichen Tumorgöße von 200mm³ startete die Therapie. An den ersten drei Therapietagen erfolgten eine Bestrahlung mit 1,8Gy und eine Behandlung mit 25mg/kg Körpergewicht 5-Fluoruracil (5-FU). An den ersten fünf Therapietagen erfolgte eine Behandlung mit 20mg/kg Körpergewicht des EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib, des IGF-IR-Tyrosinkinaseinhibitors AEW-541 oder einer Kombination aus beiden Inhibitoren. Nach einer zweitägigen Behandlungspause erfolgten weitere fünf Behandlungstage mit den Inhibitoren. Die Kontrolltiere erhielten lediglich das Lösungsmittel der Inhibitoren. Am letzten Behandlungstag wurden die Tiere getötet und die Tumore präpariert.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass die Inhibition des EGFR, des IGF-IR oder die Kombination beider Inhibitoren keinen Einfluss auf die Tumorprogression der DLD-1-Xenograftumore hatte (Abbildung 3.13 A). Im Gegensatz dazu führte die kombinierte

Inhibition der Rezeptoren in den SW837-Xenografttumoren zu einer verlangsamten Tumorprogression (Abbildung 3.13 B).

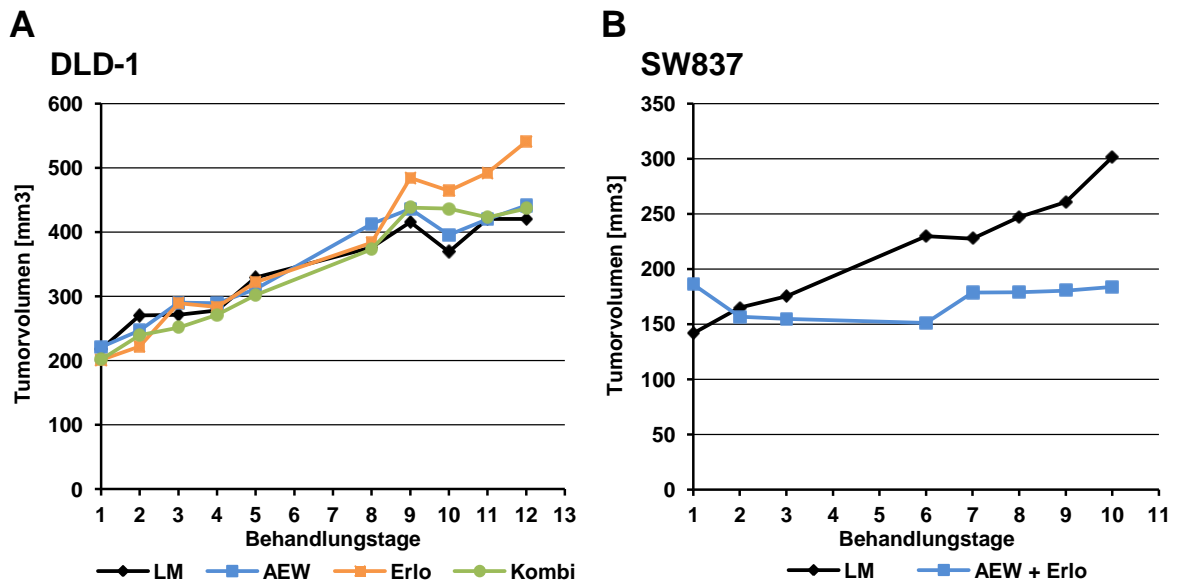


Abbildung 3.13 Tumorprogression von Xenografttumoren der Zelllinien DLD-1 und SW837 nach 5-FU-basierter Radiochemotherapie und Inhibition des EGFR des IGF-IR bzw. beider Rezeptoren in Kombination.

Immundefiziente Nacktmäuse mit Xenografttumoren der Zelllinien DLD-1 (A) und SW837 (B) wurden einer kombinierten Radiochemotherapie unterzogen. Zusätzlich wurde den Tieren 20mg/kg Körpergewicht des EGFR-Inhibitors Erlotinib (Erlo), des IGF-IR-Inhibitors AEW-541 (AEW) bzw. die Kombination beider Inhibitoren (AEW + Erlo) verabreicht. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel (LM). Die Behandlung erfolgte nach dem Behandlungsschema (siehe Abbildung 3.12). Bei den DLD-1-Tumoren wurden vier Tiere mit Erlotinib, fünf Tiere mit AEW-541 und fünf Tiere mit der Kombination behandelt. Sieben Tiere bekamen nur Lösungsmittel. Bei den SW837-Tumoren erhielten zwei Tiere die Lösungsmittelkontrolle und drei die Inhibitorkombination. Es zeigte sich, dass die Inhibition der Rezeptoren in DLD-1-Xenografttumoren keinen Einfluss auf das Progressionsverhalten hat. In den SW837-Xenografttumoren führte die kombinierte Inhibition von EGFR und IGF-IR zu einer verminderten Progression.

3.3 Analysen zum *crossstalk*-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, den *crossstalk*-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR zu analysieren. Zunächst wurde die Expression der beiden Rezeptoren in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR (qRT-PCR) bestimmt (Abbildung 3.14). Die qRT-PCR wurde zweimal durchgeführt, wobei sowohl für den EGFR wie auch für den IGF-IR zwei unabhängige Primerpaare verwendet wurden.

Sowohl für den EGFR als auch für den IGF-IR zeigte die Zelllinie SW480 die höchste Expression. Aufgrund dieses Ergebnisses und ihren Eigenschaften in der Zellkultur wurde sie für die weiteren Experimente ausgewählt. DLD-1-Zellen wurden zum Vergleich mitgeführt.

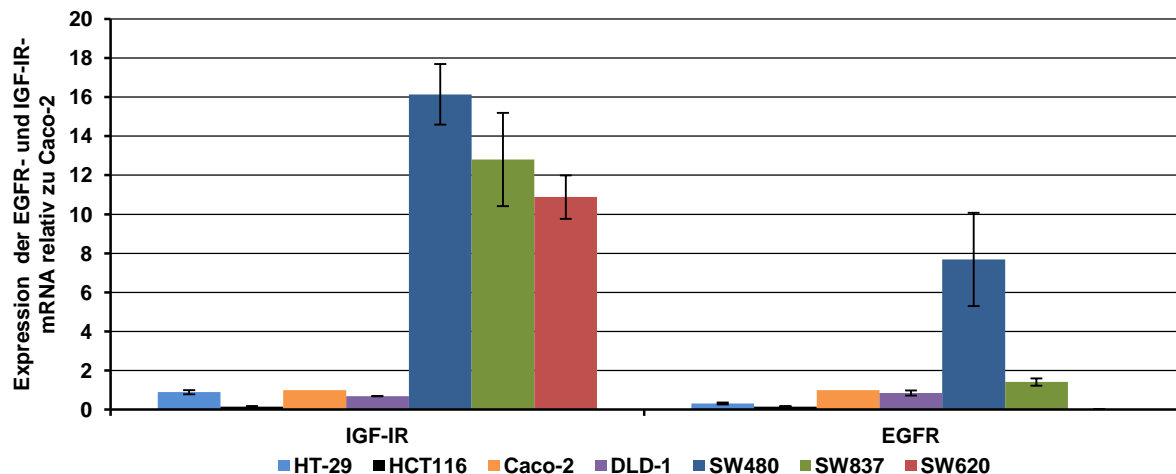


Abbildung 3.14 Vergleich der EGFR- und IGF-IR-mRNA-Expression in verschiedenen kolorektalen Zelllinien.

Die Expression des EGFR und des IGF-IR wurde in verschiedenen kolorektalen Zelllinien auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR verglichen. Die qRT-PCR wurde zweimal durchgeführt, wobei sowohl für den EGFR wie auch für den IGF-IR zwei unabhängige Primerpaare verwendet wurden.

3.3.1 Nachweis von Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation

Mittels der Technik der Co-Immunpräzipitation sollte geklärt werden, ob der EGFR und der IGF-IR Hybridrezeptoren bilden. Zunächst wurden SW480- und DLD-1-Zellen 24h unter reduzierten Serumkonditionen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 10min mit 10ng/ml EGF und 10nM IGF-I stimuliert und nach Protokollangaben die Proteine isoliert. Die Immunpräzipitation erfolgte dann mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen den EGFR oder den IGF-IR. Für beide Zelllinien wurde die Präzipitation sowohl für den EGFR als auch für den IGF-IR durchgeführt. Außerdem wurde als Kontrolle eine Präzipitation mit sog. Kontroll-beads durchgeführt, die nicht mit einem Antikörper verbunden waren. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend zusammen mit nicht präzipitiertem Kontrolllysate mit Hilfe einer Western Blot-Analyse ausgewertet (Abbildung 3.15). Sowohl für die SW480- als auch für die DLD-1-Zellen ließ sich nach der Präzipitation des EGFRs oder des IGF-IRs mit einem spezifischen Antikörper in der Western Blot-Analyse der jeweils andere Rezeptor nachweisen (Abbildung 3.15).

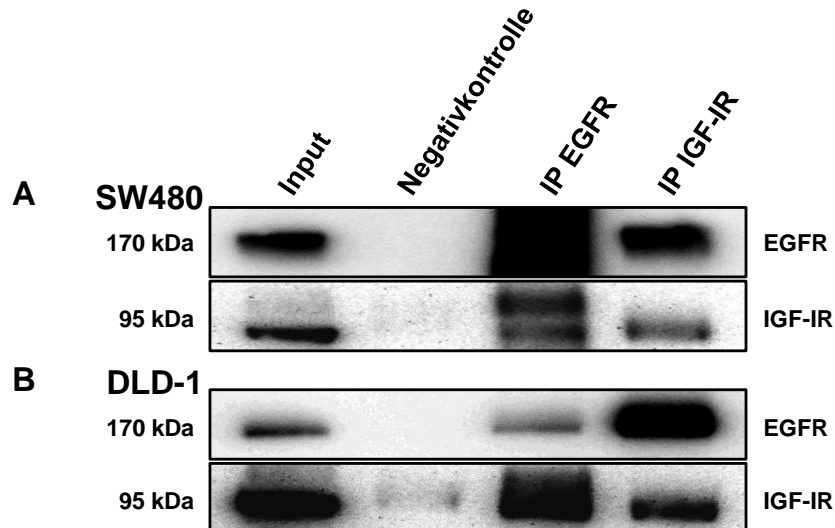


Abbildung 3.15 Nachweis der Interaktionen zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation.

Sowohl für SW480- (A) als auch für DLD-1-Zellen (B) ließ sich nach der Präzipitation des EGFR oder des IGF-IR mit einem spezifischen Antikörper in der Western Blot-Analyse auch der jeweils andere Rezeptor nachweisen. Als Positivkontrolle diente nicht präzipitiertes Lysat (Input), für die Negativkontrolle wurde die Präzipitation mit Kontroll-*beads* durchgeführt.

3.3.2 Nachweis von Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe des *Proximity Ligation Assays*

Die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitation sollten mit der unabhängigen Methode des *Proximity Ligation Assay* (PLA) an SW480- und DLD-1-Zellen bestätigt werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob sich die Anzahl der Hybridrezeptoren pro Zelle durch die Stimulierung mit den Liganden EGF und IGF-I erhöhen lässt. Der Assay basiert auf immunzytochemischen Methoden und zeigt Proteininteraktionen direkt in der fixierten Zelle. Die Interaktionen werden mit einem fluoreszierenden Signal sichtbar gemacht (2.16.1). Zunächst wurden SW480- und DLD-1-Zellen auf *4-well*-Zellkulturobjektträgern 24h unter reduzierten Serumkonditionen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder unstimuliert gelassen oder für 2 oder 5min mit 10ng/ml EGF und 10nM IGF-I stimuliert, fixiert und der PLA nach Herstellerangaben mit den Antikörpern gegen EGFR bzw. IGF-IR durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Assay mit nur einem primären Antikörper durchgeführt. Die Auswertung des Assays erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) (Abbildung 3.16). Um die Stimulierbarkeit der Tumorzellen zu überprüfen, wurde die Anzahl der Interaktionen pro Zelle der verschiedenen Fraktionen ausgezählt und relativ zur nicht stimulierten Fraktion graphisch dargestellt. Der PLA wurde für jede Zelllinie dreimal durchgeführt. Dabei wurden von jeder Fraktion mindestens 150 Zellen ausgewertet und die Ergebnisse anschließend gemittelt (Abbildung 3.16).

In den SW480-Zellen führte die Stimulation mit den Liganden nach 2min zu einer 2,4fachen, und nach 5min zu einer fünffachen Zunahme der Heterodimere pro Zelle. In den DLD-1-Zellen war dieser Effekt schwächer ausgeprägt. Hier konnte 5min nach Stimulation lediglich eine Zunahme der Hybridrezeptoren pro Zelle um das 1,4fache nachgewiesen werden. Da nach der Stimulation der Anstieg in der Anzahl der Heterodimere pro Zelle in den SW480-Zellen deutlich größer war als in den DLD-1-Zellen, wurden für die weiteren PLA-Analysen die SW480-Zellen verwendet.

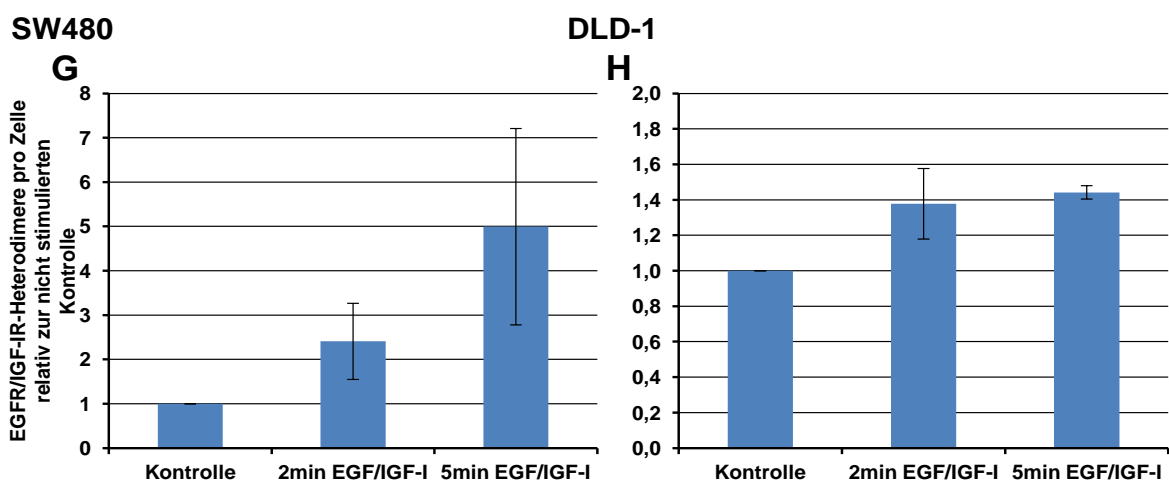
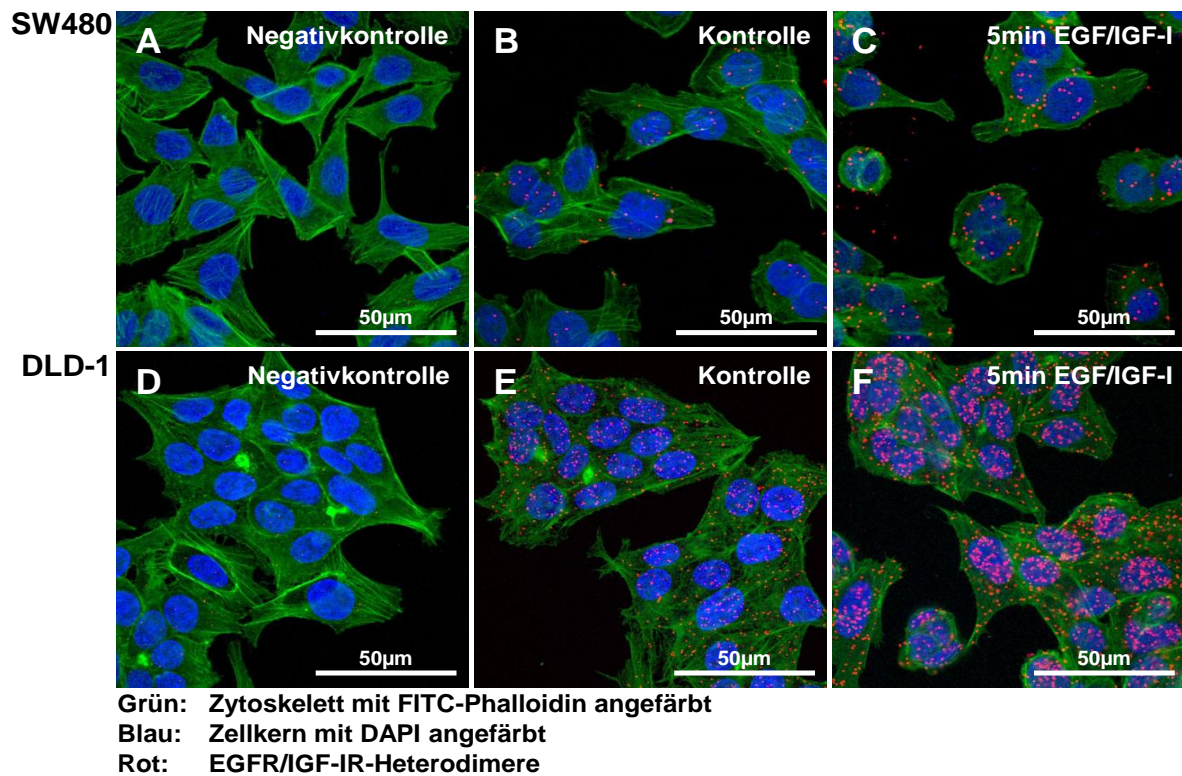


Abbildung 3.16 Nachweis von Heterodimeren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR und der Induzierbarkeit dieser mit Hilfe des *Proximity Ligation Assays* (PLA).

Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die SW480- und DLD-1-Zellen mit den Liganden EGF und IGF-I stimuliert, fixiert und mit Hilfe des Assays die Interaktionen von EGFR und IGF-IR mit einem rot fluoreszierenden Signal sichtbar gemacht. Mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) wurden dann Bilder der

fluoreszierenden Strukturen erstellt und ausgewertet (Vergrößerung: 600x). (A-C) PLA an SW480-Zellen. (D-F) PLA an DLD-1-Zellen. Für die Auswertung wurde für jede Fraktion die Anzahl der EGFR/IGF-IR-Heterodimere pro Zelle ermittelt. Dargestellt ist die Anzahl an Heterodimeren pro Zelle relativ zur nicht stimulierten Kontrolle für die Zelllinien SW480 (G) und DLD-1 (H). Der PLA wurde für jede Zelllinie dreimal durchgeführt, und für jede Fraktion wurden jeweils mindestens 150 Zellen ausgewertet. In den DLD-1-Zellen stieg die Anzahl der Hybridrezeptoren 2min bzw. 5min nach der Stimulation um ca. 40% an. In den SW480-Zellen stieg die Anzahl der Hybridrezeptoren 2min nach der Stimulation um mehr als das Doppelte an. Nach 5min Stimulation war die Anzahl der Hybridrezeptoren um das Fünffache angestiegen.

3.3.3 Einfluss der jeweiligen Liganden auf die Hybridrezeptorbildung

Um zu überprüfen, ob beide Liganden für die Induktion der Hybridrezeptoren von EGFR und IGF-IR in SW480-Zellen notwendig sind, wurde erneut ein PLA nach Stimulation der Zellen mit jeweils nur einem Liganden durchgeführt. In Abbildung 3.17 sind die Anzahl der Interaktionen pro Zelle der verschiedenen Fraktionen relativ zur nicht stimulierten Kontrolle graphisch dargestellt. Weder mit EGF noch mit IGF-I allein konnte ein Anstieg in der Anzahl der Heterodimere pro Zelle induziert werden.

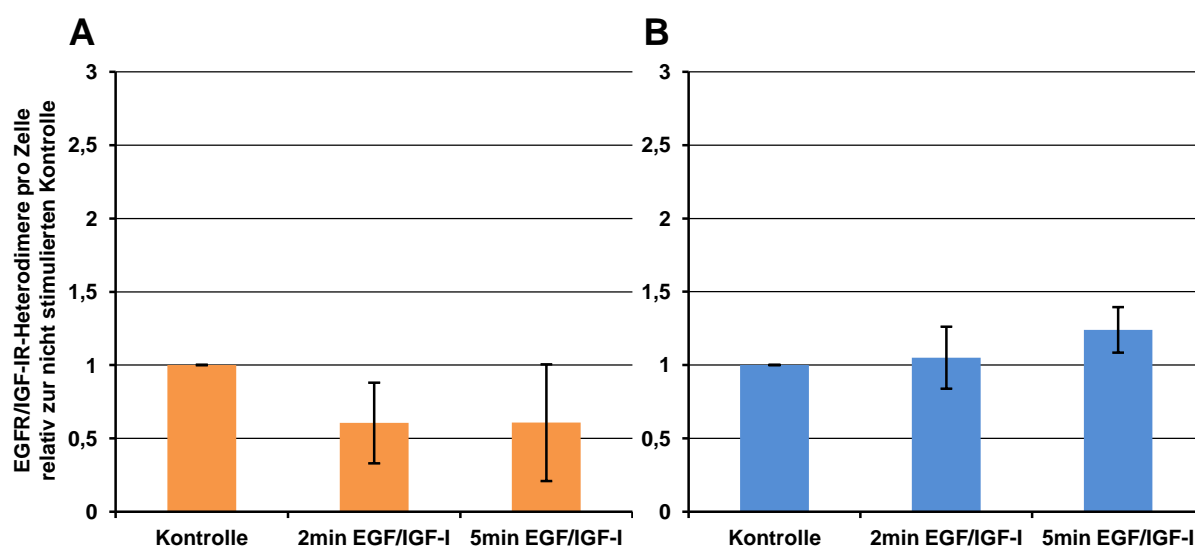


Abbildung 3.17 Nachweis der Notwendigkeit der Anwesenheit beider Liganden für die Induktion der EGFR/IGF-IR-Heterodimere mit Hilfe des PLA.

Der PLA wurde an SW480-Zellen durchgeführt, die für 2 oder 5min mit EGF (A) bzw. IGF-I (B) stimuliert wurden. Dargestellt ist die Anzahl der Heterodimere pro Zelle relativ zur nicht stimulierten Kontrolle. Weder mit EGF noch mit IGF-I allein konnte ein Anstieg in der Anzahl der Heterodimere pro Zelle induziert werden. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.4 Einfluss der Funktionsfähigkeit des EGFR und IGF-IR auf die Bildung von Heterodimeren

Es sollte analysiert werden, ob sowohl der EGFR als auch der IGF-IR funktionsfähig sein müssen um Hybridrezeptoren zu bilden. Dafür wurde der PLA mit SW480-Zellen

durchgeführt, in denen jeweils einer der Rezeptoren inhibiert worden war. Einerseits wurden die Ligandenbindungsstellen mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper blockiert (Cetuximab = EGFR und mAb391 = IGF-IR), andererseits wurde die Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren mittels spezifischer Inhibitoren reduziert (Erlotinib und AEW-541). Die SW480-Zellen wurden zunächst 24h unter reduzierten Serumkonditionen kultiviert. Nach Behandlung mit den entsprechenden Inhibitoren für 2h erfolgte die Stimulation mit 10ng/ml EGF und 10nM IGF-I für 2 oder 5min. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben. In Abbildung 3.18 sind die Anzahl der Interaktionen pro Zelle der verschiedenen Fraktionen relativ zu den nicht stimulierten Kontrollen graphisch dargestellt. Die Auswertung des PLA zeigte, dass beide Rezeptoren funktionsfähig sein müssen, damit eine Bildung von Heterodimeren induziert werden kann. Dabei gab es keinen Unterschied, ob die Bindungsstellen für den Liganden mit spezifischen Antikörpern oder ob die Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren mittels spezifischer Inhibitoren geblockt wurden.

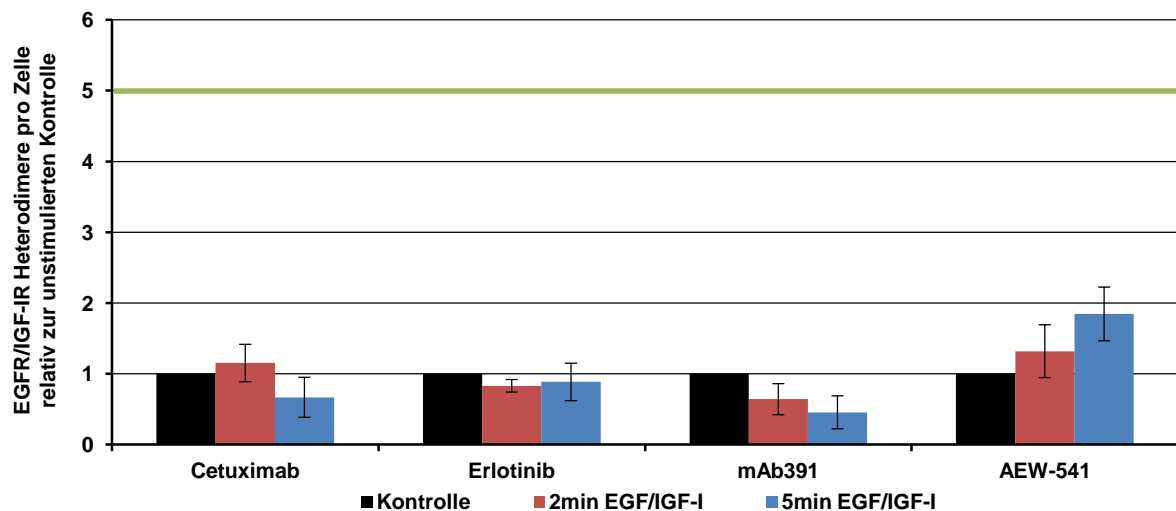


Abbildung 3.18 Analysen zur Notwendigkeit der Funktionsfähigkeit beider Rezeptoren für die EGFR/IGF-IR-Hybridrezeptor-Bildung.

Der PLA wurde mit SW480-Zellen durchgeführt, in denen jeweils einer der Rezeptoren inhibiert worden war. Die Ligandenbindungsstellen von EGFR und IGF-IR wurden mit den spezifischen Antikörpern Cetuximab (EGFR) bzw. mAb391 (IGF-IR) blockiert, die Tyrosinkinaseaktivität wurde mit Hilfe der *small molecule*-Inhibitoren Erlotinib (EGFR) bzw. AEW-541 (IGF-IR) inhibiert. Nach Serumentzug erfolgte die Stimulation der Zellen mit EGF und IGF-I für die angegebenen Zeitpunkte. Dargestellt ist die Anzahl der Heterodimere pro Zelle relativ zur nicht stimulierten Kontrolle für die verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten. Sowohl die Blockade der Ligandenbindungsstellen als auch die Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität beider Rezeptoren führte dazu, dass sich die Bildung der Heterodimere nicht mehr induzieren ließ (grüne Linie).

3.3.5 Nachweis von Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe des PLA in humanen Rektumtumoren

Um zu überprüfen, ob die EGFR/IGF-IR-Heterodimere auch in humanen Rektumtumoren auftreten, wurde der PLA an Gewebeschnitten von neun in Paraffin eingebetteten humanen Rektumtumoren durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden von der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt und stammten aus der CAO-95-Studie. Für alle erhaltenen Proben war bekannt, dass sie sowohl den EGFR als auch den IGF-IR im Tumorgewebe exprimieren. Für sechs der Proben sind exemplarisch Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop dargestellt (Abbildung 3.19). Für alle neun getesteten Gewebeschnitte konnten EGFR/IGF-IR-Heterodimere im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die Anzahl der nachgewiesenen Heterodimere pro Zelle war zwischen den verschiedenen Proben sehr unterschiedlich.

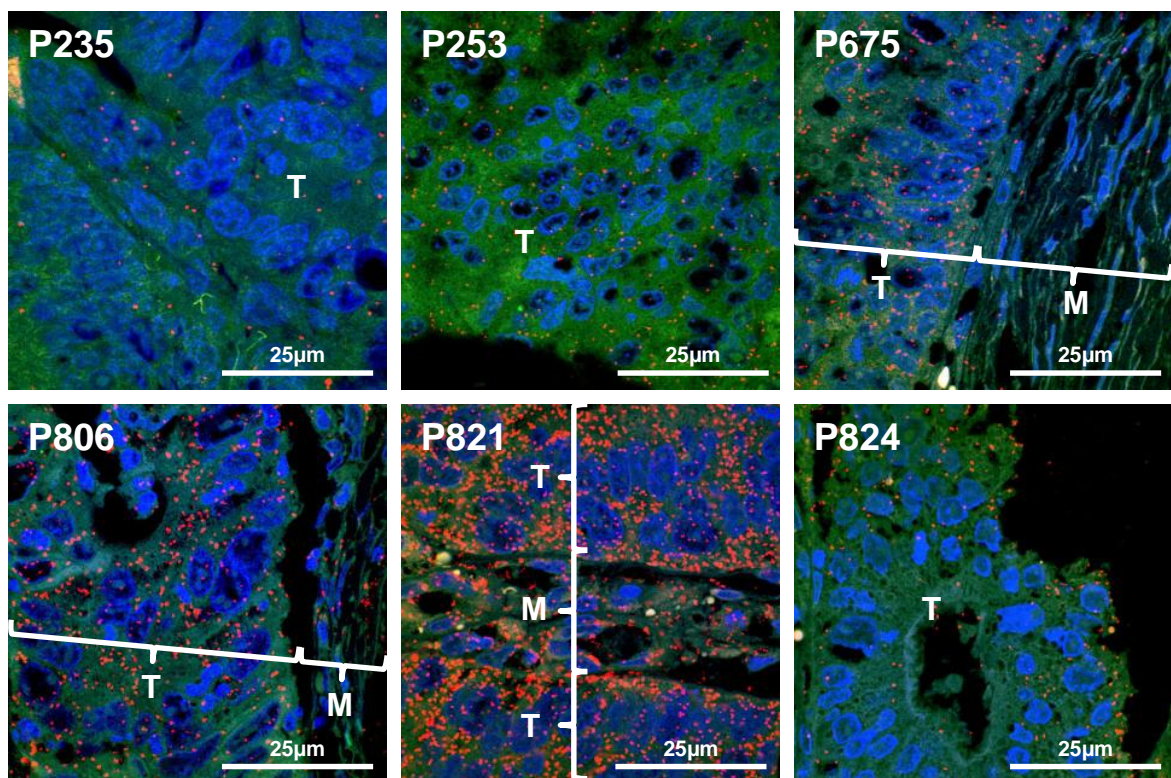


Abbildung 3.19 Nachweis von Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR mit Hilfe des PLA in humanen Rektumtumoren.

Der PLA wurde an Gewebeschnitten von neun in Paraffin eingebetteten humanen Rektumtumoren durchgeführt. Zusätzlich wurden das Zytoskelett der Zellen mit FITC-Phalloidin (grün) und der Zellkern mit DAPI (blau) gefärbt. Die Bilder wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) bei 600-facher Vergrößerung aufgenommen. Bilder von sechs verschiedenen Tumoren sind exemplarisch dargestellt. Für alle neun getesteten Gewebeschnitte konnten EGFR/IGF-IR-Heterodimere im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die Anzahl der nachgewiesenen Heterodimere war zwischen den verschiedenen Proben sehr heterogen. T: Tumorgewebe, M: mesenchymales Gewebe.

3.4 Der Einfluss des PDGFR- β in kolorektalen Karzinomzellen

Die Bedeutung des EGFR und des IGF-IR im kolorektalen Karzinom ist hinreichend dargestellt. Es sollte der Einfluss weiterer Rezeptortyrosinkinasen untersucht werden. Ein vielversprechender Kandidat stellte hierbei der PDGFR- β (*Platelet-derived Growth Factor Receptor*) dar. Wie der EGFR und der IGF-IR fördert seine Aktivierung über den PI3K- und den MAPK-Signalweg Proliferation und Zellüberleben (Nishioka *et al.*, 2008).

3.4.1 Analyse der PDGFR- β -Expression in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien

Zunächst sollte die Expression des PDGFR- β mit Hilfe der qRT-PCR und der Western Blot-Analyse in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien verglichen werden. Die getesteten Zelllinien waren HT-29, HCT116, Caco-2, DLD-1, SW480 und SW837. Die qRT-PCR wurde insgesamt fünfmal durchgeführt, wobei für den PDGFR- β zwei verschiedene Primerpaare verwendet wurden. Die Expression des PDGFR- β in den verschiedenen Zelllinien wurden in Relation zur Expression des PDGFR- β in Caco-2-Zellen gesetzt, gemittelt und graphisch dargestellt (Abbildung 3.20 A). Für die Western Blot-Analysen wurden ein PDGFR- β -spezifischer Antikörper sowie als Kontrolle ein α -Tubulin-spezifischer Antikörper eingesetzt (Abbildung 3.20 B).

Auf mRNA-Ebene zeigte die Kolonkarzinomzelllinie SW480 die höchste PDGFR- β -Expression. Die Expression war 1,9fach stärker als in den Caco-2-Zellen. Die Zelllinien HAT-29, HCT116 und SW837 wiesen eine deutlich niedrigere Expression als die Caco-2-Zellen auf. Auf Proteinebene konnten die Ergebnisse der qRT-PCR weitestgehend bestätigt werden. Nur die SW837-Zellen zeigten auf Proteinebene eine deutlich höhere Expression als auf mRNA-Ebene. Die Western Blot-Analyse zeigte außerdem, dass der PDGFR- β in drei verschiedenen Isoformen bzw. drei verschieden stark glykosylierten Formen auftritt. Das Mengenverhältnis dieser war für die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die nachfolgenden Experimente mit der Zelllinie SW480 durchgeführt.

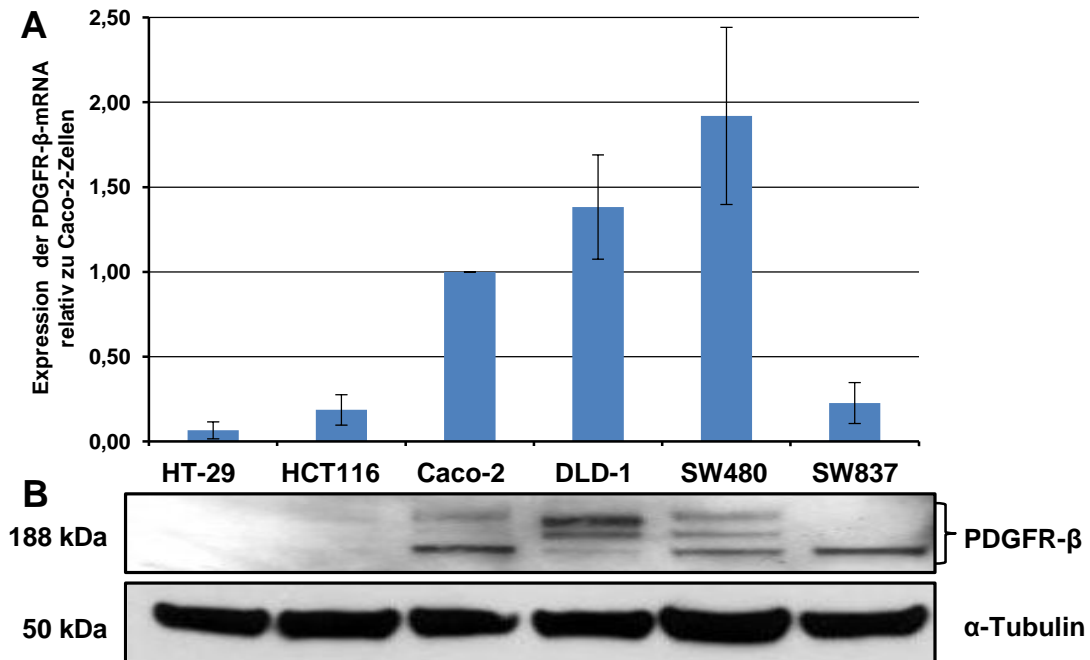


Abbildung 3.20 Expressionsanalysen des PDGFR-β in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien.

Die Expression des PDGFR-β wurde in den angegebenen kolorektalen Zelllinien mittels qRT-PCR- (A) - und Western Blot-Analysen (B) verglichen. (A) Die Expression der PDGFR-β-mRNA in den verschiedenen Zelllinien wurde in Relation zur PDGFR-β-Expression in den Caco-2-Zellen gesetzt. Die qRT-PCR wurde fünfmal durchgeführt und die Ergebnisse wurden gemittelt. (B) Zur Analyse der PDGFR-β-Protein-Expression wurde ein spezifischer Antikörper verwendet. Als Kontrolle wurde ein spezifischer Antikörper gegen α-Tubulin verwendet. Auf mRNA-Ebene zeigte die Kolonkarzinomzelllinie SW480 die höchste PDGFR-β Expression. Auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse weitestgehend bestätigt werden. Nur die SW837-Zellen zeigten auf Proteinebene eine deutlich höhere Expression von PDGFR-β als auf mRNA-Ebene.

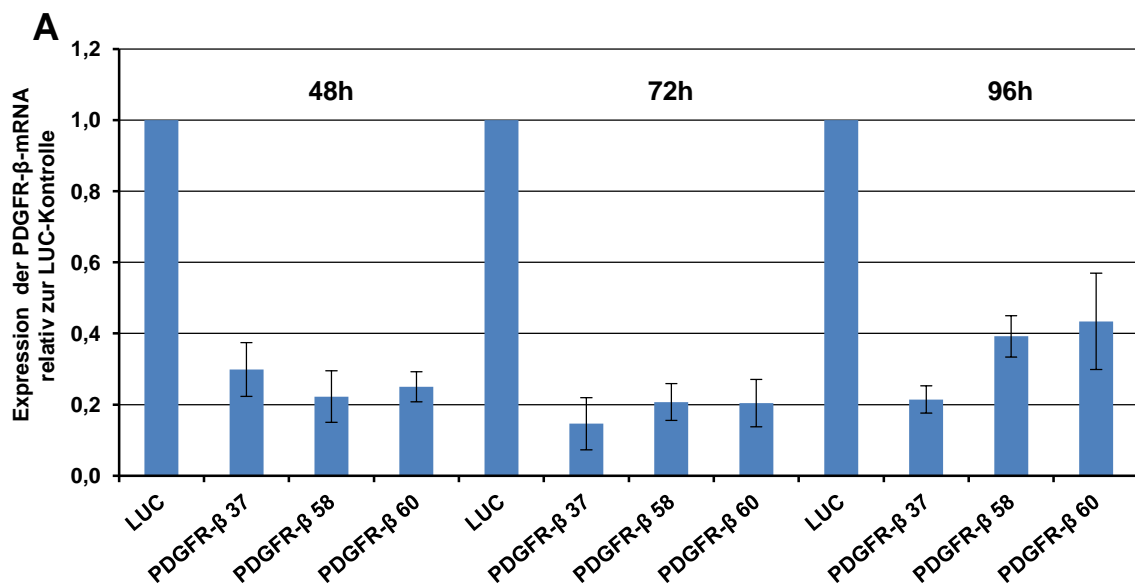
3.4.2 Inhibition des PDGFR-β in SW480-Zellen

Um den Einfluss und die Funktion des PDGFR-β in kolorektalen Karzinomen zu untersuchen, wurde dieser in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 auf zwei verschiedene Arten inhibiert. Zum einen wurde die Expression des PDGFR-β mittels spezifischer siRNAs inhibiert, zum anderen wurde die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors mit dem *small molecule*-Inhibitor Ki11502 (MERCK, Darmstadt) inhibiert. Für die Inhibition der PDGFR-β-Expression wurden stets die drei verschiedenen spezifischen siRNAs 37, 58 und 60 verwendet. Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen die mRNA des Luciferasegens des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (LUC) verwendet. Für die Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität mit dem Inhibitor Ki11502 wurden die Konzentrationsstufen 10nM, 1μM, 5μM und 20μM verwendet. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt, da der Inhibitor darin gelöst vorlag.

3.4.2.1 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der PDGFR- β -spezifischen siRNAs

Zunächst sollte überprüft werden, ob die drei PDGFR- β -spezifischen siRNAs 37, 58 und 60 die Expression des PDGFR- β inhibieren. Dies geschah mit Hilfe der qRT-PCR- und der Western Blot-Analyse. Zunächst wurden SW480-Zellen mit je einer der drei verschiedenen siRNAs transfiziert und nach 48h, 72h und 96h wurden RNA und Proteine isoliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase transfiziert. Die Transfektion der SW480-Zellen wurde dreimal wiederholt, und für jede RNA-Fraktion wurde die qRT-PCR zweimal mit zwei unabhängigen spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden anschließend gemittelt. Die PDGFR- β -mRNA-Expression der transfizierten Zellen wurde relativ zur LUC-Kontrolle dargestellt (Abbildung 3.21 A). Für die Western Blot-Analysen wurden jeweils 100 μ g des isolierten Proteins verwendet. Die Analysen erfolgten mit einem PDGFR- β -spezifischen Antikörper. Als Kontrolle wurde ein α -Tubulin-spezifischer Antikörper verwendet (Abbildung 3.21 B).

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigte sich, dass die drei verwendeten siRNAs optimal funktionierten. 72h nach der Transfektion war das Expressionslevel des PDGFR- β bei den mit den siRNAs 37, 58 oder 60 behandelten Zellen auf mRNA-Ebene auf ca. 20% der Expressionsstärke der Kontrollzellen gesunken. Auch auf Proteinebene zeigten die mit der PDGFR- β -siRNA behandelten Zellen 48h und 72h nach der Transfektion eine deutliche Herunterregulation der PDGFR- β -Expression.



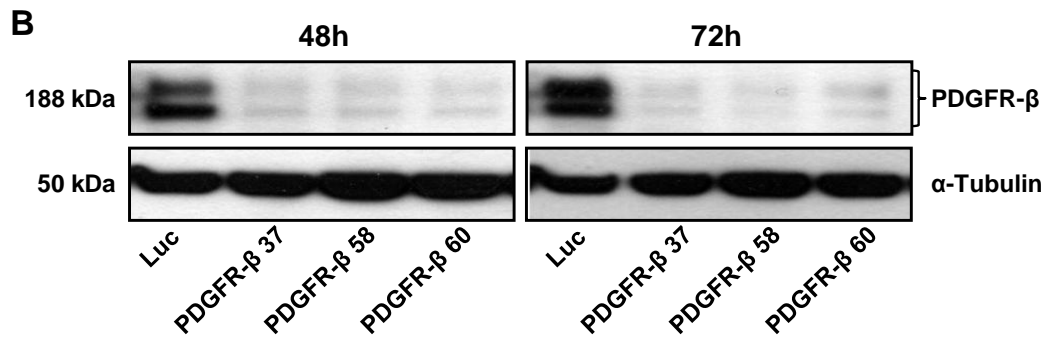


Abbildung 3.21 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der verwendeten PDGFR- β -spezifischen siRNAs mittels qRT-PCR- und Western Blot-Analyse.

SW480-Zellen wurden mit den PDGFR- β -spezifischen siRNAs 37, 58 oder 60 transfiziert. Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen Luciferase (LUC) eingesetzt. 48h, 72h und 96h nach der Transfektion wurden RNA und Proteine der Zellen isoliert und die PDGFR- β -Expression mittels qRT-PCR (A) und Western Blot-Analyse (B) sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene überprüft. (A) Dargestellt ist die PDGFR- β -mRNA-Expression der transfizierten SW480-Zellen relativ zur LUC-transfizierten Kontrolle 48h, 72h und 96h nach Transfektion. Die Transfektion der SW480-Zellen wurde dreimal wiederholt und für jede RNA-Fraktion wurde die qRT-PCR zweimal mit zwei unabhängigen spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend gemittelt. (B) Gezeigt ist die PDGFR- β -Proteinexpression der transfizierten SW480-Zellen 48h und 72h nach der Transfektion. Zur Analyse wurde ein spezifischer PDGFR- β -Antikörper verwendet. Als Kontrolle wurde ein spezifischer Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigte sich, dass die drei verwendeten siRNAs die Expression des PDGFR- β deutlich inhibierten.

3.4.2.2 Einfluss der PDGFR- β -Inhibition auf die Expression des EGFR und des IGF-IR

Mittels der qRT-PCR sollte überprüft werden, ob die Inhibition des PDGFR- β mit Hilfe von siRNA oder des Inhibitors Ki11502 zu einer veränderten Expression des EGFR oder des IGF-IR führt. Dafür wurden SW480-Zellen mit je einer der drei siRNAs PDGFR- β -37, 58 und 60 transfiziert und für 72h inkubiert. Als Kontrolle diente eine siRNA gegen Luciferase. Außerdem wurden SW480-Zellen 48h bzw. 72h mit 5 μ M Ki11502 oder dessen Lösungsmittel DMSO inkubiert. Als Kontrolle dienten hier nicht behandelte Zellen. Nach Ende der Inkubationszeit wurde jeweils die RNA isoliert und für die qRT-PCR verwendet. Die siRNA-Transfektion wurde dreimal, die Inhibitorbehandlung zweimal durchgeführt. Die RNA wurde dann jeweils für zwei unabhängige qRT-PCRs mit je zwei unabhängigen Primerpaaren verwendet (Abbildung 3.22). Weder die siRNA- noch die Inhibitorbehandlung führten zu einer veränderten Expression der EGFR- oder IGF-IR-mRNA.

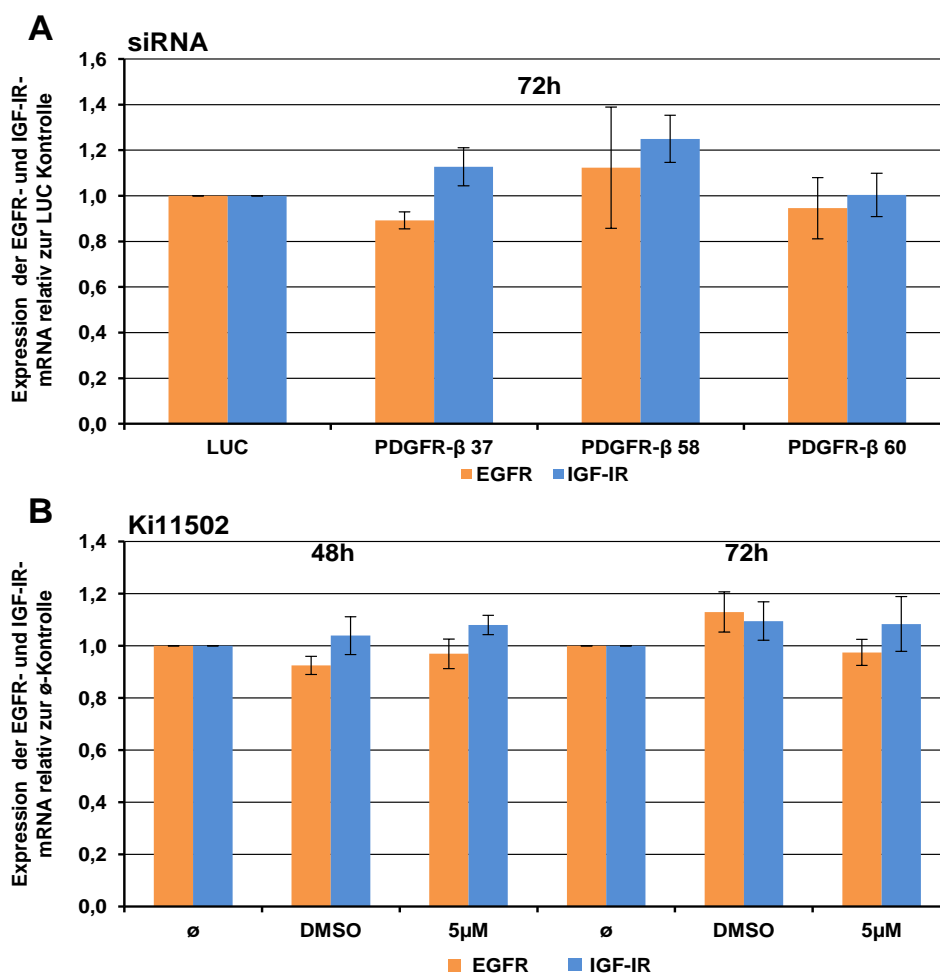


Abbildung 3.22 Expressionsanalyse der EGFR- und IGF-IR-mRNA nach PDGFR- β -Inhibition in SW480-Zellen mit Hilfe der qRT-PCR.

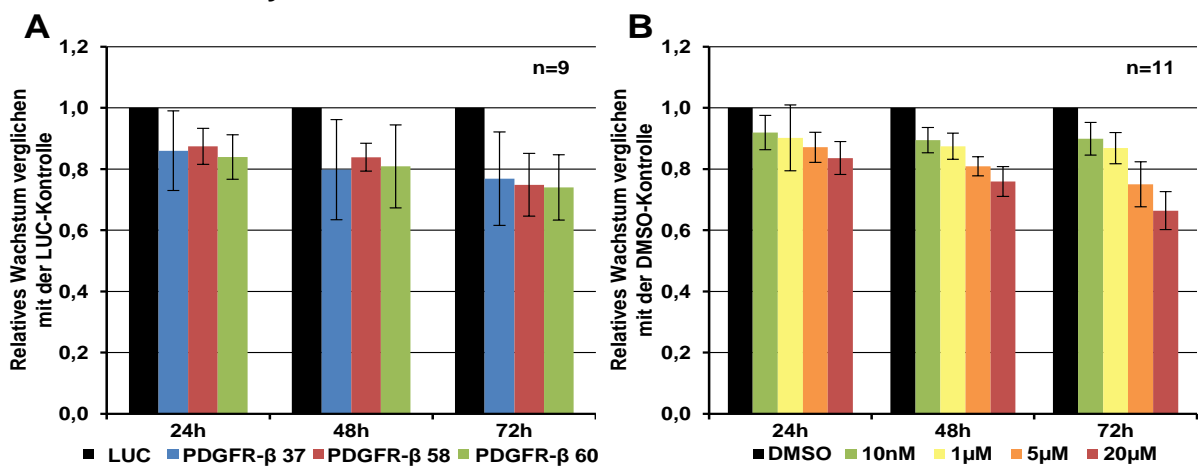
Die Expression des PDGFR- β wurde in SW480-Zellen mit den spezifischen siRNAs 37, 58 oder 60 (A) bzw. mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Ki11502 (B) inhibiert. 72h nach der Transfektion bzw. 48h und 72h nach Start der Inhibitorbehandlung wurde dann die Expression der EGFR- und IGF-IR- mRNA mittels der qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind relativ zur LUC- bzw. nicht behandelten Kontrolle (\emptyset) dargestellt. Weder die siRNA- noch die Inhibitorbehandlung führten zu einer veränderten Expression der EGFR- oder IGF-IR-mRNA.

3.4.2.3 Analyse der Viabilität von SW480-Zellen nach PDGFR- β -Inhibition

Um zu überprüfen, ob die Inhibition des PDGFR- β in SW480-Zellen einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen ausübt, wurden die Proliferation und die Todesrate der Tumorzellen nach PDGFR- β -Inhibition ermittelt. Die Inhibition des PDGFR- β erfolgte sowohl über siRNA-Behandlung als auch über eine Behandlung mit dem *small molecule*-Inhibitor Ki11502. 24h, 48h und 72h nach der siRNA-Transfektion bzw. Start der Inhibitorbehandlung wurde die Proliferationsrate der SW480-Zellen bestimmt. Desweiteren wurde der Anteil toter Zellen 72h nach Behandlungsstart ermittelt. Der Proliferationsassay wurde neunmal mit der siRNA und elfmal mit dem Inhibitor durchgeführt. Der Zytotoxizitätstest wurde achtmal mit der siRNA und sechsmal mit dem Inhibitor durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden gemittelt und in Relation zu den kontrollbehandelten Zellen gesetzt (Abbildung 3.23).

Sowohl die Inhibition des PDGFR- β mit siRNA als auch mit dem Tyrosinkinaseinhibitor führte zu einer verminderten Proliferation der SW480-Zellen. Der Effekt wurde für beide Behandlungsarten mit der Zeit stärker. Die siRNA-Behandlung führte nach 72h zu einer Verminderung der Proliferation um mehr als 20%. Der Behandlungseffekt mit dem Inhibitor wurde mit höherer Konzentration stärker. Nach 72h zeigten die mit 1 μ M behandelten Zellen einen Rückgang der Proliferation von 13%. Die mit 20 μ M behandelten Zellen zeigten hingegen einen Rückgang um 34%. Eine erhöhte Sterblichkeit der behandelten Zellen war für keine der Behandlungsarten zu detektieren, ein zytotoxischer Effekt kann somit ausgeschlossen werden.

Proliferationsassay



Zytotoxizitätstest

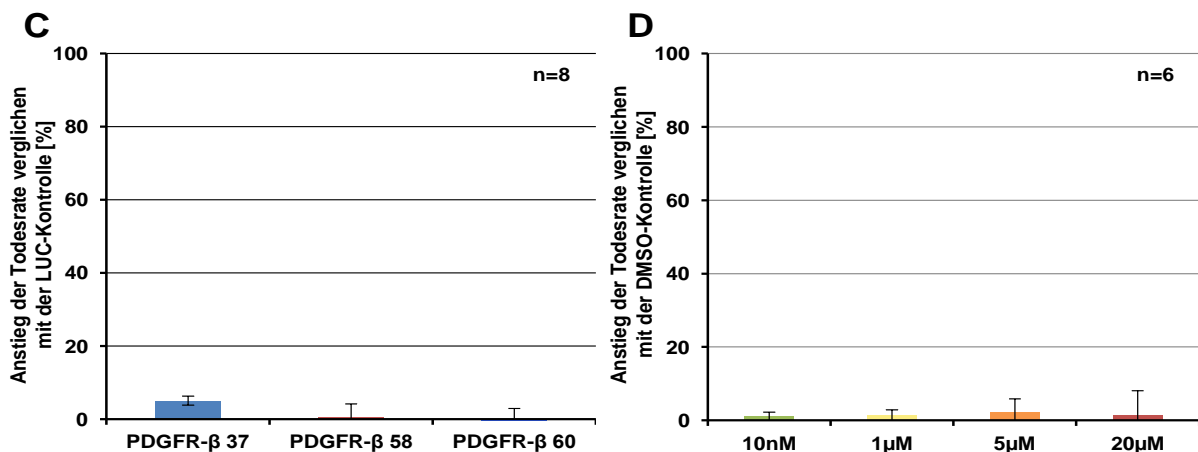


Abbildung 3.23 Analysen zur Viabilität der SW480-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β .

Für die SW480-Zellen wurden sowohl die Proliferationsrate (**A**, **B**) als auch der Anteil toter Zellen (**C**, **D**) nach Inhibition des PDGFR- β untersucht. Dafür wurde der PDGFR- β mit je einer der spezifischen siRNAs 37, 58 oder 60 (**A**, **C**) bzw. mit verschiedenen Konzentrationen des Tyrosinkinaseinhibitors Ki11502 inhibiert (**B**, **D**). Die Proliferationsrate wurde 24h, 48h und 72h nach der Behandlung ermittelt, die Todesrate 72h nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind relativ zu den jeweiligen Kontrollen dargestellt. Sowohl die Inhibition des PDGFR- β mit siRNA als auch mit dem Tyrosinkinaseinhibitor führten zu einer verminderten Proliferationsrate der SW480-Zellen. Für die Inhibitorbehandlung war dieser Effekt konzentrationsabhängig. Die Inhibition des PDGFR- β führte zu keinem vermehrten Absterben der Zellen.

3.4.2.4 Bestätigung der Ergebnisse in der Rektumkarzinomzelllinie SW837

Der Einfluss der PDGFR- β -Inhibition auf die Viabilität wurde auch in der Rektumkarzinomzelllinie SW837 analysiert. Dafür wurden die Proliferationsrate und die Todesrate nach PDGFR- β -Inhibition ermittelt. Die Inhibition des PDGFR- β erfolgte mit dem *small molecule*-Inhibitor Ki11502. Beide Assays wurden viermal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Alle Ergebnisse wurden jeweils in Relation zu den kontrollbehandelten Zellen gesetzt (Abbildung 3.24).

Die Inhibition des PDGFR- β mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Ki11502 führte zu einer verminderten Proliferationsrate der SW837-Zellen. Der Effekt wurde mit ansteigender Konzentration des Inhibitors stärker. Nach 72h zeigten die mit 20 μ M behandelten Zellen einen Rückgang der Proliferation um 52%. Desweiteren war ein Anstieg in der Todesrate der Zellen 24h nach der Behandlung zu detektieren. Der Anteil an gestorbenen Zellen war bei den mit 20 μ M behandelten Zellen um 21,5% erhöht, was auf einen zytotoxischen Effekt hinweisen könnte.

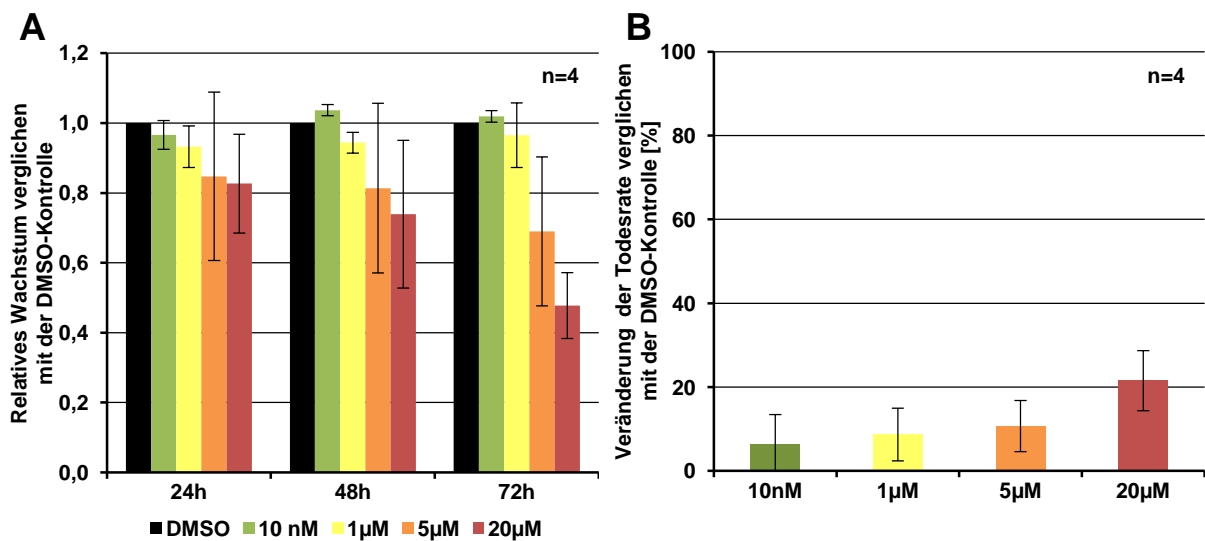


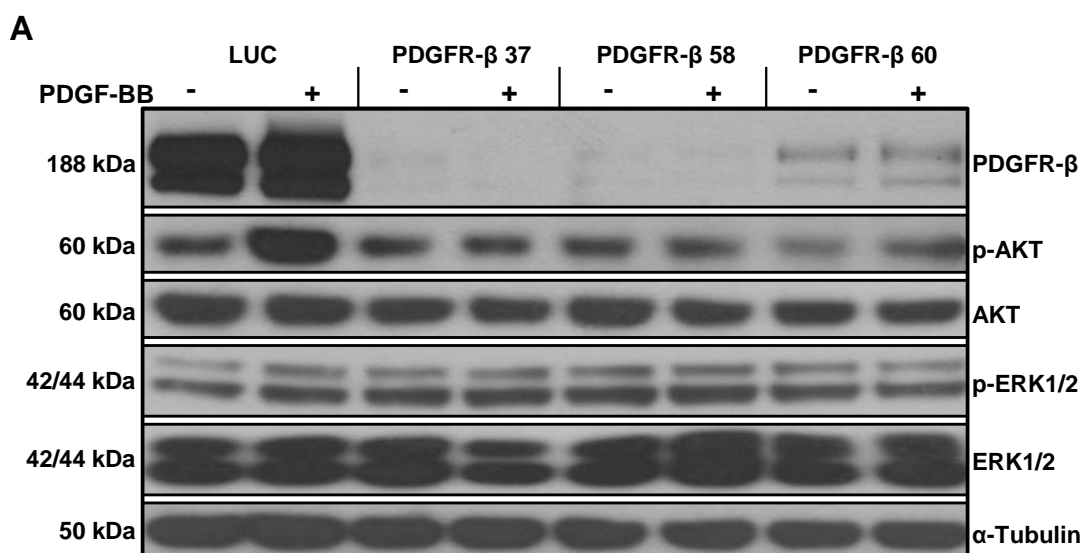
Abbildung 3.24 Analysen zur Viabilität der SW837-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β mittels des *small molecule*-Inhibitors Ki11502.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proliferationsrate (A) und nach 72h die Todesrate (B) der SW837-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β mit verschiedenen Konzentrationen von Ki11502 gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Die Ergebnisse wurden gemittelt und sind relativ zu den jeweiligen Kontrollen dargestellt. Die Inhibition des PDGFR- β mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Ki11502 führte zu einer verminderten Proliferationsrate der SW837-Zellen. Dieser Effekt wurde mit ansteigender Konzentration stärker. Außerdem war ein Anstieg toter Zellen durch die Behandlung detektierbar.

3.4.2.5 Analyse der nachfolgenden Signalwege des PDGFR- β nach dessen Inhibition in SW480-Zellen

Um zu klären, welchen Einfluss die Inhibition des PDGFR- β in SW480 auf die nachfolgenden Signalkaskaden hat, sollte der Phosphorylierungsstatus der beiden Serin/Threonin-Kinasen AKT und ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinases*) nach PDGFR- β -Inhibition in SW480-Zellen untersucht werden. Beide Proteine sind wichtige Mitglieder der PI3K-Signalkette (AKT) bzw. der MAPK-Signalkette (ERK) und wurden stellvertretend für den gesamten Signalweg untersucht. Zunächst wurde in SW480-Zellen der PDGFR- β mit Hilfe der spezifischen siRNAs bzw. des *small molecule*-Inhibitors Ki11502 inhibiert. Als Kontrollen dienten eine siRNA gegen Luciferase bzw. DMSO. 48h nach der Transfektion bzw. dem Behandlungsstart wurden die Zellen für weitere 24h unter Serumentzug inkubiert. Der Inhibitor war in dieser Zeit weiterhin anwesend. Anschließend wurden die Zellen 10min mit 10ng/ml des Liganden PDGF-BB stimuliert und dann das Protein isoliert. Die Überprüfung des Phosphorylierungsstatus von AKT bzw. ERK erfolgte mit Hilfe der Western Blot-Analyse. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 dargestellt.

Die Inhibition des PDGFR- β mittels siRNA führte in SW480-Zellen dazu, dass AKT nach der Stimulation mit PDGF-BB nicht mehr phosphoryliert wurde. Für die Inhibitorbehandlung war dieser Effekt konzentrationsabhängig, erreichte jedoch nicht die Stärke der siRNA-Behandlung. Für ERK konnte weder nach der siRNA-vermittelten, noch nach der Inhibitor-vermittelten PDGFR- β -Inhibition ein Unterschied in der Stimulierbarkeit detektiert werden.



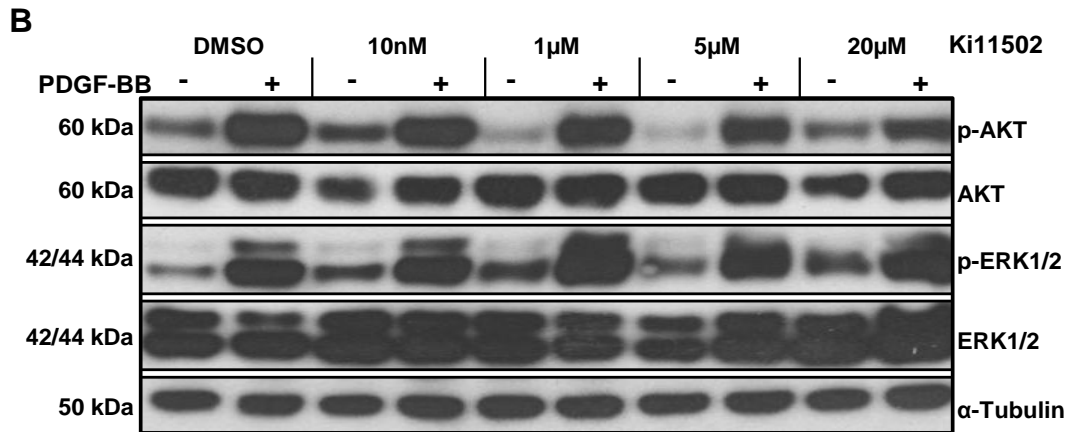


Abbildung 3.25 Analyse der nachfolgenden Signalwege nach PDGFR- β -Inhibition in SW480-Zellen mittels Western Blot-Analyse.

Zunächst wurde in SW480-Zellen der PDGFR- β mit Hilfe der spezifischen siRNAs (A) bzw. des *small molecule*-Inhibitors Ki11502 (B) inhibiert. Als Kontrollen diente eine siRNA gegen Luciferase bzw. DMSO. 48h nach der Behandlung erfolgte ein Serumentzug für 24h. Anschließend wurden die Zellen 10min mit 10ng/ml PDGF-BB stimuliert und dann das Protein isoliert. Der Nachweis des Phosphorylierungsstatus von AKT bzw. ERK erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Es zeigte sich, dass die Inhibition des PDGFR- β sowohl mit siRNA als auch mit dem Inhibitor dazu führt, dass AKT nach der Stimulation mit PDGF-BB nicht mehr phosphoryliert wird. Für ERK konnte dagegen kein Effekt detektiert werden.

3.4.2.6 Überprüfung der Zellmorphologie der SW480-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β

In SW480-Zellen wurde analysiert, ob die Inhibition des PDGFR- β einen Einfluss auf die Zellmorphologie ausübt. Die Inhibition des PDGFR- β erfolgte sowohl über siRNA-Transfektion als auch über eine Behandlung mit dem *small molecule*-Inhibitor Ki11502. Als Kontrolle wurden die Zellen mit LUC-siRNA bzw. DMSO behandelt. 72h nach der Inhibition wurde die Morphologie der behandelten SW480-Zellen mit der der Kontrollen verglichen. In Abbildung 3.26 sind mikroskopische Aufnahmen der behandelten Zellen dargestellt.

Die mit PDGFR- β -siRNA behandelten Zellen wiesen keine veränderte Morphologie auf. Die mit dem Inhibitor behandelten Zellen zeigten ab einer Konzentration von 5µM eine veränderte Zellmorphologie. Die Zellen waren deutlich größer und wiesen Zelleinschlüsse auf. Eine genaue Quantifizierung der Effekte wurde nicht durchgeführt.

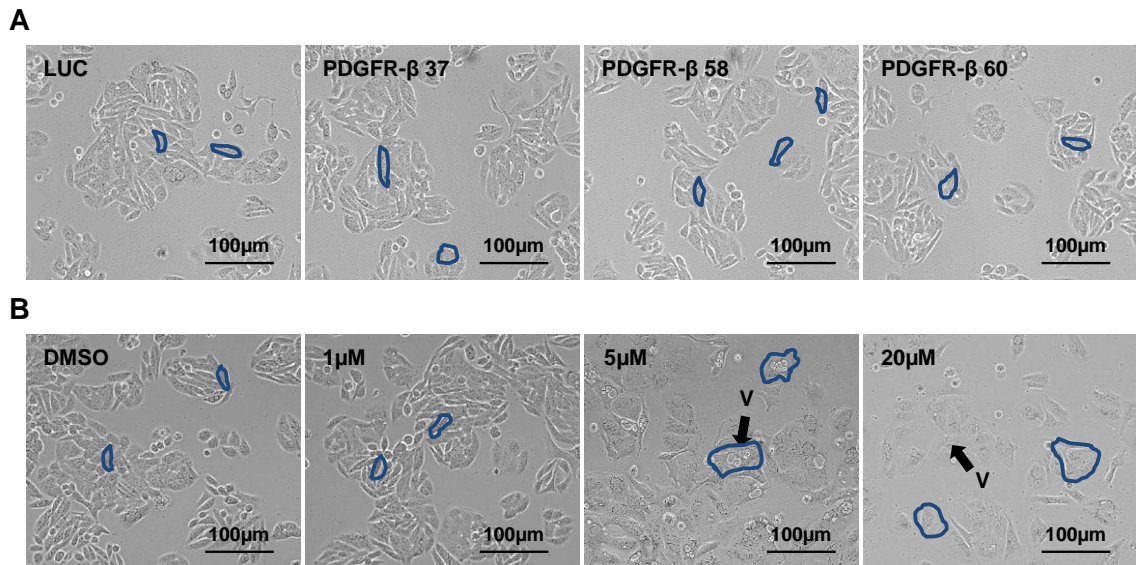


Abbildung 3.26 Analyse der Zellmorphologie von SW480-Zellen nach Inhibition des PDGFR-β.

72h nach der Inhibition des PDGFR-β wurde die Zellmorphologie mit der der nicht behandelten Kontrollen verglichen. Die Inhibition erfolgte mit den siRNAs 37, 58 und 60 (A) bzw. 1μM, 5μM und 20μM des Inhibitors Ki11502 (B). Als Kontrollen wurden siRNAs gegen Luciferase (LUC) bzw. DMSO verwendet. Die PDGFR-β-siRNA-behandelten SW480-Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen. Die Inhibitor-behandelten SW480-Zellen waren ab einer Inhibitorkonzentration von 5μM zum Teil größer und wiesen Zelleinschlüsse (V) auf. Repräsentative Zellen mit blau umrandet. Eine Quantifizierung dieses Effekts wurde nicht durchgeführt.

3.4.2.7 Analyse des Einfluss der PDGFR-β-Inhibition auf den Zellzyklus in SW480-Zellen via Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde analysiert, ob die Inhibition des PDGFR-β einen Einfluss auf den Zellzyklus in SW480-Zellen hat. Der PDGFR-β wurde einerseits mit einer der drei spezifischen siRNAs 37, 58 oder 60 und andererseits mit dem *small molecule*-Inhibitor Ki11502 inhibiert. Als Kontrollen wurden Zellen mit siRNA gegen Luciferase transfiziert bzw. mit DMSO behandelt. 72h nach der Inhibition des PDGFR-β wurden die Zellen fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse, mit deren Hilfe für jede Zellfraktion bestimmt wurde, wie viele der Zellen sich jeweils in welcher Zellzyklusphase befanden. Die Analysen wurden dreimal für die siRNA-behandelten und fünfmal für die Inhibitor-behandelten Zellen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt (Abbildung 3.27).

Die Inhibition der SW480-Zellen mit der PDGFR-β-spezifischen siRNA hatte keinen Einfluss auf den Zellzyklus der Zellen. Mit 65% bis 69% befand sich der Großteil der SW480-Zellen in der G1-Phase. In der S- und G2-Phase waren jeweils 14% bis 16% der Zellen, und 1% bis 1,5% der Zellen befanden sich in der subG1-Phase. Die Behandlung der SW480-Zellen mit dem Inhibitor führte ab einer Konzentration von 5μM dazu, dass sich mit 75% bis 78% der Großteil der Zellen nicht mehr in der G1-Phase sondern in der G2-Phase befand. 2% bis

2,5% der Zellen befanden sich in der subG1-Phase, 8% bis 11% in der G1- und S-Phase. Für die mit DMSO oder 1µM Inhibitor-behandelten Zellen entsprach die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen in etwa der mit siRNA behandelten Zellen (1%-2% subG1; 62%-65% G1; 20%-22% S; 13%-17% G2).

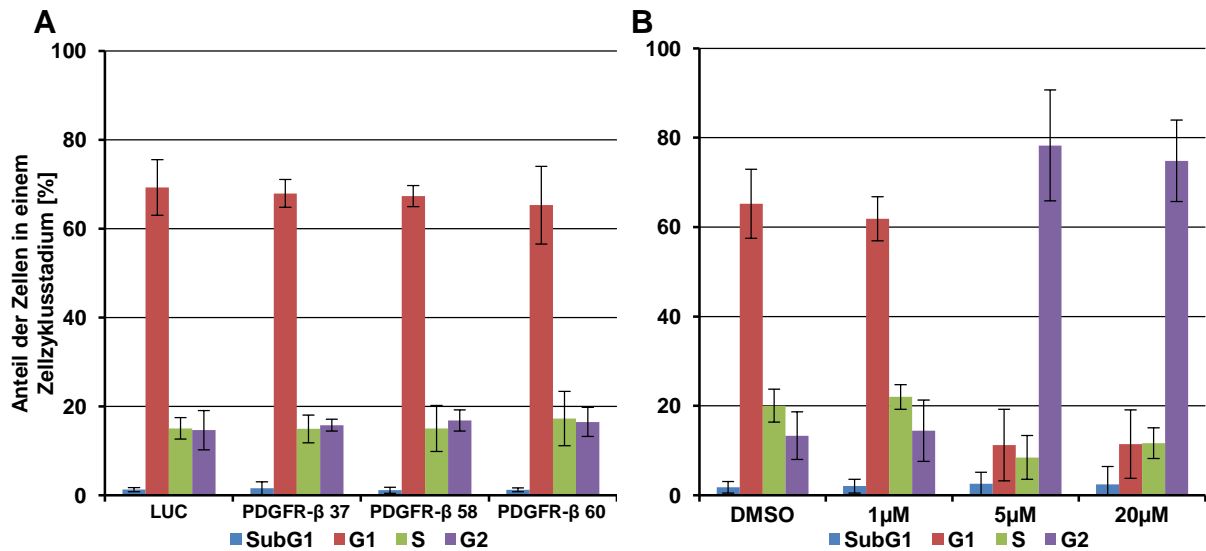


Abbildung 3.27 Analyse des Einflusses der PDGFR-β-Inhibition auf den Zellzyklus in SW480-Zellen *via* Durchflusszytometrie.

72h nach der Inhibition des PDGFR-β in SW480-Zellen mittels siRNA (A) oder dem Inhibitor Ki11502 (B) wurden die Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Inhibition des PDGFR-β erfolgte mit den siRNAs 37, 58 und 60 bzw. 1µM, 5µM und 20µM des Inhibitors Ki11502. Als Kontrolle wurde siRNA gegen Luciferase bzw. DMSO verwendet. Dargestellt ist der Anteil an Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase. Die Inhibition der SW480-Zellen mit der PDGFR-β-spezifischen siRNA hatte keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Der Großteil der Zellen (ca. 65%) befand sich in der G1-Phase. Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor führte jedoch ab einer Konzentration von 5µM dazu, dass sich der Großteil der Zellen (ca. 75%) nicht mehr in der G1-Phase, sondern in der G2-Phase befand.

3.4.2.8 Analyse der Ursache für die Veränderung der Zellzyklusphasen nach Inhibitorbehandlung in SW480-Zellen

Um den Mechanismus für die Veränderung der Zellzyklusphasen in den SW480-Zellen nach der Behandlung mit dem PDGFR-β-Inhibitor Ki11502 aufzuklären, wurden die Aktivität und Expressionsstärke verschiedener wichtiger Zellzyklusregulatoren analysiert. Nach 72h Behandlung der Zellen mit DMSO oder 10nM, 1µM, 5µM oder 20µM des Inhibitors wurde das Protein isoliert und für die Western Blot-Analysen eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein spezifischer Antikörper gegen α-Tubulin eingesetzt. Für den Zellzyklusregulator Cyclin B1 ließ sich ein inhibitorspezifischer Effekt nachweisen (Abbildung 3.28). Die Expressionsstärke von Cyclin B1 wurde mit zunehmender Konzentration des Inhibitors geringer.

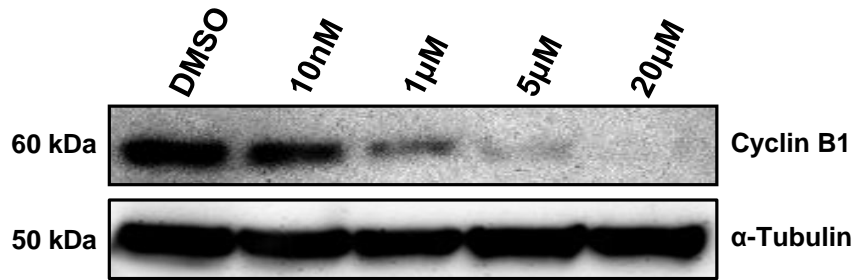


Abbildung 3.28 Analyse des Zellzyklusregulators Cyclin B1 in SW480-Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor Ki11502.

Um den Mechanismus für die Veränderung der Zellzyklusphasen in den SW480-Zellen nach der Behandlung mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 aufzuklären, wurden verschiedene wichtige Zellzyklusregulatoren nach der Inhibitorbehandlung mittels Western Blot nach 72h Behandlung analysiert. Die Expressionsstärke von Cyclin B1 nahm mit zunehmender Konzentration des Inhibitors ab.

3.4.2.9 Analyse der Expression weiterer Rezeptoren der PDGFR- β -Familie in kolorektalen Karzinomzelllinien

Aufgrund der Ergebnisse der Zellzyklusanalysen (3.4.2.7) und der Tatsache, dass der PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 bei sehr hohen Konzentrationen auch andere Mitglieder der PDGFR- β -Familie inhibieren kann, sollte die Expression der PDGFR- β -Familienmitglieder cKIT, FLT3 und MCSF in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien mittels qRT-PCR überprüft werden. Als Vergleich diente die Lymphomzelllinie Daudi, die alle drei Rezeptoren exprimiert. Die qRT-PCR wurde dreimal durchgeführt, wobei für jedes Gen zwei verschiedene Primerpaare verwendet wurden. Die Expression der Rezeptoren in den kolorektalen Zelllinien wurde relativ zur Expression in den Daudi-Zellen dargestellt (Abbildung 3.29).

Eine geringe Expression des Rezeptors FLT3 ließ sich nur in der Rektumkarzinomzelllinie SW837 nachweisen. Diese war 76% geringer als in den Daudi-Zellen. Eine Expression des Rezeptors MCSF ließ sich mit Ausnahme der SW480-Zellen in allen getesteten Zelllinien nachweisen. Die Expressionsstärke war jedoch deutlich geringer als in den Daudi-Zellen und lag bei ca. 11% - 20%. Lediglich die Caco-2-Zellen zeigten eine etwas stärkere Expression (ca. 50%). Die Zelllinien SW480, SW837 und DLD-1 zeigten eine deutliche Expression des Rezeptors cKIT. Diese war in den SW480 1,3-mal und in den SW837 2,5-mal so hoch im Vergleich zur cKIT-Expression in den Daudi-Zellen. In den DLD-1-Zellen war die cKIT-Expression 70-mal höher als in den Daudi-Zellen. In Caco2-Zellen ließ sich eine geringe cKIT-Expression nachweisen. Sie lag verglichen mit den Daudi-Zellen bei 43%. Die Zelllinien HCT116 und HT-29 zeigten eine äußerst geringe (<5%) bis keine Expression des Rezeptors cKIT.

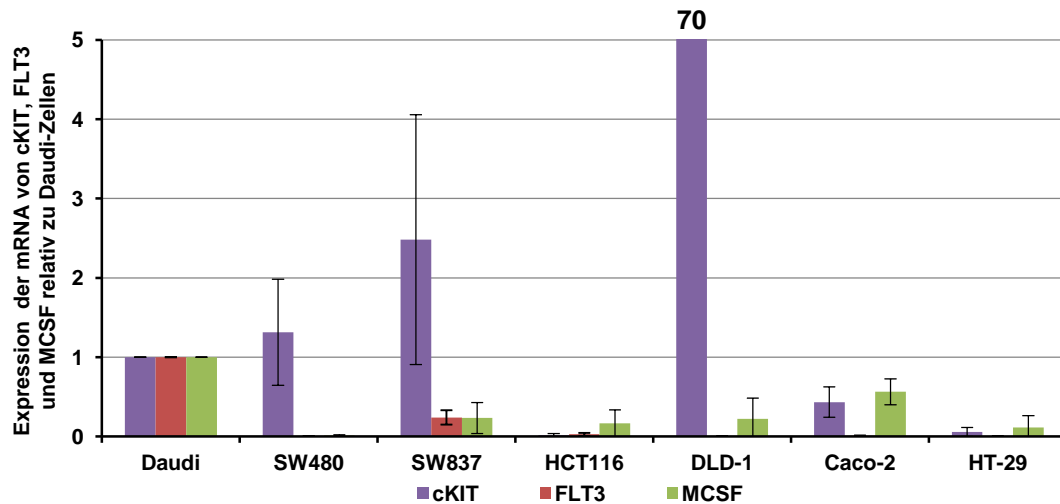


Abbildung 3.29 Vergleich der Expression der PDGFR- β -Familienmitglieder cKIT, FLT3 und MCSF in kolorektalen Karzinomzelllinien.

Die angegebenen kolorektalen Zelllinien wurden mittels qRT-PCR auf die Expression von cKIT, FLT3 und MCSF hin untersucht. Als Referenz diente die Lymphomzelllinie Daudi. Nur in SW837-Zellen ließ sich eine schwache Expression von FLT3 nachweisen. Für die Zelllinien SW837, HCT116, DLD-1, Caco-2 und HT-29 konnte eine geringe Expression von MCSF gezeigt werden. Die Zelllinien SW480, SW837 und DLD-1 zeigten eine deutliche Expression des Rezeptors cKIT. In Caco-2-Zellen ließ sich eine geringe cKIT-Expression nachweisen. Die Zelllinien HCT116 und HT-29 zeigten eine sehr geringe bis keine Expression des Rezeptors cKIT. In den DLD-1-Zellen konnte die höchste cKIT-Expression nachgewiesen werden.

3.4.3 Inhibition des PDGFR- β in Caco-2- und DLD-1-Zellen

Zur Klärung der Frage, ob die Unterschiede im Zellzyklus zwischen siRNA- und Inhibitorbehandlung durch eine zusätzliche Inhibition des Rezeptors cKIT durch Ki11502 hervorgerufen wird, sollte der Einfluss der PDGFR- β -Inhibition auf die Zelllinien Caco-2 und DLD-1 untersucht werden. Diese wurden ausgewählt, da die DLD-1-Zellen eine sehr starke und die Caco-2-Zellen eine niedrige cKIT-Expression aufweisen. Die PDGFR- β -Expression ist in beiden Zelllinien nur geringfügig schwächer als in den SW480-Zellen.

3.4.3.1 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der PDGFR- β -spezifischen siRNAs in DLD-1- und Caco-2-Zellen

Zunächst sollte überprüft werden, ob die drei PDGFR- β spezifischen siRNAs 37,58 und 60 in den Zelllinien DLD-1- und Caco-2 zu einer verminderten Expression der PDGFR- β -mRNA führen. Dafür wurde 48h nach der Transfektion der DLD-1 und Caco-2-Zellen RNA bzw. Protein isoliert und die Expression des PDGFR- β mittels qRT-PCR bzw. Western Blot-Analyse überprüft (Abbildung 3.30). Als Kontrolle wurden die Zellen mit siRNA gegen Luciferase transfiziert.

Bei den DLD-1-Zellen führte die Behandlung mit den siRNAs 37 und 60 auf mRNA-Ebene zu einer Verringerung der PDGFR- β -Expression von mehr als 80%, für die siRNA 58 ca. 75%. Auf Proteinebene zeigte sich für alle drei siRNAs eine starke Herunterregulation der PDGFR- β -Expression. Lediglich für die siRNA 37 war die Herunterregulation etwas schwächer. Bei den Caco-2-Zellen zeigte die Behandlung mit den siRNAs 37 und 58 optimale Ergebnisse. Auf mRNA-Ebene wurde eine Verminderung der PDGFR- β -Expression um über 80% erreicht. Auch auf Proteinebene führte die Behandlung mit den beiden siRNAs zu einer deutlichen Herunterregulation der PDGFR- β -Expression. Die siRNA 60 führte auf mRNA-Ebene jedoch lediglich zu einer verminderten PDGFR- β -Expression um ca. 65%. Auf Proteinebene ließ sich kein Effekt durch die Behandlung nachweisen.

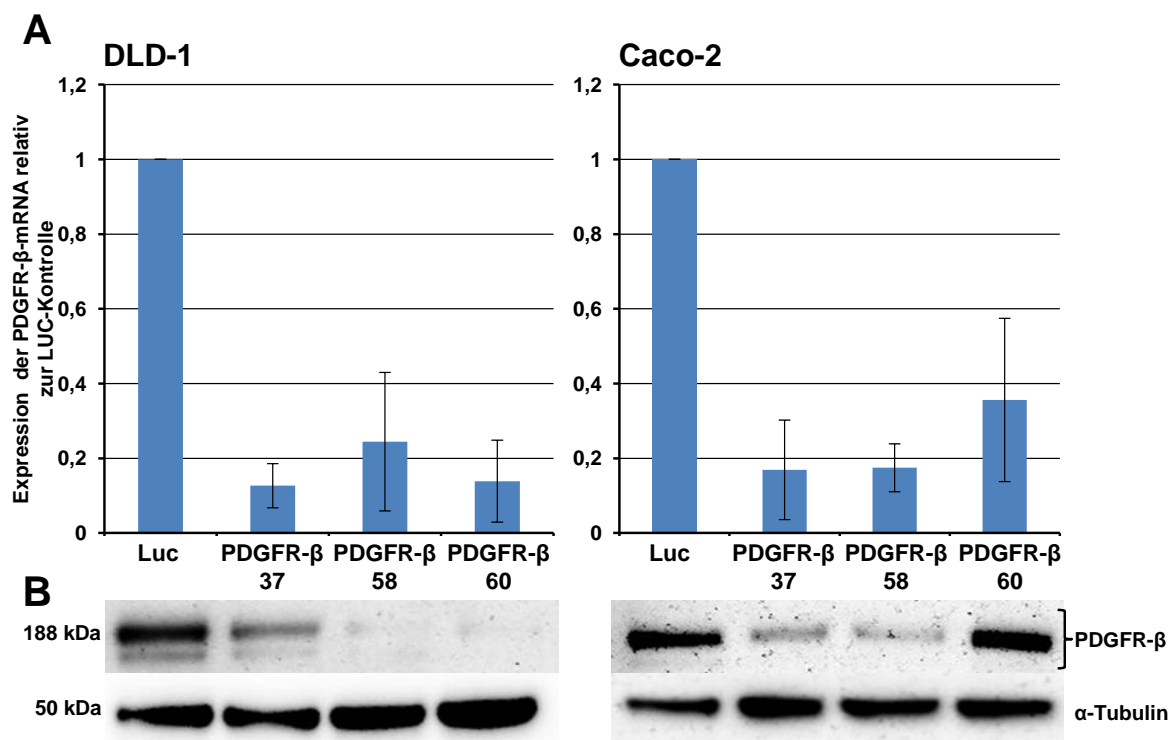


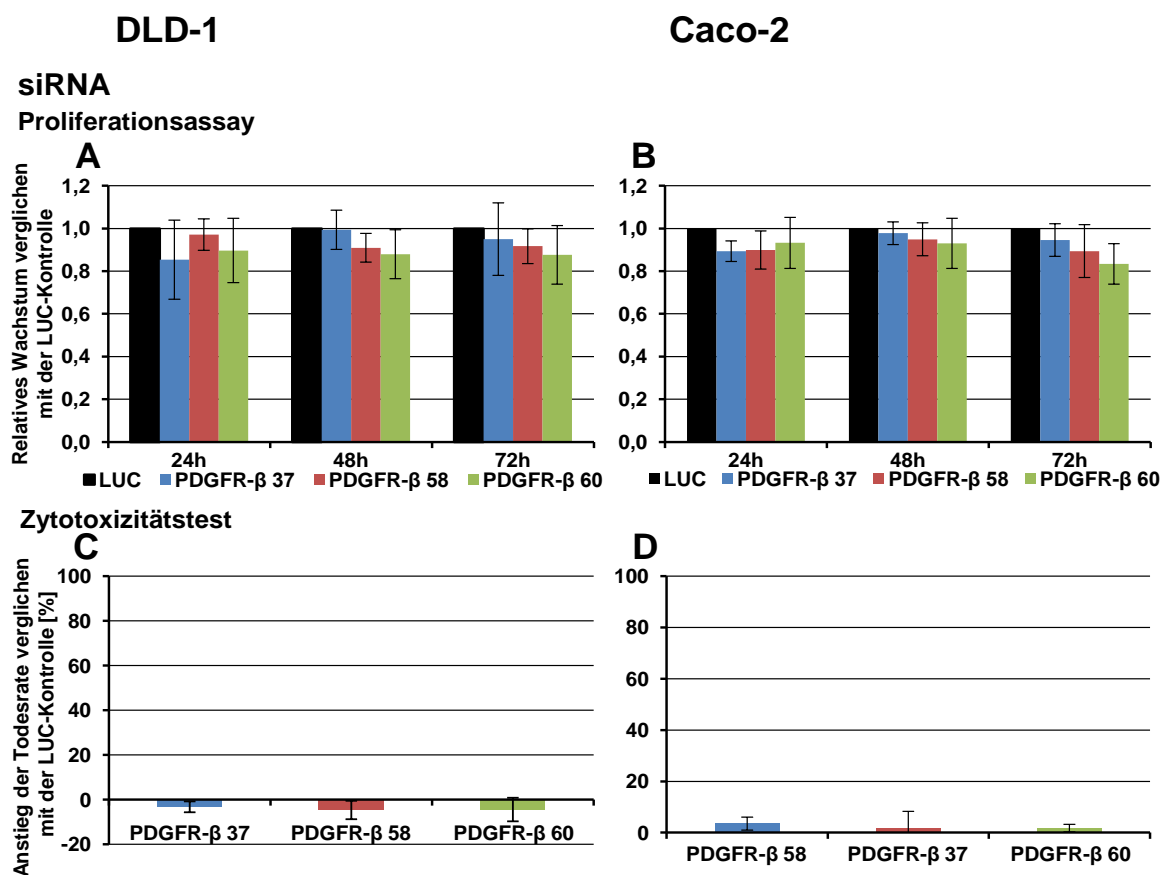
Abbildung 3.30 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der PDGFR- β -spezifischen siRNAs in DLD-1- und Caco-2-Zellen.

Um die Funktionsfähigkeit der drei PDGFR- β -siRNAs 37, 58 und 60 in DLD-1- und Caco-2-Zellen zu überprüfen, wurde die PDGFR- β -Expression 48h nach der siRNA-Transfektion mit Hilfe der qRT-PCR (**A**) und der Western Blot-Analyse (**B**) überprüft. Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen Luciferase (LUC) verwendet. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte eine starke Herunterregulation der PDGFR- β -Expression durch die siRNAs 37 und 58 beobachtet werden. Die siRNA 60 zeigte in den DLD-1-Zellen eine starke Herunterregulierung, in den Caco-2-Zellen führte die Verwendung dieser siRNA auf mRNA-Ebene lediglich zu einer Expressionsverminderung um 65%. Auf Proteinebene ließ sich kein Effekt nachweisen.

3.4.3.2 Analysen zur Viabilität der DLD-1- und Caco-2-Zellen nach PDGFR- β -Inhibition

Für die DLD-1- und Caco-2-Zellen sollte zunächst überprüft werden, welchen Einfluss eine Inhibition des PDGFR- β auf die Zellviabilität ausübt. Die Inhibition des PDGFR- β erfolgte mit Hilfe von siRNAs oder dem Inhibitor Ki11502. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase bzw. DMSO behandelt. Die Proliferationsrate der Zellen wurde 24h, 48h und 72h, die Todesrate der Zellen wurde 72h nach der Behandlung (Abbildung 3.31) bestimmt.

Die Inhibition des PDGFR- β mittels siRNA führte sowohl in DLD-1- als auch in Caco-2-Zellen zu einer moderaten Verringerung der Proliferationsrate von durchschnittlich 15%. Eine Veränderung in der Todesrate der Zellen konnte nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu führte die PDGFR- β -Inhibition mit dem Inhibitor Ki11502 in DLD-1-Zellen ab einer Konzentration von 5 μ M zu einem starken Rückgang der Proliferationsrate. Die Behandlung der DLD1-Zellen mit 20 μ M Ki11502 führte nach 72h zu einer Proliferationsminderung von über 60%. Außerdem stieg der Anteil an toten Zellen um 37%. Bei den Caco-2-Zellen führte die Behandlung mit 20 μ M Inhibitor auch nach 72h nur zu einer moderaten Verringerung der Proliferationsrate von max. 20%. Eine Veränderung der Todesrate konnte in Caco-2-Zellen nicht gezeigt werden.



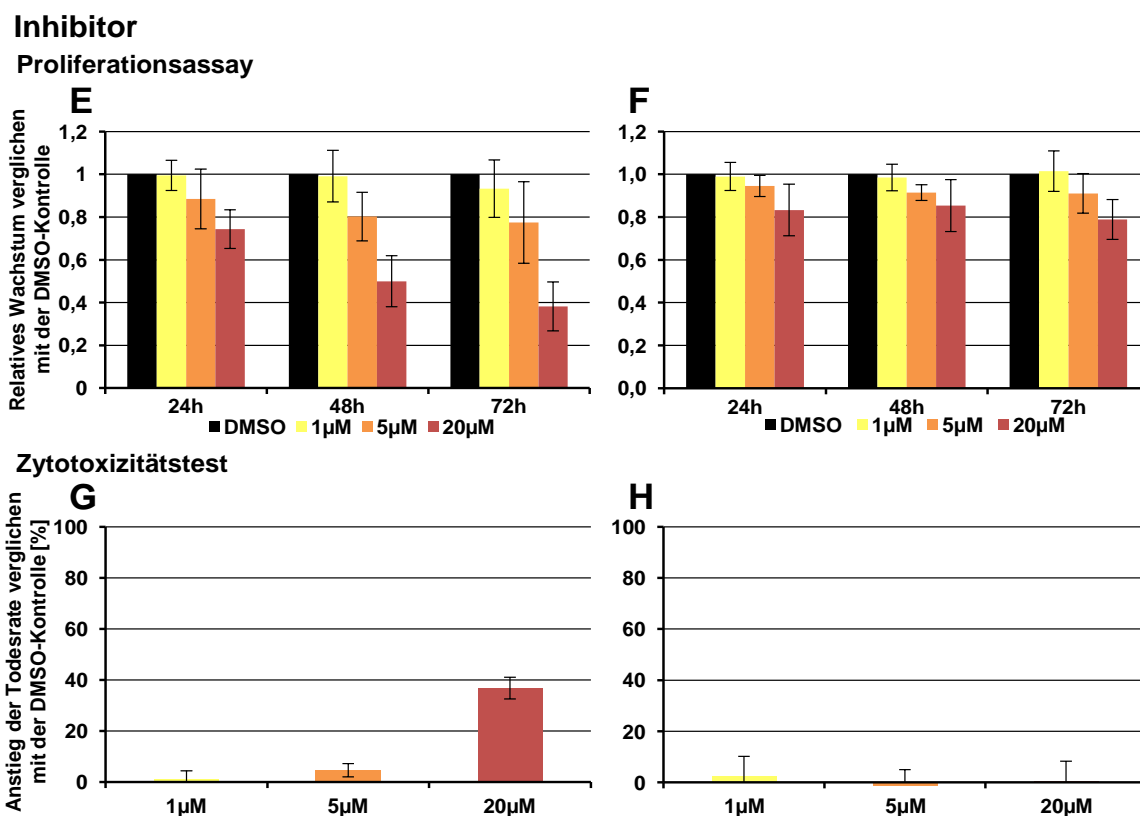


Abbildung 3.31 Viabilität der DLD-1- und Caco-2-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β .

Nach der Inhibition des PDGFR- β mit siRNA bzw. dem Inhibitor Ki11502 wurden die Zellen auf Veränderungen der Proliferationsrate und Todesrate untersucht. Als Kontrollen wurden die Zellen mit LUC-siRNA bzw. DMSO behandelt. (A, B) Proliferationsrate nach siRNA-Behandlung. (C, D) Todesrate nach siRNA-Behandlung. (E, F) Proliferationsrate nach Inhibitorbehandlung. (G, H) Todesrate nach Inhibitorbehandlung. Nur mit dem Inhibitor behandelte DLD-1-Zellen zeigten eine starke Verminderung der Proliferation und einen Anstieg in der Todesrate, wohingegen Caco-2-Zellen weder über die siRNA- noch über die Inhibitor-Blockade des PDGFR- β eine Veränderung in Proliferation und Sterblichkeit zeigten.

3.4.3.3 Analyse der Zellzyklusphasen *via* Durchflusszytometrie in DLD-1- und Caco-2-Zellen nach Inhibition des PDGFR- β

Der Einfluss des Inhibitors auf den Zellzyklus sollte auch für die Zelllinien DLD-1 und Caco-2 überprüft werden. Dafür wurden die Zellen 72h mit 1µM, 5µM oder 20µM Ki11502 behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt, wie viele Zellen sich jeweils in welcher Zellzyklusphase befanden. Die Analyse wurde fünfmal für DLD-1 und zweimal für Caco-2 durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt (Abbildung 3.32).

Die Inhibitorbehandlung hatte in DLD-1-Zellen einen deutlichen Einfluss auf die Zellzyklusphasen. Mit steigender Konzentration befanden sich immer mehr Zellen in der subG1-Phase (5µM Ki11502 = 25%, 20µM = 58%). Dementsprechend sank der Anteil der Zellen in der G1-Phase von zuvor 58% auf ca. 30% (5µM Ki11502) bzw. 18% (20µM Ki11502). Auch in Caco-2-Zellen sank mit steigender Inhibitor-Konzentration der Anteil der

Zellen in der G1-Phase von zuvor 56% auf 42% (1 μ M und 5 μ M Ki11502) bzw. 21% (20 μ M Ki11502). Ein Anstieg in der subG1-Phase war nicht zu detektieren. Die Zellen gingen zu ca. 35% (5 μ M und 20 μ M Ki11502) in die S-Phase über. Durch die Behandlung mit 20 μ M Ki11502 wechselten 27% der Zellen in die G2-Phase.

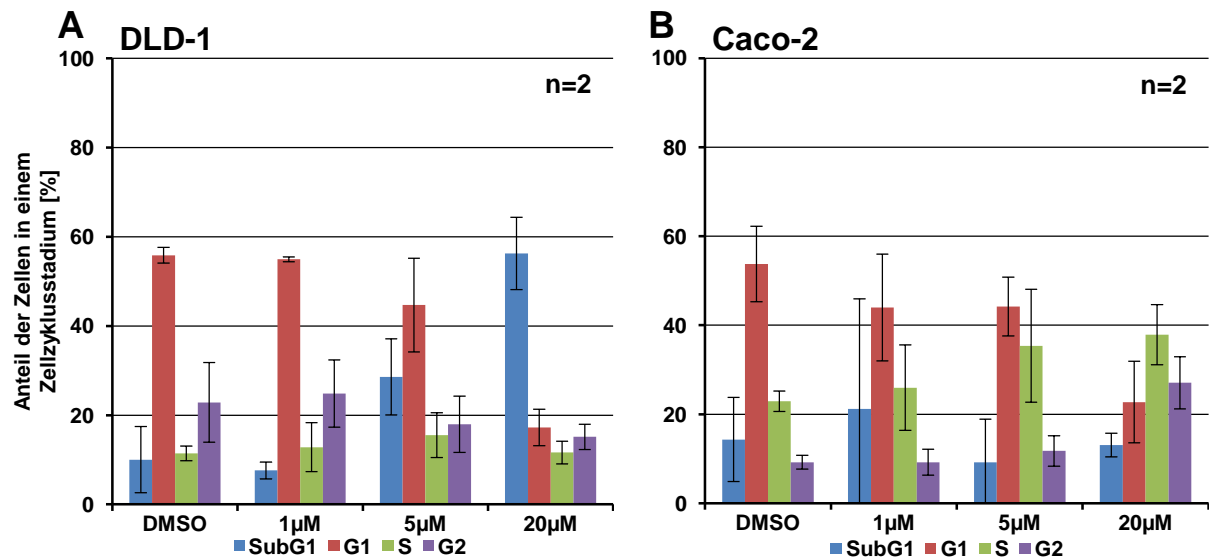


Abbildung 3.32 Überprüfung der Zellzyklusphasen via Durchflusszytometrie nach Inhibitorbehandlung von DLD-1- und Caco-2-Zellen.

Um den Einfluss des Inhibitors Ki11502 auf den Zellzyklus der Zelllinien DLD-1 (A) und Caco-2 (B) zu untersuchen, wurden diese für 72h mit 1 μ M, 5 μ M oder 20 μ M Ki11502 behandelt. Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Bei den DLD-1-Zellen wechselten mit steigender Inhibitorkonzentration die Zellen von der G1- in die subG1-Phase. Die Caco-2-Zellen wechselten hingegen von der G1- in die S- und G2-Phase.

3.4.4 Inhibition von cKIT in SW480- und DLD-1-Zellen mittels siRNA

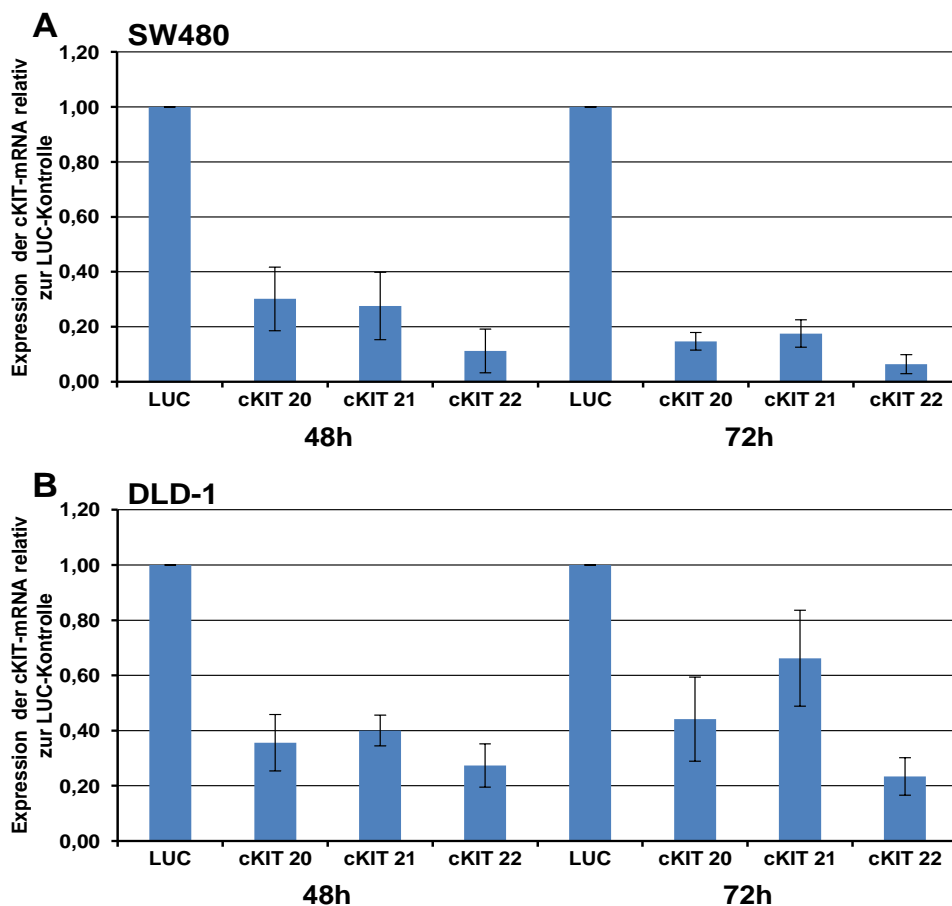
Um zu überprüfen, ob den Zellzyklusveränderungen durch den Inhibitor Ki11502 eine Inhibition des Rezeptors cKIT zugrunde liegt, sollte der Einfluss einer spezifischen cKIT-Inhibition auf die SW480- und DLD-1-Zellen untersucht werden. Die cKIT-Inhibition sollte mit Hilfe der drei cKIT-spezifischen siRNAs 20, 21 und 22 erreicht werden. Als Kontrolle wurde jeweils eine siRNA gegen Luciferase verwendet.

3.4.4.1 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der cKIT-spezifischen siRNAs in SW480- und DLD-1-Zellen

Zunächst sollte überprüft werden, ob die drei cKIT-spezifischen siRNAs 20, 21 und 22 in den Zelllinien SW480 und DLD-1 zu einer verminderten Expression des Rezeptors führten. Dafür wurden 48h und 72h nach der Transfektion der SW480- und DLD-1-Zellen RNA und Protein isoliert und die cKIT-Expression mittels qRT-PCR bzw. Western Blot-Analyse überprüft. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert. Die Transfektion

wurde zweimal durchgeführt und die isolierten RNAs jeweils für zwei unabhängige qRT-PCRs verwendet. Für die qRT-PCR wurden vier unabhängige Primerpaare verwendet. Alle Ergebnisse wurden gemittelt und relativ zur LUC-Kontrolle dargestellt (Abbildung 3.33-A/B). Aufgrund der Expressionsunterschiede (s. 3.4.2.9) konnte auf Proteinebene nur in den DLD-1-Zellen die cKIT-Expression nachgewiesen werden.

In SW480-Zellen führte die Transfektion mit allen drei siRNAs auf mRNA-Ebene zu einer deutlichen Verringerung der cKIT-Expression. 72h nach der Transfektion war die cKIT-Expression um über 80% verringert. In DLD-1-Zellen konnte 48h nach der Transfektion auf mRNA-Ebene eine Verringerung der cKIT-Expression um ca. 60% detektiert werden. 72h nach der Transfektion stieg die cKIT-Expression für die mit den siRNAs 20 und 21 transfizierten Zellen wieder an. Die mit der siRNA 22 transfizierten Zellen zeigten eine verringerte cKIT-Expression um ca. 75%. In der Western Blot-Analyse zeigte sich, dass die siRNAs 20 und 21 zu einer deutlichen Herunterregulierung des cKIT-Rezeptors in DLD-1-Zellen führten. Für die siRNA 22 war der Nachweis nicht erfolgreich.



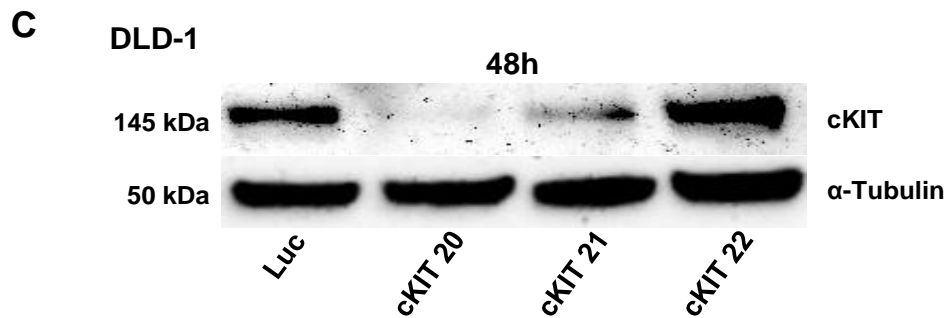


Abbildung 3.33 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der cKIT-spezifischen siRNAs in SW480- und DLD-1-Zellen.

Die Funktionsfähigkeit der drei cKIT-spezifischen siRNAs 20, 21 und 22 wurde in SW480- und DLD-1-Zellen 48h und 72h nach der Transfektion mit Hilfe der qRT-PCR (A, B) und der Western Blot-Analyse (C) überprüft. Die Transfektion wurde zweimal durchgeführt und die cKIT-Expression jeweils in zwei unabhängigen qRT-PCRs analysiert. Die Ergebnisse wurden gemittelt und relativ zur LUC-Kontrolle dargestellt. 72h nach der Transfektion war die cKIT-Expression der SW480-Zellen auf mRNA-Ebene um über 80% verringert. In DLD-1-Zellen konnte 48h nach der Transfektion auf mRNA-Ebene eine Verringerung der cKIT-Expression um ca. 60% detektiert werden. 72h nach der Transfektion stieg die cKIT-Expression für die mit den siRNAs 20 und 21 transfizierten Zellen wieder an. Die mit der siRNA 22 transfizierten Zellen zeigten eine Verringerte cKIT-Expression um ca. 75%. In der Western Blot-Analyse zeigte sich, dass die siRNAs 20 und 21 zu einer deutlichen Herunterregulierung des cKIT-Rezeptors in DLD-1-Zellen führten. Für die siRNA 22 war der Nachweis nicht erfolgreich.

3.4.4.2 Analysen zur Viabilität der SW480- und DLD-1-Zellen nach cKIT-Inhibition

Der Einfluss der cKIT-Inhibition auf die Viabilität kolorektaler Karzinomzellen sollte untersucht werden. Dazu wurden SW480- und DLD-1-Zellen mit siRNA gegen cKIT transfiziert und die Proliferation bzw. Todesrate der Zellen bestimmt (Abbildung 3.34).

Die Inhibition des Rezeptors cKIT mittels siRNA führte sowohl in SW480- als auch in DLD-1-Zellen zu einer moderaten Verringerung der Proliferationsrate um 15% bis 20%. Eine Veränderung in der Sterblichkeitsrate der Zellen konnte nur für die siRNA 21 in DLD-1-Zellen detektiert werden. Hier stieg die Todesrate um 15%.

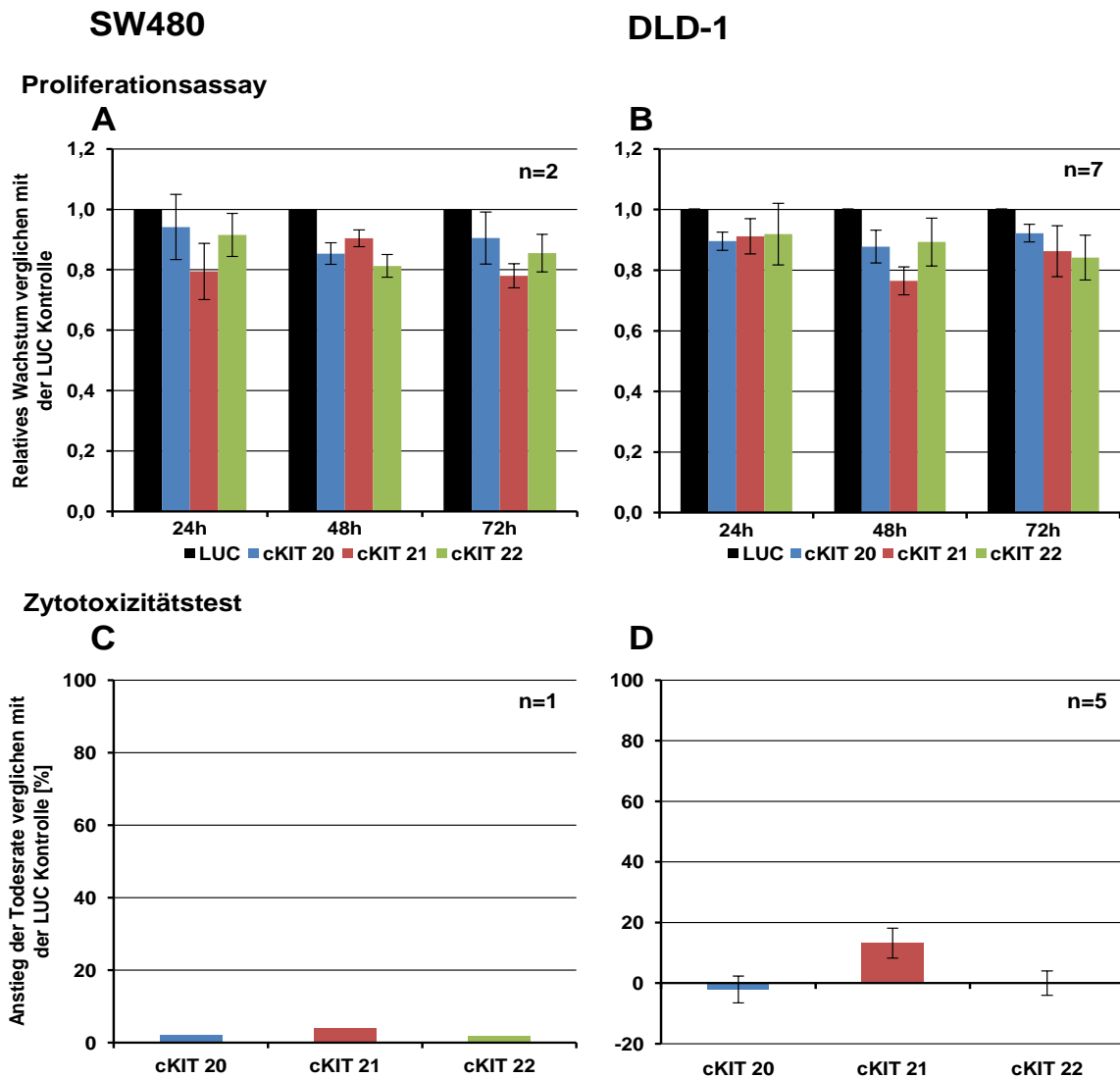


Abbildung 3.34 Viabilität der SW480- und DLD-1-Zellen nach Inhibition des Rezeptors cKIT *via* siRNA.

Nach der Inhibition des Rezeptors cKIT mit siRNA (cKIT 20, cKIT 21 oder cKIT 22) wurden die SW480- und DLD-1-Zellen auf Veränderungen der Proliferationsrate (A, B) und Todesrate (C, D) untersucht. Als Kontrolle wurden die Zellen mit LUC-siRNA transfiziert. Alle Ergebnisse wurden gemittelt und relativ zur LUC-Kontrolle dargestellt. Die Inhibition des Rezeptors cKIT mittels siRNA führte sowohl in SW480- (A, C) als auch in DLD-1-Zellen (B, D) zu einer moderaten Verringerung der Proliferationsrate. Eine Veränderung in der Todesrate der Zellen konnte nur für die siRNA cKIT 21 in DLD-1-Zellen detektiert werden.

3.4.4.3 Analyse der Zellzyklusphasen nach Inhibition von cKIT in SW480- und DLD-1-Zellen *via* Durchflusszytometrie

Um den Einfluss von cKIT auf den Zellzyklus zu analysieren, wurde cKIT in SW480- und DLD-1-Zellen mittels siRNA herunterreguliert. 72h nach der Transfektion wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt, wie viele Zellen sich jeweils in welcher Zellzyklusphase befanden. Die Analyse wurde dreimal für SW480- und viermal für DLD-1-Zellen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt (Abbildung 3.35).

In den SW480-Zellen hatte die cKIT-Inhibition keine Auswirkungen auf den Zellzyklus. In den DLD-1-Zellen führte lediglich die siRNA 21 zu einem Anstieg des Anteils an Zellen in der subG1-Phase von 12% auf 29%.

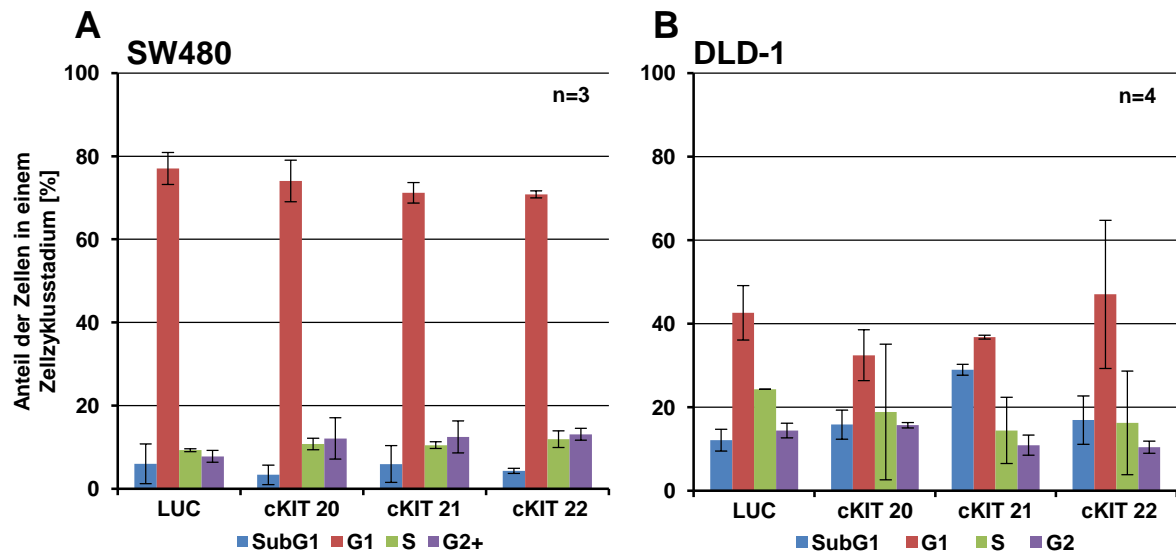


Abbildung 3.35 Überprüfung der Zellzyklusphasen nach cKIT-Inhibition in SW480- und DLD-1-Zellen.

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte 72h nach der Transfektion mit cKIT-spezifischen siRNAs via Durchflusszytometrie. In den SW480-Zellen (A) hatte die cKIT-Inhibition keine Auswirkungen auf den Zellzyklus. In den DLD-1-Zellen (B) führte die siRNA cKIT 21 zu einem moderaten Anstieg des Anteils der Zellen in der subG1-Phase von 12% auf 29%.

3.4.4.4 Analyse der Zellzyklusphasen nach gemeinsamer Inhibition von cKIT und PDGFR- β in SW480-Zellen via Durchflusszytometrie

Es sollte die Frage geklärt werden, ob der Einfluss des PDGFR- β -Inhibitors Ki11502 auf den Zellzyklus in SW480-Zellen durch eine zusätzliche Inhibition des Rezeptors cKIT vermittelt wird. Dafür wurde die Expression beider Rezeptoren parallel mit siRNA herunterreguliert und 72h später die Zellzyklusphasen via Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden die PDGFR- β -spezifischen siRNAs 37, 58 und 60, sowie die cKIT-spezifischen siRNAs 20, 21 und 22 in verschiedenen Kombinationen verwendet. Als Kontrolle wurde eine Luciferase-spezifische siRNA verwendet. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 3.36 dargestellt.

Die gemeinsame Inhibition des PDGFR- β und des Rezeptors cKIT mittels siRNAs führte zu keiner Veränderung der Zellzyklusphasen in SW480-Zellen.

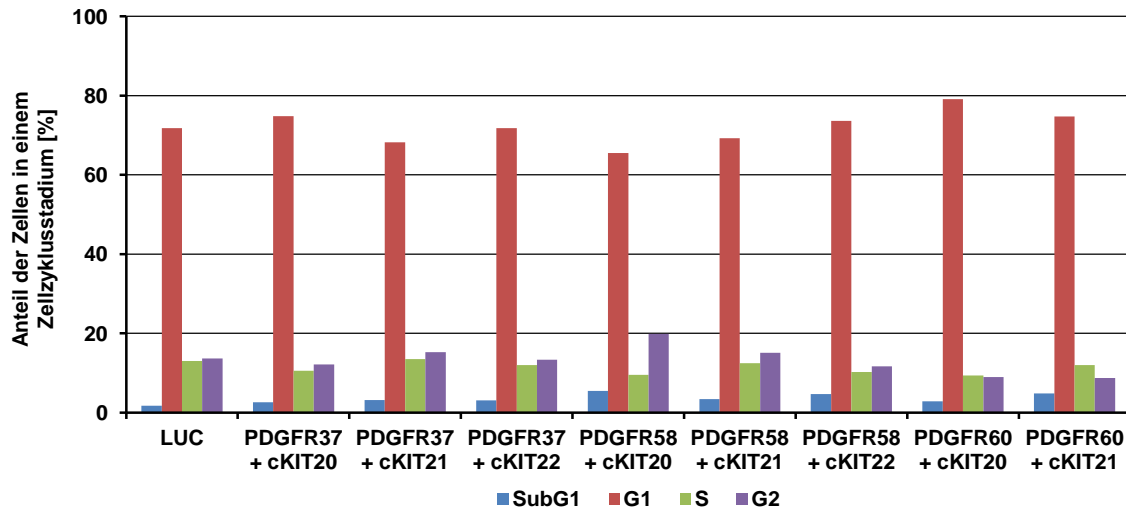


Abbildung 3.36 Überprüfung der Zellzyklusphasen nach simultaner cKIT/PDGFR- β -Inhibition in SW480-Zellen via Durchflusszytometrie.

Die Rezeptoren cKIT und PDGFR- β wurden mittels siRNA in SW480-Zellen herunterreguliert und 72h später der Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurden die cKIT-spezifischen siRNAs 20, 21 und 22 sowie die PDGFR- β -spezifischen siRNAs 37, 58 und 60 verwendet. Als Kontrolle diente die LUC-siRNA. Es konnte keine Veränderung im Zellzyklus festgestellt werden.

3.4.5 Klärung der Ursache für den G2/M-Arrest in SW480-Zellen nach der Behandlung mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass der Rezeptor cKIT nicht die Ursache für den G2/M-Arrest nach der Behandlung mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 darstellt. Um den Grund für diesen Zellzyklusarrest zu identifizieren, sollte der Einfluss des Inhibitors auf die Aktivität verschiedener Rezeptoren und deren nachfolgende Signalmoleküle untersucht werden. Anschließend wurde das Kandidatenprotein SRC (*v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*) detaillierter analysiert.

3.4.5.1 Analyse der Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und wichtiger nachfolgender Signalmoleküle nach der Behandlung mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 und PDGFR- β - bzw. cKIT-spezifischer siRNAs in SW480-Zellen

Um den Einfluss der Behandlung mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 oder PDGFR- β - bzw. cKIT-spezifischer siRNA auf andere Rezeptortyrosinkinasen und Signalwege zu untersuchen, wurde der *PathScan RTK signaling antibody array* der Firma Cell Signaling verwendet. Mit diesem Array kann der Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalproteine überprüft werden. Zunächst wurden SW480-Zellen mit spezifischer siRNA gegen PDGFR- β (siRNA 37), cKIT (siRNA 6) oder mit beiden siRNAs transfiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase transfiziert. Die Zellen wurden

zunächst für 48h unter normalen Bedingungen inkubiert. Nach Serumentzug über Nacht erfolgte am nächsten Tag eine Stimulation für 10min mit 10% FKS und anschließend die Proteinisolierung. Für die Inhibitorbehandlung wurden die SW480-Zellen zunächst für 48h mit 1µM bzw. 5µM Ki11502 behandelt. Auch diese Zellen wurden über Nacht ohne Serum inkubiert und anschließend mit 10% FKS stimuliert. Der Array wurde zweimal durchgeführt und die Werte gemittelt. Nur für die Kinase SRC konnten signifikante Veränderungen festgestellt werden. Die Inhibition des PDGFR-β und des cKIT-Rezeptors via siRNA führte zu einem deutlichen Anstieg im Phosphorylierungsstatus der Kinase SRC (Abbildung 3.37).

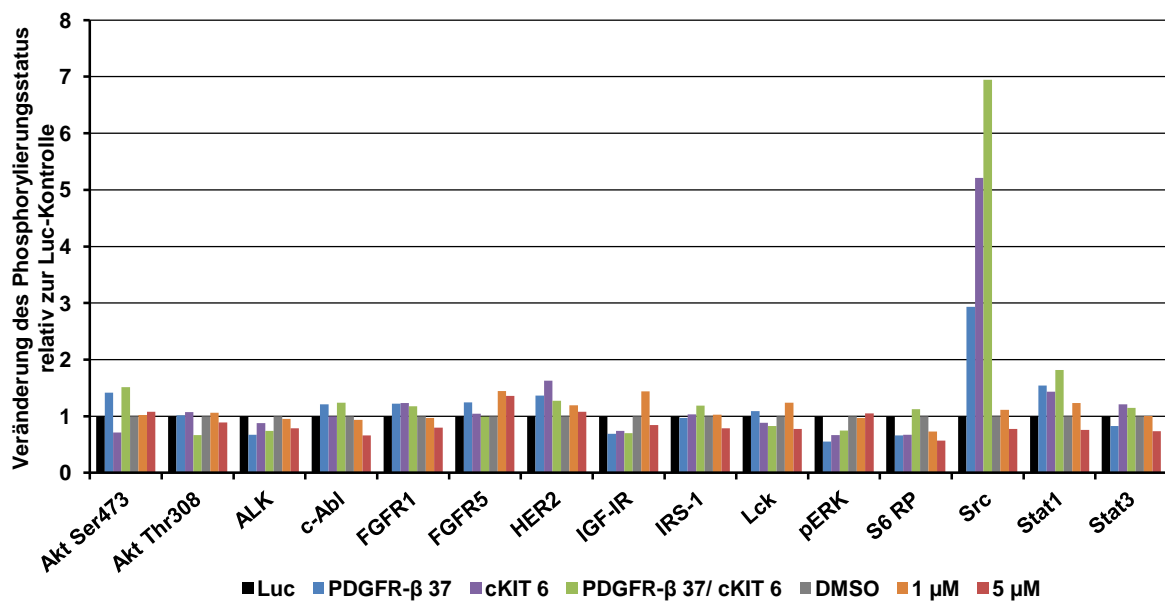


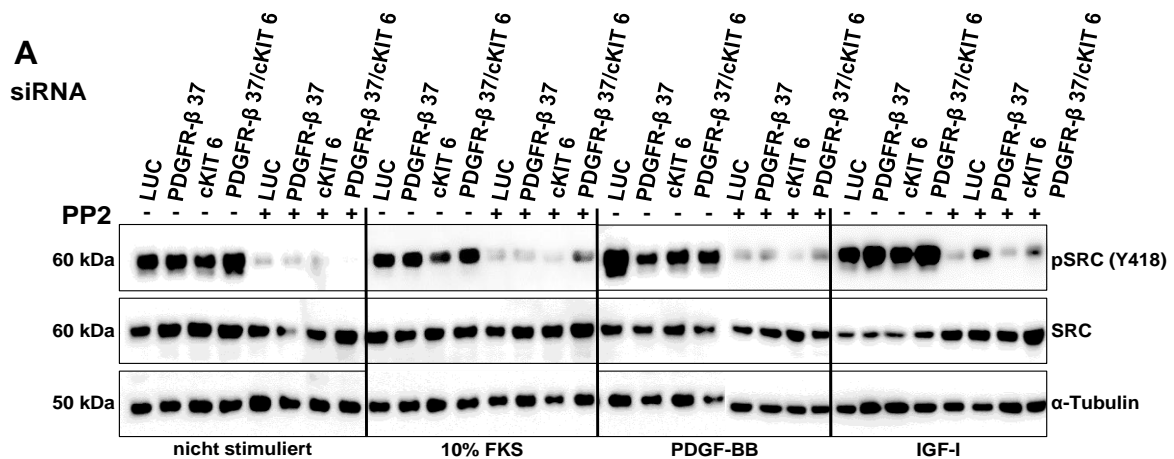
Abbildung 3.37 Bestimmung der Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und nachfolgender Signalproteine nach PDGFR-β- oder cKIT-Inhibition mit Hilfe des *PathScan RTK signaling antibody array*. Zunächst wurden SW480-Zellen mit spezifischer siRNA gegen PDGFR-β (37), cKIT (6) oder beiden transfiziert bzw. mit 1µM bzw. 5µM Ki11502 behandelt. Als Kontrolle wurde siRNA gegen Luciferase bzw. DMSO eingesetzt. Nach 48h wurden die Zellen über Nacht unter Serumentzug inkubiert, dann mit 10% FKS stimuliert und anschließend wurde Protein isoliert. Der Array wurde zweimal durchgeführt und die Werte gemittelt. Die Inhibition des PDGFR-β und des cKIT-Rezeptors via siRNA führte zu einem deutlichen Anstieg im Phosphorylierungsstatus der Kinase SRC. Die doppelte Inhibition beider Rezeptoren zeigte einen deutlich größeren Effekt. Die Behandlung der Zellen mit 5µM Ki11502 führte hingegen zu einer verminderten Aktivierung von SRC.

3.4.5.2 Überprüfung der Aktivität der Kinase SRC nach Behandlung von SW480- und DLD-1-Zellen mit dem PDGFR-β-Inhibitor Ki11502, PDGFR-β- bzw. cKIT-spezifischer siRNA und dem SRC-Inhibitor PP2

Für die weitere Analyse des Einfluss der Behandlung mit dem PDGFR-β-Inhibitor Ki11502 oder PDGFR-β- bzw. cKIT-spezifischen siRNAs auf die Kinase SRC, wurde der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität der Kinase mit Hilfe von Western Blot-Analysen untersucht. SW480- und DLD-1-Zellen wurden entweder mit 1µM, 5µM oder 20µM

des Inhibitors Ki11502, PDGFR- β -siRNA 37 bzw. cKIT-siRNA 6 spezifischer siRNA oder der Kombination beider siRNAs behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit LUC-siRNA bzw. DMSO behandelt. Außerdem wurden die Zellen zum Teil mit 10 μ M des SRC-spezifischen Inhibitors PP2 behandelt. Alle Zellen wurden zunächst 48h unter normalen Serumkonditionen kultiviert und anschließend über Nacht unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 10min mit 10% FKS, 10ng/ml PDGF-BB, 10ng/ml EGF oder 10nM IGF-I stimuliert und die jeweiligen Proteine isoliert. Als Kontrolle wurde auch nicht stimuliertes Protein der SW480- und DLD-1-Zellen isoliert. Die Behandlung mit dem SRC-Inhibitor PP2 führte sowohl in SW480- als auch in DLD-1-Zellen zu einer deutlichen Inhibition von SRC. Die Auswertung der Ergebnisse der SW480-Zellen zeigte, dass die Inhibition des PDGFR- β oder des cKIT-Rezeptors via siRNA in keiner Reduktion der Aktivität der SRC Kinase resultiert. Weiterhin spielte es keine Rolle, mit welchem Liganden die Zellen stimuliert wurden. Wurde zusätzlich zur siRNA-vermittelten Rezeptorblockade noch SRC mit PP2 inhibiert, konnte eine Reduktion der Aktivität von SRC beobachtet werden, die auch durch Stimulation nicht induziert werden konnte. Die Verwendung des Inhibitors Ki11502 hingegen führte *per se* zu einer Reduktion der SRC-Aktivität nach Stimulation mit 10% FKS, PDGF-BB, IGF-I oder EGF, wobei eine Dosisabhängigkeit beobachtet werden konnte. Dabei waren die beobachteten Effekte des Aktivitätsverlusts von SRC bei den höchsten Konzentrationen von Ki11502 stärker als die Inhibition mit dem SRC-spezifischen Inhibitor PP2 (Abb. 3.39B). Die Effekte konnten weitestgehend in DLD-1-Zellen reproduziert werden.

SW480



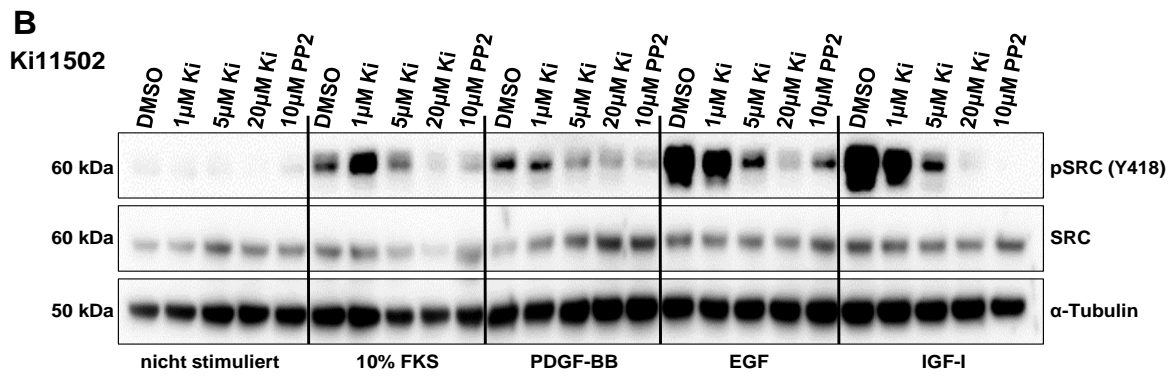


Abbildung 3.38 Analyse des Phosphorylierungszustandes von SRC in SW480-Zellen nach Blockade des PDGFR- β mittels siRNA oder des Inhibitors Ki11502.

Die SW480-Zellen wurden mit PDGFR β -spezifischer siRNA (37), cKIT-spezifischer siRNA (6) oder einer Kombination von beiden transfiziert (A) bzw. mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors Ki11502 (Ki) und dem SRC-Inhibitor PP2 behandelt (B) und für 48h inkubiert. Nach Serumentzug über Nacht erfolgte eine Stimulation der Zellen für 10min mit 10% FKS, 10ng/ml PDGF-BB, 10nM IGF-I und 10ng/ml EGF. Die Aktivität von SRC wurde mittels Western Blot-Analyse mit einem phospho-Tyrosin Antikörper nachgewiesen. Es ist zu erkennen, dass die Herunterregulierung von PDGFR- β und cKIT zu keiner Veränderung der Aktivität von SRC führt, während die Inhibition mittels Ki11502 die Aktivität stärker beeinträchtigt als die Inhibition mit dem SRC-Inhibitor PP2.

DLD-1

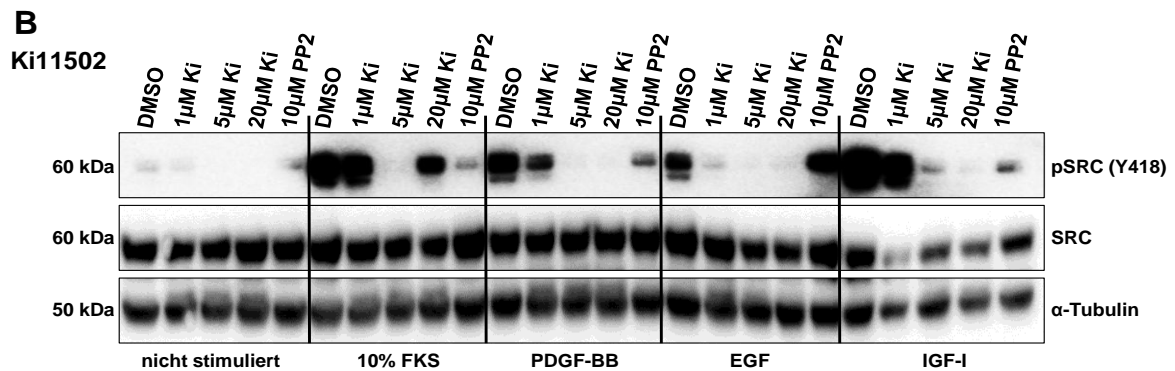
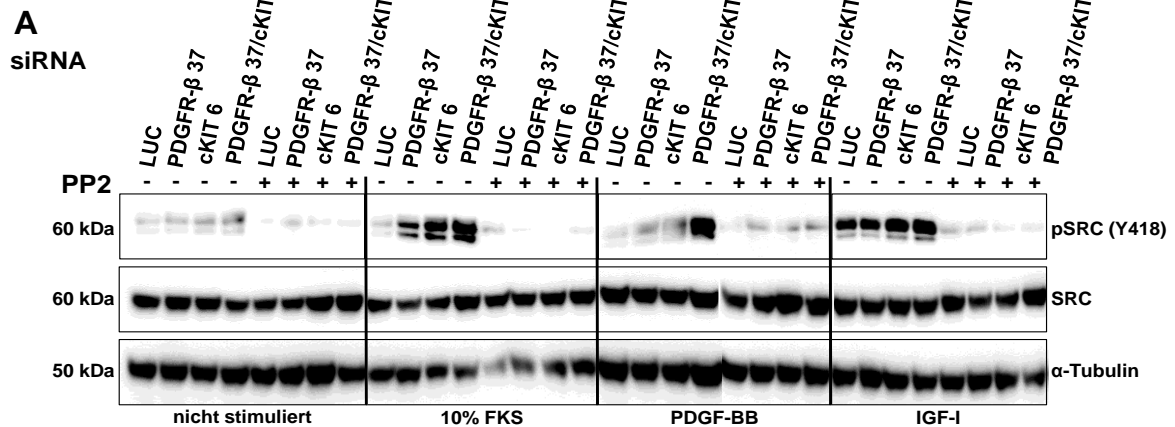


Abbildung 3.39 Analyse des Phosphorylierungszustandes von SRC in DLD-1-Zellen nach Blockade des PDGFR- β mittels siRNA oder des Inhibitors Ki11502.

Die DLD1-Zellen wurden mit PDGFR- β -spezifischer siRNA (37), cKIT-spezifischer siRNA (6) oder einer Kombination von beiden transfiziert (**A**) bzw. mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors Ki11502 (Ki) und dem SRC-Inhibitor PP2 behandelt (**B**) und für 48h inkubiert. Nach Serumentzug über Nacht erfolgte eine Stimulation der Zellen für 10min mit 10% FKS, 10ng/ml PDGF-BB, 10nM IGF-I und 10ng/ml EGF. Die Aktivität von SRC wurde mittels Western Blot-Analyse mit einem phospho-Tyrosin Antikörper nachgewiesen. Es ist zu erkennen, dass die Herunterregulierung von PDGFR- β und cKIT zu keiner Veränderung der Aktivität von SRC führt, während die Inhibition mittels Ki11502 die Aktivität stärker beeinträchtigt als die Inhibition mit dem SRC-Inhibitor PP2.

3.4.5.3 Überprüfung des Einflusses der Kinase SRC auf die Proliferation von SW480- und DLD-1-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der Kinase SRC einen Einfluss auf die Proliferationsrate von SW480- und DLD-1-Zellen ausübt, wurden verschiedene Behandlungen der Zellen miteinander verglichen. Die SW480- und DLD-1-Zellen wurden unter anderem mit spezifischer siRNA gegen PDGFR- β (siRNA 37), cKIT (siRNA 6) oder der Kombination aus beiden siRNAs transfiziert. Als Kontrolle diente siRNA gegen Luciferase. Jede Fraktion wurde einmal in Anwesenheit und einmal in Abwesenheit des SRC-Inhibitors PP2 inkubiert. Die Bestimmung der Proliferationsrate von SW480- und DLD-1-Zellen erfolgte 48h und 72h nach der Transfektion. Außerdem wurde die Proliferationsrate von SW480- und DLD-1-Zellen nach 48h bzw. 72h Behandlung mit 5 μ M oder 20 μ M Ki11502, DMSO oder 10 μ M PP2 bestimmt (n=4). Abbildung 3.40 A zeigt, dass bei SW480-Zellen alle Behandlungsvarianten zu einer Proliferationsminderung führen. Der Effekt der gemeinsamen siRNA/PP2-Behandlung ist in SW480-Zellen mit einer Proliferationsabnahme von durchschnittlich 20% stärker ausgeprägt als der der alleinigen siRNA-Behandlung mit durchschnittlich 10%. Er ist jedoch geringer als der des Inhibitors Ki11502 mit einer Proliferationsabnahme von bis zu 30% (20 μ M Ki11502). Auch bei den DLD-1-Zellen führten alle Behandlungsmöglichkeiten zu einer Proliferationsminderung (Abbildung 3.40 B). Am geringsten ist der Effekt auf die Proliferation von DLD-1-Zellen bei der siRNA-Transfektion mit einer maximalen Proliferationsverminderung von 10% durch die siRNA 37. Die kombinierte siRNA/PP2-Behandlung führt zu einer deutlich stärkeren Proliferationsminderung bei DLD1-Zellen (30%). Der größte Effekt auf die Proliferation von DLD-1-Zellen mit einer Verminderung von ca. 60% (20 μ M Ki11502) wurde auch hier durch den Inhibitor Ki11502 erreicht.

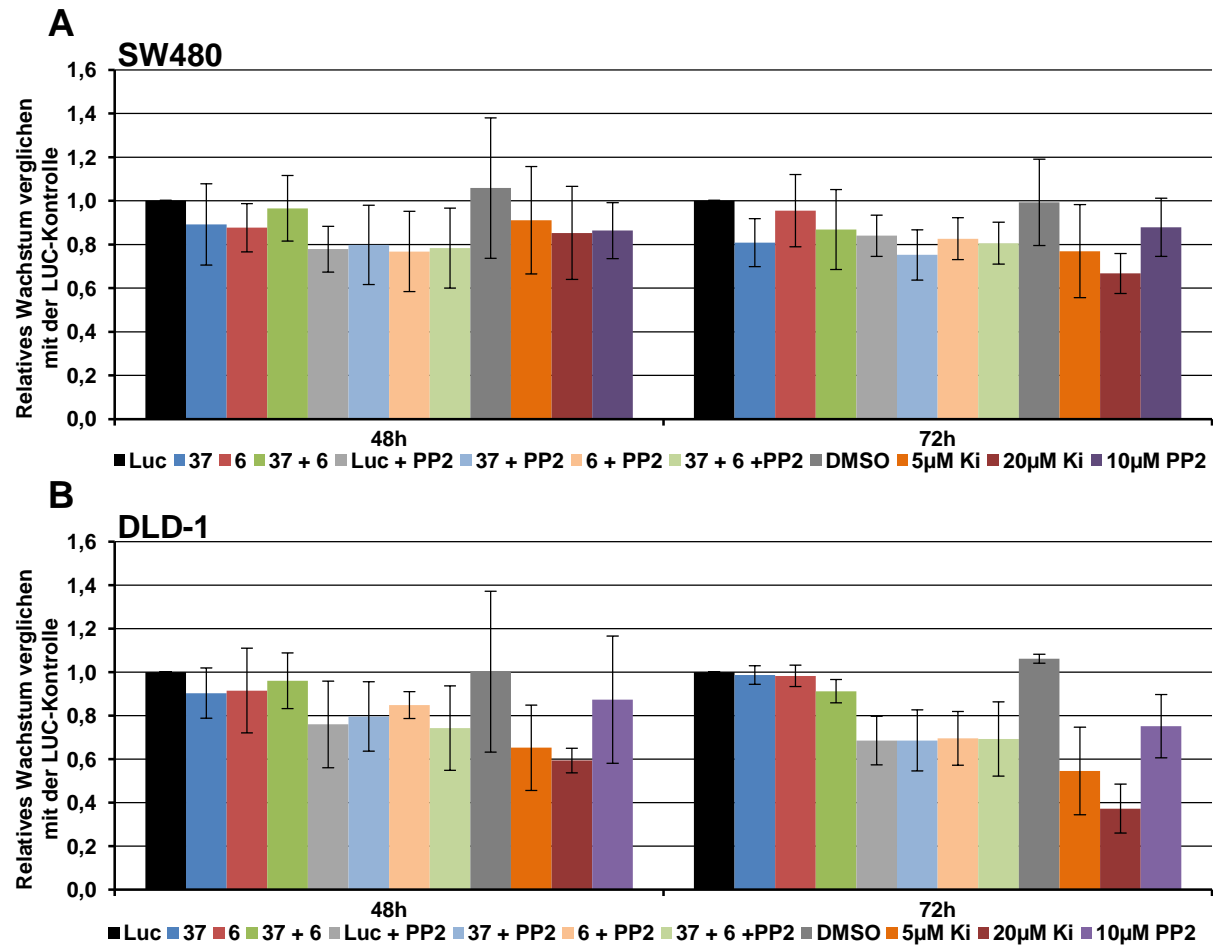


Abbildung 3.40 Proliferationsänderung nach der Inhibition von PDGFR- β , cKIT oder SRC in SW480- und DLD-1-Zellen.

SW480- (A) und DLD-1-Zellen (B) wurden mit spezifischer siRNA gegen den PDGFR- β (37) cKIT (6) oder der Kombination aus beiden siRNAs transfiziert. Als Kontrolle diente siRNA gegen Luciferase (LUC). Jede Fraktion wurde einmal in Anwesenheit und einmal in Abwesenheit des SRC-Inhibitors PP2 inkubiert. Außerdem wurden Zellen mit 5 μ M oder 20 μ M Ki11502, DMSO oder 10 μ M PP2 behandelt. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte 48h und 72h nach der Transfektion bzw. dem Start der Inhibitorbehandlung. Der Versuch wurde viermal wiederholt und die Werte gemittelt. Bei beiden Zelllinien führten alle Behandlungsvarianten zu einer Verminderung der Proliferationsrate. Am geringsten war der Effekt bei der siRNA-Transfektion. Die siRNA/PP2-Behandlung führte zu einer deutlich stärkeren Proliferationsminderung. Den deutlichsten Effekt zeigte die Behandlung mit dem Inhibitor Ki11502.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen auf das Tumorwachstum und -überleben sowie auf den Therapieerfolg der 5-Fluoruracil- (5-FU) basierten Radiochemotherapie und das Auftreten von Resistenzen gegen diese im kolorektalen Karzinom analysiert werden.

Um die molekularen Ursachen für die Unterschiede im Therapieansprechen von Patienten mit Rektumkarzinom zu untersuchen, sollten zunächst primäre Zelllinien generiert werden, die anschließend anhand der Patientendaten, z.B. Tumorregression und Gesamtüberleben, in *responder*- und *non-responder*-Zelltypen eingeteilt und analysiert werden sollten. Hierfür wurden prospektiv 86 prätherapeutische Tumorbiopsien von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom und neun Gewebeproben von nicht vorbehandelten, komplett entnommenen Rektumkarzinomen aus dem oberen Rektumdrittel aufgearbeitet. Von allen Proben wurde Zellmaterial in die Zellkultur überführt. Hierbei wurden verschiedene Kulturbedingungen getestet. Zellen von neunzehn der 86 Biopsieproben und sieben der neun Resektatproben wuchsen zunächst in den Kulturschalen an und bildeten Kolonien. Nur vier Resektatproben ließen sich jedoch länger als sechs Wochen in Kultur halten. Für alle vier Proben zeigten immunhistochemische Färbungen, dass es sich bei den kultivierten Zellen um Zellen mesenchymalen Ursprungs handelte. Desweiteren wurde aufgearbeitetes Material von 46 Rektumkarzinombiopsien und sechs Gewebeproben kolorektaler Tumorsektate zur Vermehrung der Zellen in immundefiziente Mäuse injiziert. Nur eine Probe führte dabei zur Entwicklung eines Xenografttumors. Histopathologische Analysen zeigten, dass es sich bei dem entstandenen Tumor um ein mittelgradig differenziertes, teils schleimbildendes Adenokarzinom handelte. Alle aus diesem Tumor entstandenen Zelllinien ließen sich mit einer Karyotypisierung als Zellen murinen Ursprungs identifizieren. Außerdem wurde mit Hilfe der dreidimensionalen Zellkultur versucht, aus Material von zwölf Rektumkarzinombiopsien primäre Zelllinien zu generieren. Eine der verwendeten Biopsien wuchs an und konnte drei Monate kultiviert werden.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion des EGFR mit dem IGF-IR ein möglicher Resistenzmechanismus für die Radiochemotherapie darstellen könnte und ob eine kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR eine Verbesserungsmöglichkeit für die Therapie darstellen könnte, wurde der Einfluss der Inhibition der Rezeptoren auf eine kombinierte 5-FU-basierte Radiochemotherapie *in vitro* und *in vivo* untersucht. Zunächst wurde das Ansprechen der drei kolorektalen Karzinomzelllinien DLD-1, SW837 und Caco-2

auf die kombinierte Radiochemotherapie in Anwesenheit der Tyrosinkinaseinhibitoren AEW-541 (IGF-IR-Inhibitor) und Erlotinib (EGFR-Inhibitor) *in vitro* überprüft. Für alle drei Zelllinien zeigte sich, dass die gleichzeitige Inhibition des EGFR und des IGF-IR zu einem deutlichen Therapieeffekt führte. Der Effekt war bei den DLD-1-Zellen am geringsten und bei den Caco-2-Zellen am stärksten ausgeprägt. Um den Therapieeffekt der Rezeptorinhibition auch *in vivo* zu bestätigen, wurden Xenografttumoren aus DLD-1- bzw. SW837-Zellen der Radiochemotherapie mit zusätzlicher EGFR- und IGF-IR-Inhibition unterzogen. Für die DLD-1-Xenografttumore zeigte sich kein Einfluss auf die Tumorprogression. Im Gegensatz dazu führte die kombinierte Inhibition der Rezeptoren in den SW837-Xenografttumoren zu einer verlangsamten Tumorprogression.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, den *crosstalk*-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR zu analysieren. Mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation konnten sowohl in SW480- als auch in DLD-1-Zellen Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR nachgewiesen werden. Die IGF-IR/EGFR-Hybridrezeptorbildung konnte mit Hilfe des *Proximity Ligation Assay* in beiden Zelllinien bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Ligandenstimulation der Rezeptoren zu einer vermehrten EGFR/IGF-IR-Hybridrezeptorbildung führt. Weitere Analysen zeigten, dass für die induzierte Heterodimerisierung beide Liganden notwendig sind und beide Rezeptoren funktionsfähig sein müssen. Mit Hilfe des *Proximity Ligation Assays* konnten IGF-IR/EGFR-Hybridrezeptoren auch in humanen Rektumtumoren nachgewiesen werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollte die Bedeutung des PDGFR- β im kolorektalen Karzinom untersucht werden. Mittels Western Blot- und qRT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die PDGFR- β -Expression in verschiedenen kolorektalen Zelllinien deutlich unterscheidet. In SW480-Zellen führte die Inhibition des PDGFR- β mit Hilfe von siRNA oder dem Tyrosinkinaseinhibitor Ki11502 zu einer stark verminderten Proliferation der Zellen. Ein Anstieg in der Todesrate der Zellen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Die Überprüfung der nachfolgenden MAPK- und PI3K-Signalwege zeigte, dass durch die Inhibition des Rezeptors die Kinase AKT nach PDGF-BB-Stimulation nur noch vermindert aktiviert werden konnte. Im Gegensatz zur siRNA-Behandlung führte die Inhibition mit dem Inhibitor Ki11502 zu einem G2/M-Arrest in SW480-Zellen. Über Western Blot-Analysen konnte eine verminderte Cyclin B1-Expression als mögliche Ursache identifiziert werden. Da der Inhibitor Ki11502 in hohen Konzentrationen auch den Rezeptor cKIT inhibieren kann und qRT-PCR Analysen zeigten, dass die SW480-Zellen diesen auch exprimieren, sollte überprüft werden, ob der Zellzyklusarrest durch eine Inhibition von cKIT verursacht wird. Dafür wurden der Einfluss der siRNA- und der Ki11502-Behandlung in den kolorektalen Zelllinien Caco-2 und DLD-1 miteinander verglichen. Caco-2-Zellen exprimieren cKIT deutlich geringer als SW480, DLD-1

deutlich stärker. Die siRNA-Inhibition zeigte in beiden Zelllinien einen moderaten Rückgang der Proliferation, aber ohne eine Veränderung in der Todesrate der Zellen. Die Verwendung des Inhibitors führte in Caco-2-Zellen nur zu einer moderaten Reduktion der Proliferation ohne Veränderung der Todesrate. Die Auswirkungen auf den Zellzyklus waren geringer ausgeprägt als in den SW480-Zellen. Jedoch wurde auch hier eine Verschiebung von G1-Phase nach S- und G2-Phase beobachtet. In den DLD-1-Zellen führte die Inhibitorbehandlung zu einem starken Rückgang der Proliferation um bis zu 60% und zu einem Anstieg in der Todesrate der Zellen um bis zu 37%. Die Analyse des Zellzyklus zeigte, dass die Zellen durch Ki11502-Behandlung in die SubG1-Phase wechselten. Diesem Hinweis folgend wurde nun der Einfluss einer cKIT-Inhibition mittels siRNA in den Zelllinien SW480 und DLD-1 untersucht. Die Inhibition führte in beiden Zelllinien zu einem moderaten Rückgang der Proliferation ohne Veränderung der Todesrate. Ein Einfluss auf den Zellzyklus ließ sich nicht nachweisen. Auch die kombinierte Inhibition von PDGFR- β und von cKIT *via* siRNAs führte zu keiner Veränderung im Zellzyklus. Somit konnte gezeigt werden, dass der G2/M-Arrest der SW480-Zellen nach der Inhibitorbehandlung nicht cKIT abhängig ist. Durch die Verwendung eines Arrays zur Analyse der Aktivität verschiedener Rezeptoren und Kinasen konnte die Proteinkinase SRC als möglicher Vermittler für den G2/M-Arrest identifiziert werden. Weitergehende Western Blot-Analysen in den Zelllinien SW480 und DLD-1 konnten zeigen, dass der Inhibitor Ki11502 die Aktivität von SRC inhibiert, die siRNA-vermittelte Blockade von PDGF-R- β und cKIT jedoch diese erhöht. Zusätzlich konnte in SW480- und DLD-1-Zellen gezeigt werden, dass die Inhibition von SRC zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate führte.

4.2 Resistenzen bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms und die Suche nach Biomarkern

4.2.1 Therapiemöglichkeiten beim kolorektalen Karzinom

Die Wahl der Therapie hängt beim kolorektalen Karzinom vom Stadium der Erkrankung und von der Lage des Tumors ab. Wenn keinerlei Metastasen vorliegen und der Tumor bisher maximal die *tunica muscularis* infiltriert hat, erfolgt im Allgemeinen nur ein operativer Eingriff, bei dem der tumortragende Darmabschnitt sowie das umgebende Lymphabflusssystem entfernt werden (Schmiegel *et al.*, 2008). Bei fortgeschrittener Erkrankung, das heißt tieferer Infiltration des Tumors und evtl. Vorhandensein von Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen wird zusätzlich eine kombinierte Radiochemotherapie durchgeführt. Hierbei werden neben der ionisierenden Strahlung Zytostatika wie 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan einzeln oder in Kombination verabreicht. Bei der Standardbehandlung für das fortgeschrittene

Rektumkarzinom erfolgt in weiten Teilen Europas und der USA zunächst eine präoperative Radiochemotherapie mit 5-FU und gegebenenfalls Oxaliplatin oder Irinotecan, um den Tumor zu verkleinern. Um verbliebene Tumorzellen zu vernichten wird adjuvant zur Operation eine viermonatige Chemotherapie mit 5-FU verabreicht, (Schmiegel *et al.*, 2008, Rodel *et al.*, 2012).

4.2.2 Resistenzen und Biomarker

Ein großes Problem bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms ist jedoch, dass die Patienten unterschiedlich auf die kombinierte Radiochemotherapie ansprechen. Bei manchen Patienten führt die Behandlung zu einer vollständigen Heilung, bei anderen zeigt sich keine Verbesserung des Krankheitsbildes. Auch ist die Stärke der Nebenwirkungen von Patient zu Patient verschieden. In manchen Fällen muss die Dosierung der Medikamente aufgrund von akuten Nebenwirkungen reduziert oder die Therapie sogar vollständig beendet werden (Cunningham *et al.*, 2004, Sauer *et al.*, 2004, Minsky 2009). Die Effekte der Radiochemotherapie beruhen hauptsächlich auf der Schädigung der DNA. Diese Schäden entstehen entweder dann, wenn die ionisierende Strahlung ein DNA-Molekül trifft, oder durch chemische Radikale, welche durch die Strahlung entstehen. Die Chemotherapie wirkt dabei sensibilisierend und unterstützt die DNA-Schädigung (Seiwert *et al.*, 2007, Katz *et al.*, 2009). Die durch die Behandlung hervorgerufenen Veränderungen, wie bestimmte DNA/Proteinverbindungen, Einzel- sowie Doppelstrangbrüche der DNA sorgen dafür, dass die Karzinomzellen in Apoptose übergehen. Sie sind aber auch für die Nebenwirkungen verantwortlich (Cunningham *et al.*, 2010). Das unterschiedliche Ansprechen auf die Radiochemotherapie kann zum Teil auf eine Kombination von vier verschiedenen Ursachen zurückgeführt werden (Grade *et al.*, 2012).

1) Es ist bekannt, dass die Effekte der Bestrahlung in hypoxischen Zellen geringer ausfallen. Die Menge der induzierten DNA-Schäden ist dann evtl. nicht ausreichend, damit die Zelle in die Apoptose geht. Tumore, die schlecht auf eine Radiochemotherapie ansprechen, zeigen oft einen hohen Anteil an hypoxischen Zellen. Mit zunehmender Tumorgöße wird dies wichtiger, da große Tumoren größere hypoxische und nekrotische Bereiche mit geringem Sauerstoffgehalt aufweisen (Steel und Peacock 1989, Vaupel *et al.*, 1991).

2) Zellen, die sich im Zellzyklus in einer Wachstumsphase befinden, reagieren deutlich sensitiver auf die Radiochemotherapie als Zellen in einer Ruhephase. Der Anteil an proliferierenden Zellen innerhalb eines Tumors nimmt somit auch Anteil an dessen Ansprechen auf die Therapie. Tumorbereiche mit stark proliferierenden Zellen sind demnach besonders anfällig für die Behandlung (Zaider und Hanin 2011).

3) Verschiedene Tumore besitzen ein unterschiedliches Potential für die DNA-Reparatur. Dieses korreliert mit dem Ansprechen auf die Therapie. Zellen mit einem hohen Potential für die DNA-Reparatur sprechen schlechter auf die Therapie an. Sie können die durch die Therapie entstandenen DNA-Schäden schneller beheben, und so wird die benötigte Menge an DNA-Schäden, die für den Eintritt in die Apoptose benötigt wird, schwieriger erreicht (Weichselbaum und Little 1982).

4) Unabhängig vom Mutationsstatus des Tumors hat jeder Patient eine individuelle genetisch bedingte Sensibilität für die Radiochemotherapie. Da alle Tumorzellen letztendlich von normalem Gewebe abstammen, lässt sich diese teilweise auch auf die Tumorzellen übertragen (Steel und Peckham 1979). Diese These wird unterstützt durch die Beobachtung, dass bei Patienten mit inoperablen Hals-Kopf-Karzinomen die Überlebensrate signifikant mit den während der Behandlung auftretenden akuten Nebenwirkungen korreliert (Wolff *et al.*, 2011).

Bei allen Punkten stellt sich die Frage, welche genetischen oder epigenetischen Unterschiede den Unterschieden zugrunde liegen. Seit einigen Jahren wird daher versucht, sogenannte Biomarker zu identifizieren, die schon vor Therapiebeginn eine Prognose über das Therapieansprechen erlauben. Dies könnte in Zukunft dazu führen, dass Patienten eine individuell zugeschnittene Therapie erhalten (Kuremsky *et al.*, 2009). Um solche Biomarker zu finden, werden Karzinome von Patienten mit gutem Therapieansprechen (*responder*) molekulargenetisch mit denen von Patienten mit einer Therapieresistenz (*non-responder*) verglichen. Sowohl für das Kolonkarzinom als auch für das Rektumkarzinom wurden bisher eine Reihe von Studien durchgeführt, bei denen Tumormaterial von *respondern* und *non-respondern* mit Hilfe von DNA-*microarrays* verglichen wurde (zusammengefasst bei (Brettingham-Moore *et al.*, 2011, Grade *et al.*, 2012). Obwohl viele der Studien innerhalb ihrer eigenen Patientenkohorte molekulare Signaturen identifizieren konnten, die mit einem Ansprechen auf die Radiochemotherapie korreliert sind, finden sich zwischen den Studien kaum Überlappungen. Dafür gibt es jedoch mehrere Gründe. Zum Einen waren die Patientenkohorten teilweise sehr klein, was eine statistisch signifikante Verallgemeinerung der Ergebnisse schwierig macht. Zum anderen unterscheiden sich die Studien in wichtigen Punkten zum Teil erheblich voneinander: die Definitionen von *responder* und *non-responder* sowie die verabreichten Therapien oder das Erkrankungsstadium der Studienteilnehmer wurden unterschiedlich gewählt. Zusätzlich unterscheiden sich die verwendeten DNA-*microarrays* in der Anzahl und Art der untersuchten Gene. So konnten bis jetzt keine allgemeingültigen molekularen Signaturen identifiziert werden, die mit ausreichender Sicherheit eine Prognose über das Therapieansprechen (prädiktive Marker) oder Langzeitüberleben (prognostische Marker) erlauben (Cunningham *et al.*, 2010). Bisher

konnten lediglich einzelne alleinstehende Biomarker identifiziert werden. So haben Tumorzellen mit einer hohen Mikrosatelliteninstabilität Defizite bei der DNA-Reparatur, was zu einer verbesserten Prognose für die Patienten führt (Popat *et al.*, 2005, Bertagnolli *et al.*, 2009, Tejpar *et al.*, 2011). Für die Thymidilat-Synthase ist sowohl eine die Expression erhöhende Mutation, wie auch ein die Expression reduzierender *Single Nucleotide Polymorphism* bekannt. Karzinome mit einem hohen Level an Thymidilat-Synthase sprechen schlecht auf die 5-FU-basierte Radiochemotherapie an, Karzinome mit einem verminderten Level gut (Cunningham *et al.*, 2010). Bestimmte Mutationen im Interleukin 8- oder im VEGF-Gen (*Vascular-Endothelial Growth Factor*) steigern die Expression von VEGF, was mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Rezidiven assoziiert ist. Desweiteren ist eine verringerte Expression des Signalproteins *Mothers against decapentaplegic homolog 4* (SMAD 4) mit einer schlechten Überlebensprognose bei der 5-FU-basierten Radiochemotherapie assoziiert (Alazzouzi *et al.*, 2005, Alhopuro *et al.*, 2005). Keiner dieser Biomarker lässt sich jedoch bisher gewinnbringend in der klinischen Versorgung einsetzen. Außerdem ist bei nur wenigen Markern die Aussagekraft nicht ausreichend (Cunningham *et al.*, 2010). Die Suche nach neuen Biomarkern ist deshalb weiterhin von großem Interesse und Gegenstand der aktuellen Forschung (Kuremsky *et al.*, 2009, Brettingham-Moore *et al.*, 2011, Grade *et al.*, 2012).

4.2.3 Die Vorzüge eines *in vitro*-Systems

Die direkte Verwendung von Patientenmaterial hat für die Suche nach neuen Biomarkern einige Nachteile. Ein wichtiger Punkt ist hierbei die begrenzte Menge des vorhandenen Tumormaterials, wodurch ein Austausch von Material zwischen den Arbeitsgruppen verhindert wird. Dies ist insofern problematisch, da, wie beschrieben, verschiedene Studien oft nicht miteinander vergleichbar sind. Auch müssen für neue Studien immer neue Patienten rekrutiert werden. Die Menge an Analysen, die durchgeführt werden kann, ist ebenfalls begrenzt. Weitere Probleme entstehen durch die Probe selbst. Ein Großteil der Tumoren ist durchsetzt mit Stromazellen und eingewanderten Lymphozyten. Auch enthalten die Tumore nekrotische Bereiche, die evtl. Einfluss auf die Ergebnisse haben können (Gerdes *et al.*, 2000).

Aus unserer Sicht ist es daher sinnvoll, aus nicht behandelten Tumoren primäre Zelllinien zu etablieren, diese in *responder*- und *non-responder*-Zelllinien einzuteilen, um dann weitere Analysen *in vitro* durchzuführen. Die Vermehrung der Tumorzellen in der Zellkultur würde einen Austausch von Tumormaterial ermöglichen. Auch würden die Zelllinien für zukünftige Analysen zur Verfügung stehen. Langfristig könnte so eine große Sammlung an verschiedenen Tumorzelllinien bereitgestellt werden. Besonders wichtig ist, dass in der Zellkultur eine ganze Reihe verschiedener experimenteller Möglichkeiten zur Verfügung

stehen. So kann durch eine Manipulation der Zellen der Einfluss identifizierter Biomarker validiert werden. Differenziell exprimierte Gene, die einen Einfluss auf das Resistenzverhalten haben könnten, können gezielt verändert werden, um zu überprüfen, ob die Zellen ihr Resistenzverhalten dadurch ändern. Weiterhin können die Zellen unterschiedlichen Therapien unterzogen werden, um zu überprüfen, ob sie verschiedene Resistenzen aufweisen und auf verschiedene Therapien unterschiedlich reagieren. Dadurch könnten Marker-Signaturen identifiziert werden, die eine Aussage auf das Ansprechen verschiedener Therapieschemata ermöglichen und so langfristig im Vorfeld bei der Therapiewahl helfen könnten. Mit Hilfe von Xenografttumoren aus den Zelllinien lassen sich gewonnene Erkenntnisse auch *in vivo* überprüfen.

Das Etablieren von kolorektalen Zelllinien *in vitro* ist jedoch problematisch. Die Erfolgsrate für das Anwachsen der Zellen liegt nur bei ca. 10% (Dalerba *et al.*, 2005). Auch gibt es nur wenige Publikationen, die erfolgreich die Etablierung von kolorektalen primären Zelllinien zeigen konnten. Zumeist wurden dafür Tumorresektate aufgearbeitet (Gibson *et al.*, 1999, Yao *et al.*, 2004, Oikonomou *et al.*, 2007).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, primäre Rektumkarzinomzelllinien zu generieren. Dafür wurden prospektiv prätherapeutischen Biopsien von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom und Gewebeproben von nicht vorbehandelten komplett entnommenen Rektumtumoren aus dem oberen Rektumdrittel verwendet. Für die Aufarbeitung und Kultivierung der Tumorzellen wurden die Protokolle von Gerdes *et al.*, (2000) und Oikonomou *et al.*, (2007) zusammengefasst und variiert. Da die erhaltenen Biopsien lediglich Stecknadelkopf- bis Erbsengröße hatten, wurde zum Teil versucht, das Material in immundefizienten Mäusen subkutan zu vermehren. Obwohl die Erfolgsrate für das Anwachsen der Zellen deutlich über dem erwarteten Wert lag (22% Biopsien/ 77% Tumorresektat), konnten keine Tumorzellen länger als vier bis sechs Wochen in Kultur gehalten werden. Diese Beobachtungen werden zum Teil in der Literatur bestätigt. So konnten Dalerba *et al.* zeigen, dass kurzlebige kolorektale Primärzelllinien keine konstitutive Telomeraseaktivität besitzen (Dalerba *et al.*, 2005). Diese Zellen gehen durch progressive Verkürzung der Telomere in Seneszenz. Auch die Tatsache, dass bei der *American Type Culture Collection* lediglich zwei humane rektale Karzinomzelllinien verfügbar sind, weist daraufhin, dass die Generierung solcher Zelllinien sehr schwierig ist.

Neben den maligne transformierten Epithelzellen besteht ein Tumor noch aus weiteren verschiedenen, nicht epithelialen Zelltypen wie Endothelzellen, Perizyten, Zellen der glatten Muskulatur, Makrophagen und Fibroblasten. Zusammen mit der extrazellulären Matrix bilden diese Zellen eine komplexe Umgebung für die Epithelzellen, die großen Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten der Epithelzellen hat. Die Umgebung normaler

Epithelzellen unterscheidet sich deutlich von der innerhalb eines Tumors. Induziert durch die transformierten Epithelzellen verändert sich während der Tumorgenese zum Teil das Verhalten der anderen Zellen. So verändert sich die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix, Fibroblasten proliferieren stärker, und es werden vermehrt parakrine Wachstumsfaktoren und Cytokine sekretiert (Bissell und Radisky 2001, Bhowmick *et al.*, 2004, Mueller und Fusenig 2004). In kolorektalem Karzinomgewebe und in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien konnten Yauch *et al.* eine Überexpression des Signalproteins *hedgehog* (Hh) nachweisen. Eine Inhibition des Hh-Signalwegs in den Zelllinien zeigte keine Effekte. Die Inhibition des Hh-Signalwegs im Stroma immundefizienter Mäuse bewirkte jedoch, dass sich Xenografttumore von zwei primären und mehreren etablierten kolorektalen Zelllinien mit einer geringeren Effizienz bildeten und langsamer wuchsen (Yauch *et al.*, 2008). Vermeulen *et al.* konnten mittels immunhistochemischen Färbungen an Kolonkarzinomen zeigen, dass Epithelzellen mit einer hohen Aktivität des Wnt- (*wingless-type MMTV integration site family*) Signalwegs (angezeigt, durch eine hohe Akkumulation von β -catenin im Zellkern) auch die Stammzellmarker CD133 (*prominin 1*) und CD166 (*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*) exprimierten. Diese Zellen lagen innerhalb des Tumors in unmittelbarer Nähe von Myofibroblasten des Stromas. Die Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass während der Kultivierung dieser primären Epithelzellen unter normalen Zellkulturbedingungen die Expression der Stammzellmarker und die Aktivität des Wnt-Signalwegs verloren gehen. Wurden die Zellen mit einer Myofibroblastenzelllinie co-kultiviert oder in einem durch Myofibroblasten konditionierten Medium (MK-Medium) inkubiert, so bleiben die Expression der Stammzellmarker und die hohe Aktivierung des Wnt-Signalwegs erhalten. Bei der Injektion in immundefiziente Mäuse zeigte sich, dass die Effizienz zur Tumorbildung bei den Zellen mit Stammzellmarker-Expression (+SM) deutlich höher war als bei den Zellen ohne (-SM). Nähere Analysen des MK-Mediums konnten hohe Konzentrationen des Wachstumsfaktors HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) nachweisen. Durch die Zugabe von HGF konnten -SM-Zellen in +SM-Zellen umgewandelt werden. Andererseits sorgte die Inhibition des HGF-Rezeptors bei den +SM-Zellen zu einem Verlust der Expression der Stammzellmarker und der Wnt-Signalweg-Aktivierung (Vermeulen *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Wechselwirkungen zwischen Epithelzellen und Stroma-Umgebung für das Tumorprogressionsverhalten sein können. Eine zusätzliche Stimulation der primären Zellkulturen mit HGF wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es wurden lediglich verschiedene Konzentrationen von FKS und NU-Serum getestet. Dies führte jedoch zu keiner Verbesserung bei der Etablierung von primären Rektumkarzinomzellen.

Dangles-Marie *et al.* konnten zeigen, dass bei der Generierung von primären Kolonkarzinomzelllinien die Erfolgsrate durch die Verwendung von Xenografttumoren

deutlich gesteigert werden konnte. So bildeten 77% der Tumore in immundefizienten Mäusen Xenografttumore. Von diesen ließen sich 47% anschließend in der Zellkultur kultivieren (Dangles-Marie *et al.*, 2007). In dieser Arbeit betrug die Anwachsrate für direkt in die Zellkultur überführte Zellen nur 9.7%. Obwohl die Erfolgsrate bei der Bildung von Xenografttumoren in unserer Arbeitsgruppe lediglich 2% betrug, so ließen sich diese Zellen jedoch über einen Zeitraum von 26 Wochen in der Maus kultivieren. Die Tumorprogressionsgeschwindigkeit war jedoch äußerst gering, da ein Tumor erst nach 23 Wochen zu ertasten war. Da viele der Tiere bereits vor diesem Zeitpunkt durch äußere Faktoren verstarben, stellt sich die Frage, ob die Erfolgsrate für die Entstehung von Xenografttumoren mit einem besseren Überleben der Tiere gesteigert werden könnte. Bertotti *et al.* erreichten für die Etablierung von Xenografttumoren aus Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen Anwachsrate von 87% (Bertotti *et al.*, 2011).

Zusammenfassend scheinen für die Kultur rektaler Karzinomzellen eine bestimmte Umgebung oder bestimmte bisher unbekannte Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Für die Zukunft könnte hier die dreidimensionale Zellkultur weiterführende Ergebnisse bringen. So zeigten die entstandenen Kolonien morphologisch große Ähnlichkeit mit den von Sato *et al.* beschriebenen Strukturen, die von intestinalen Stammzellen in der dreidimensionalen Zellkultur gebildet wurden. Die Stammzellen behielten dabei ihren Stammzellcharakter, obwohl keine mesenchymale Stammzellnische vorhanden war (Sato *et al.*, 2009). Weiterführende Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bisher nicht durchgeführt werden.

4.3 Die Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen als weitere Therapieoption beim kolorektalen Karzinom

Ein schwerwiegendes Problem bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms ist die Tatsache, dass bei einem Auftreten einer Resistenz nur wenige weitere Therapieoptionen zur Verfügung stehen. Besonders Patienten mit bereits metastasierten Karzinomen profitieren meist nur geringfügig von den etablierten Therapien und zeigen oft Resistenzen. Die Überlebensprognose für Patienten mit einer Fernmetastase beträgt nur 18 bis 21 Monate (Poston *et al.*, 2008, Cunningham *et al.*, 2010). Da bei ca. 40% aller Patienten im Verlauf der Erkrankung Metastasen entstehen, ist die Etablierung neuer Therapieoptionen dringend erforderlich (Rougier und Mitry 2003). Zytostatika wirken nicht exklusiv gegen Tumorzellen. Die wachstums- und zellteilungsinhibierenden Effekte wirken in jeder proliferierenden Zelle. Aus diesem Grund treten während der Behandlung oft starke Nebenwirkungen auf, die vor allem regenerative Gewebe des Körpers betreffen. Die häufigsten akuten Nebenwirkungen sind Magen- und Darmprobleme, Knochenmarks suppression und Haarausfall (Sauer *et al.*, 2004, Rodel *et al.*, 2012). Es treten jedoch auch Nebenwirkungen mit Langzeitfolgen auf. So

ist für 5-FU bekannt, dass es die Myelinscheiden des zentralen Nervensystems schädigt (Han *et al.*, 2008). Neue Therapieansätze versuchen daher, karzinomspezifische Ziele in die Behandlung mit aufzunehmen. Besonders Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren und die nachfolgenden Signalwege sind dabei Gegenstand der aktuellen Forschung. Der Einfluss von Rezeptortyrosinkinasen auf die Tumorprogression, Tumorangiogenese und Metastasenbildung ist schon seit langer Zeit bekannt (Yarden und Ullrich 1988, Ullrich und Schlessinger 1990). In den letzten Jahren hat das Verständnis über den Einfluss von vielen verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen und ihren Signalwegen in Karzinomen deutlich zugenommen. So ist z.B. die VEGF-Signalachse maßgeblich an der Angiogenese des Tumors beteiligt und hat damit Einfluss auf das Progressionsverhalten des Tumors (Cunningham *et al.*, 2010, Grothey und Allegra 2012). Auch die IGF-IR-Achse die über den PI3K- und MAPK-Signalweg das Zellüberleben und die Proliferation fördert, hat einen Einfluss im kolorektalen Karzinom (Hu *et al.*, 2008). Der IGF-IR wird in mehr als 90% der kolorektalen Adenokarzinome überexprimiert und ist assoziiert mit der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps der Tumorzellen (Hakam *et al.*, 1999, Pollak 2004). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der IGF-IR einen Einfluss bei der Transformation, der Tumorgenese und der Tumovaskularisierung des kolorektalen Karzinoms hat (Reinmuth *et al.*, 2002, Samani *et al.*, 2007, Tao *et al.*, 2007).

Ein weiterer Rezeptor, der über den PI3K- und MAPK-Signalweg einen Einfluss beim kolorektalen Karzinom hat, ist der PDGFR- β . Beim Kolonkarzinom scheint das Expressionslevel des PDGFR- β im Tumorgewebe mit der Angiogenese, Invasion und Metastasenbildung assoziiert zu sein (Song *et al.*, 2005, Kitadai *et al.*, 2006, Mancuso *et al.*, 2006). Besonders einflussreich beim kolorektalen Karzinom ist jedoch die EGFR-Achse. Über den PI3K- und den MAPK-Signalweg fördert die EGFR-Achse das Überleben der Tumorzellen durch antiapoptotische Signale und fördert die Proliferation (Yarden und Sliwkowski 2001, Uberall *et al.*, 2008) (Abbildung 4.1). Neben dem EGFR-familienspezifischen Liganden EGF können auch eine ganze Reihe weiterer Liganden, wie *Transforming Growth Factor α* , Amphiregulin, Epiregulin und Neuregulin 1-4 die EGFR-Achse aktivieren (Yarden 2001) (Abbildung 4.1). Im kolorektalen Karzinom konnten Hyperaktivierungen der Achse durch eine erhöhte Expression der Liganden oder/und des Rezeptors nachgewiesen werden (Yarden und Sliwkowski 2001). Für einige nichtkleinzellige Bronchialkarzinom-, Kopf-Hals-Karzinom- und Glioblastomzellen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte EGFR-Expression eine erhöhte Ligandenexpression nach sich zieht, was zu einer autokrinen Stimulation führt (Uberall *et al.*, 2008). Dass der EGFR in 82% aller Tumore bei Patienten mit kolorektalem Karzinom überexprimiert wird, unterstreicht seine Bedeutung (Spano *et al.*, 2005). Für Mamma-, Bronchial-, Pankreas- und kolorektale Karzinome ist schon länger bekannt, dass die EGFR-Expression mit einem aggressiven

klinischen Verhalten des Tumors korreliert ist. Patienten mit Tumoren, die eine hohe EGFR-Expression aufweisen, haben ein erhöhtes Risiko für Fernmetastasen und eine schlechtere Überlebensprognose (Harris *et al.*, 1989, Hemming *et al.*, 1992, Klijn *et al.*, 1992, Mayer *et al.*, 1993, Yamanaka *et al.*, 1993, Tateishi *et al.*, 1994). Beim Rektumkarzinom konnte eine hohe Expression des EGFR mit einem schlechten Ansprechen auf die Radiotherapie und einer schlechten Überlebensprognose assoziiert werden (Spano *et al.*, 2005, Debucquoy *et al.*, 2010). Die Bestrahlung kann zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des EGFR führen, in deren Folge der EGFR in den Zellkern gelangt und dort proliferationsfördernde Signale aktiviert (Bowers *et al.*, 2001). Außerdem kann es nach Ligandenaktivierung zu einer Translokation des EGFR ins Zytoplasma kommen, wo er die *DNA-Dependent Protein Kinase* rekrutiert und in den Zellkern transportiert. Dies fördert den DNA-Reparaturmechanismus (Bandyopadhyay *et al.*, 1998) (Abbildung 4.1).

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (z.B. Cetuximab und Panitumumab), die sich gegen die Ligandenbindungsstelle des EGFR richten, ist es möglich, den EGFR *in vivo* zu inhibieren. Die Antikörper blockieren dabei die Ligandenbindung und verhindern so eine Aktivierung des EGFR (Berardi *et al.*, 2010). Eine andere Möglichkeit den EGFR-Signalweg zu inhibieren, besteht darin, mittels sogenannter *small molecule*-Inhibitoren (z.B. Erlotinib und Gefitinib) die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR zu blockieren. Aufgrund ihrer geringen Größe sind diese Inhibitoren in der Lage, in die Zelle einzudringen und den Rezeptor zu inaktivieren (Hammerman *et al.*, 2009). Die Auswirkungen der EGFR-Inhibition mit monoklonalen Antikörpern oder *small molecule*-Inhibitoren sind vielfältig und sind *in vitro* und in Xenografttumormodellen für viele verschiedene Tumorentitäten untersucht worden. In verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien (z.B. DiFi, DLD-1, HT-29) führen beide Arten der EGFR-Inhibition *in vitro* und *in vivo* zu einer verminderten Proliferation, einer erhöhten Apoptoserate und einer verringerten Tumorprogression im Xenograftmodell (Wu *et al.*, 1995, Wu *et al.*, 1996, Moyer *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2000, Prewett *et al.*, 2002). Nähere Analysen dieser Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es in der Folge der Inhibition zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus kommt, der durch eine erhöhte Expression des CDK-Inhibitors p27KIP1 und damit resultierender verminderter Aktivität des Komplexes aus Cyclin E und CDK2 vermittelt wird. In der Kolonkarzinomzelllinie DiFi führte die Inhibition des EGFR mit Antikörpern zu einer verminderten Expression des Proteins BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), das eine antiapoptotische Wirkung hat, und zu einer erhöhten Expression des Proteins BAX (*BCL2-associated X protein*), welches die Apoptose fördert. Zusätzlich konnte eine Aktivierung der Caspasen 8, 9 und 3 detektiert werden (Wu *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen konnten auch in primären Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Halses bestätigt werden (Huang *et al.*, 1999). Die antikörperbasierte EGFR-Inhibition an Blasenkarzinom- und Pankreaskarzinomzelllinien

fürte *in vitro* und *in vivo* zu einer verminderten Expression von Angiogenesefaktoren (*Vascular Endothelial Growth Factor* und *Fibroblast Growth Factor*) und Faktoren, die mit der Invasions- und Metastasierungsfähigkeit assoziiert sind (*Matrix-Metalloproteinase 9* und *Interleukin-8*) (Perrotte *et al.*, 1999, Bruns *et al.*, 2000).

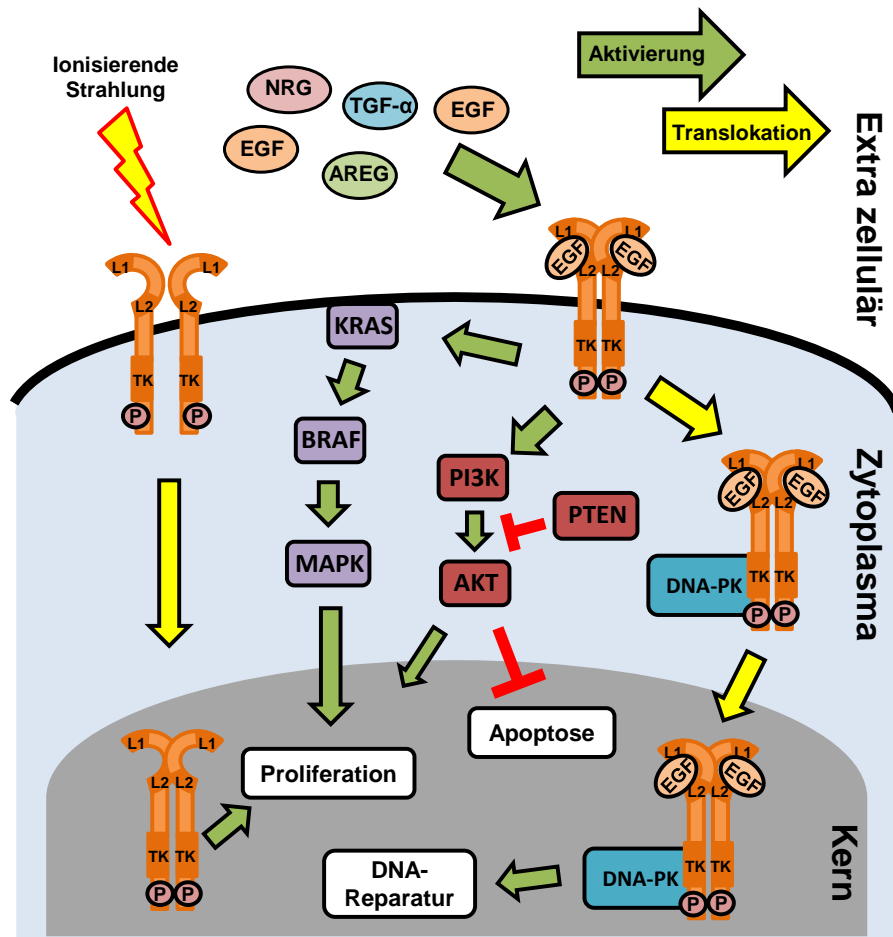


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Einflusses der EGFR-Achse beim kolorektalen Karzinom.

Durch die Bindung eines Liganden (z.B. EGF, TGF- α , Amphiregulin oder Neuregulin) an die Ligandenbindungsstellen (L1/L2) wird der EGFR aktiviert. Über den MAPK- und den PI3K-Signalweg fördert dies Proliferation und Zellüberleben. Nach der Rezeptoraktivierung kann es auch zu einer Translokation des Rezeptors ins Zytoplasma kommen, in deren Folge die *DNA-Dependent Protein Kinase* (DNA-PK) rekrutiert und in den Zellkern transportiert wird. Dies fördert die DNA-Reparatur. Durch ionisierende Strahlung kann es zu einer ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung kommen, in deren Folge der EGFR in den Zellkern gelangt und dort proliferationsfördernd wirkt. TK: Tyrosinkinasedomäne, AREG: Amphiregulin, NRG: Neuregulin. Modifiziert nach (Debuquoy *et al.*, 2010).

4.3.1 Die anti-EGFR-Therapie bei soliden Tumoren

Aufgrund der starken Effekte nach der Inhibition des EGFR in verschiedenen Tumorentitäten *in vivo* wurde analysiert, welchen Nutzen eine EGFR-Inhibition zusätzlich zu bereits

etablierten Behandlungsmethoden haben könnte. Huang *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass in primären Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopfes und des Halses eine Cetuximab-Behandlung zu einer Sensibilisierung der Zellen gegen die Strahlentherapie und zu einer erhöhten Apoptoserate nach Bestrahlung führt (Huang *et al.*, 1999). Desweiteren führte die Behandlung mit einem anti-EGFR-Antikörper zusammen mit dem Zytostatikum Gemcitabin zu einer vollständigen Regression bei Tumoren aus orthotop in immundefiziente Mäuse implantierten Pankreaskarzinomzelllinien. Eine alleinige Gemcitabin-Behandlung zeigte eine durchschnittliche Tumorverkleinerung von 70% (Bruns *et al.*, 2000). Die kombinierte Behandlung von Xenografttumoren aus den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 oder HT-29 mit Cetuximab und dem Topoisomerasehemmer Irinotecan zeigte eine Regressionsrate von 100% für DLD-1- und 60% für HT-29-Tumore. Die Einzelbehandlung zeigte jeweils keinen Effekt (Prewett *et al.*, 2002). Aufgrund der Bedeutung der EGFR-Achse im kolorektalen Karzinom und der starken Effekte der EGFR-Inhibition wurde die Inhibition des EGFR bei der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms bereits in vielen Studien untersucht. Getestet wurde sowohl eine Monotherapie mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Cetuximab und Panitumumab) als auch eine zusätzliche Inhibition des EGFR zu einer anderen etablierten Therapie. Die Ergebnisse einiger Studien sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1 Darstellung und Vergleich zwischen verschiedenen klinischen Studien zur Untersuchung einer Therapieverbesserung beim metastasierten kolorektalen Karzinom durch eine antikörperbasierte Inhibition des EGFR. \emptyset -PFÜ: Durchschnittliches Progressionsfreies Überleben, \emptyset -ÜLZ: Durchschnittliche Überlebenszeit, RCT: Radiochemotherapie

Referenz	Teilnehmer	Behandlungsgruppen	Anzahl der Patienten	Therapieansprechen	\emptyset -PFÜ (Monate)	\emptyset -ÜLZ (Monate)
(Jonker <i>et al.</i> , 2007)	Vorbehandelt mit: Irinotecan, 5-FU, + Oxaliplatin + RCT <i>non-responder</i>	palliative Pflege	285	0	/	4,6
		Cetuximab	287	8%	/	6,1
(Van Cutsem <i>et al.</i> , 2007)	Vorbehandelt mit: Irinotecan, 5-FU, + Oxaliplatin + RCT <i>non-responder</i>	palliative Pflege	232	0	7,3	/
		Panitumumab	231	10%	8	/
(Cunningham <i>et al.</i> , 2004)	Vorbehandelt mit: Irinotecan + RCT <i>non-responder</i>	Cetuximab	111	10,8%	1,5	6,9
		Irinotecan + RCT + Cetuximab	218	22,9%	4,1	8,6
(Sobrero <i>et al.</i> , 2008)	Vorbehandelt mit: 5-FU + Oxaliplatin + RCT <i>non-responder</i>	Irinotecan	650	4,2%	2,6	10
		Irinotecan + Cetuximab	648	16,4%	4	10,7
(Van Cutsem <i>et al.</i> , 2009)	nicht behandelt nicht operabel	Irinotecan	599	38,7%	8	18,6
		Irinotecan + Cetuximab	599	46,9%	8,9	19,9

(Bokemeyer <i>et al.</i> , 2009)	nicht behandelt nicht operabel	5-FU + Oxaliplatin	168	36%	7,2	/
		5-FU + Oxaliplatin + Cetuximab	169	46%	7,2	/

Bei der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms ist die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern zusätzlich zur normalen Radiochemotherapie mittlerweile etabliert (Cunningham *et al.*, 2010). Es zeigt sich jedoch, dass sich lediglich bei 10% bis 15% der Patienten eine verbesserte Therapieantwort erkennen lässt (Cunningham *et al.*, 2004, Chung *et al.*, 2005) (siehe auch Tabelle 4.1). Außerdem ist diese in vielen Fällen nicht mit einer verbesserten Überlebensprognose assoziiert, und die durchschnittliche Überlebenserwartung erhöht sich allgemein durch die anti-EGFR-Therapie nur um ca. zwei Monate (Cunningham *et al.*, 2010) (siehe Tabelle 4.1). Auch bei der anti-EGFR-Therapie stellt sich also die Frage, welche molekularen Unterschiede zwischen *respondern* und *non-respondern* bestehen und ob man Biomarker finden kann, die eine Prognose auf das Therapieansprechen erlauben. Interessanterweise hat das Expressionslevel des EGFR keinen Einfluss auf das Therapieansprechen auf die anti-EGFR-Therapie (Cunningham *et al.*, 2004, Saltz *et al.*, 2004, Chung *et al.*, 2005). Jedoch konnten Khambata-Ford *et al.* zeigen, dass bei einigen *respondern* erhöhte Expressionslevel der EGFR-Liganden Amphiregulin und Epiregulin im Tumor messbar sind. Die erhöhte Expression ist korreliert mit gutem Therapieansprechen und längerem krankheitsfreien Überleben. Die Zeit des durchschnittlich tumorprogressionsfreien Überlebens ist um 80% (Epiregulin) bis 95% (Amphiregulin) höher als bei Patienten mit niedriger Expression der Liganden (Khambata-Ford *et al.*, 2007). Da sich die Bestimmung der Expressionslevel jedoch schwierig gestaltet, sind diese als Biomarker für ein Therapieansprechen nicht zu verwenden (Balko und Black 2009). Zusätzlich konnten im weiteren Verlauf der Signalkaskade einige Kandidaten gefunden werden, die mit dem Therapieansprechen assoziiert sind. Der wichtigste Vertreter ist hierbei das Proto-Onkogen *Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*). Das *KRAS*-Protein ist eine plasmamembranständige GTPase und ein zentrales Mitglied der MAPK-Signaltransduktionskette (Malumbres und Barbacid 2003) (Abbildung 4.1). Etwa 48% der Patienten mit einem Rektumkarzinom und 43% der Patienten mit einem Kolonkarzinom zeigen eine Mutation im *KRAS*-Gen (Lievre *et al.*, 2008, Gaedcke *et al.*, 2010). Durch verschiedene Punktmutationen kann es zu einer Hemmung der GTPase-Aktivität kommen. Dadurch kommt es vermutlich zu einer Aktivierung des nachfolgenden Signalwegs auch ohne die Aktivierung des EGFR (Abbildung 4.2) (Campbell *et al.*, 1998). Experimente *in vitro* und verschiedene klinische Studien konnten zeigen, dass Patienten mit einer aktivierenden Mutation im *KRAS*-Gen weder einen zusätzlichen Therapieeffekt durch die EGFR-Inhibition haben, noch eine bessere Überlebensprognose haben. Bei den Patienten mit einem Wildtyp-

KRAS liegt der zusätzliche Nutzen der EGFR-Inhibition jedoch auch nur bei 15% bis 20% für das Therapieansprechen und einer um zwei bis vier Monate erhöhten durchschnittlichen Überlebensprognose (Benvenuti *et al.*, 2007, Amado *et al.*, 2008, Karapetis *et al.*, 2008, Lievre *et al.*, 2008) (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Darstellung und Vergleich verschiedener klinischer Studien zur Analyse des Einflusses konstitutiv aktivierender Mutationen in *KRAS* bei der antikörperbasierten anti-EGFR-Therapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom. \bar{o} -PFÜ: Durchschnittliches Progressionsfreies Überleben Zeit, \bar{o} -ÜLZ: Durchschnittliche Überlebenszeit, wt: Wildtyp, mut: Mutation

Referenz	Patientenzahlen		Behandlungsgruppen	Therapieansprechen		\bar{o} -PFÜ (Monate)		\bar{o} -ÜLZ (Monate)	
	KRAS wt	KRAS mut		KRAS wt	KRAS mut	KRAS wt	KRAS mut	KRAS wt	KRAS mut
(Karapetis <i>et al.</i> , 2008)	230	164	palliative Pflege	0%	0%	1,9	1,8	4,8	4,6
			Cetuximab	12,8%	1,2%	3,7	1,8	9,5	4,5
(Amado <i>et al.</i> , 2008)	243	184	palliative Pflege	0%	0%	7,3	7,3	7,6	4,4
			Panitumumab	17%	0%	12,3	7,4	8,1	4,9
(Van Cutsem <i>et al.</i> , 2009)	666	397	Irinotecan	39,7%	36,1%	8,4	7,7	20	16,7
			Irinotecan + Cetuximab	59,3%	31,3%	9,9	7,4	23,5	16,2
(Douillard <i>et al.</i> , 2010)	656	440	5-FU + Oxaliplatin	48%	40%	8	8,8	19,7	19,3
			5-FU Oxaliplatin + Panitumumab	55%	40%	9,6	7,3	23,9	15,5

Aufgrund einer hohen Spezifität von 93% können aktivierende *KRAS*-Mutationen als Marker für ein fehlendes Ansprechen auf die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen den EGFR verwendet werden. Die Sensitivität ist mit 47% jedoch sehr gering, da 35% bis 45% der *non-responder* ein mutationsfreies *KRAS*-Gen haben (Linardou *et al.*, 2008). In Europa und den USA wird der Mutationsstatus des *KRAS*-Gens bereits für die Therapieentscheidung verwendet. Die anti-EGFR-Therapie mit monoklonalen Antikörpern wird nur noch bei Patienten angewandt, die keine somatische Mutation im *KRAS*-Gen in den Tumoren aufweisen (Bardelli und Siena 2010). Aufgrund der geringen Sensitivität von *KRAS* als Biomarker werden jedoch weitere Marker benötigt.

Etwa 10% der *non-responder* bei der anti-EGFR-Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms tragen eine aktivierende (somatische) Mutation des *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)* (Lievre *et al.*, 2008, Gaedcke *et al.*, 2010). Das BRAF-Protein

ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die im MAPK-Signalweg direkt *downstream* von KRAS liegt. Es wird direkt von KRAS aktiviert und leitet das Signal weiter (Abbildung 4.1). Ebenso wie für KRAS konnte für BRAF gezeigt werden, dass eine aktivierende Mutation zu einer Resistenz gegen die anti-EGFR-Therapie führt (Di Nicolantonio *et al.*, 2008, Bardelli und Siena 2010) (Abbildung 4.2). Der Einfluss von BRAF muss jedoch noch weiter validiert werden, bevor BRAF als Marker für ein Nichtansprechen auf die anti-EGFR-Therapie eingesetzt werden kann (Bardelli und Siena 2010).

Neben dem MAPK-Signalweg spielt auch der PI3K-Signalweg eine Rolle bei der Resistenz. So konnte gezeigt werden, dass es für PI3K selbst aktivierende Mutationen gibt, die ähnlich wie bei KRAS und BRAF zu einer rezeptorunabhängigen Aktivierung des nachfolgenden Signalwegs führen. Auch der Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) wird ein Einfluss bei der Resistenz gegen die anti-EGFR-Therapie zugeschrieben. Aktiviertes PTEN unterbricht den PI3K-Signalweg und wirkt daher antagonistisch. Deaktivierende Mutationen fördern so den Signalweg (Abbildung 4.2). Sowohl für PI3K wie auch für PTEN konnte der Mutationsstatus mit einer schlechten Prognose für die anti-EGFR-Therapie assoziiert werden (Frattini *et al.*, 2007, Jhaver *et al.*, 2008, Sartore-Bianchi *et al.*, 2009b). Der Einsatz als Biomarker ist jedoch noch umstritten und muss weiter validiert werden. Eine Mutation von *PI3K* und/oder *PTEN* betrifft etwa 15% der *non-responder* (Bardelli und Siena 2010). Die gemeinsame Analyse der Mutationsstadien von *KRAS*, *BRAF*, *PI3K* und *PTEN* könnte in Zukunft etwa 70% der *non-responder* identifizieren (Sartore-Bianchi *et al.*, 2009a). Für die restlichen 30% der *non-responder* ist weiterhin ungeklärt, welche Mechanismen hinter der Resistenz stehen. Die Analyse weiterer *downstream* liegender Signalmoleküle des MAPK- oder PI3K-Signalwegs, wie z.B. ERK1/2 (*Extracellular Signal-Related Kinases 1/2*) oder AKT (Proteinkinase B), zeigte bisher keinen Erfolg (Bardelli und Siena 2010, Cunningham *et al.*, 2010). Weiterhin entwickeln viele Patienten, die zunächst gut auf die anti-EGFR-Therapie ansprechen und eine KRAS/BRAF-Wildtypsequenz aufweisen, innerhalb von 12 bis 18 Monaten eine Resistenz gegen die Therapie, was dadurch angezeigt wird, dass trotz gutem ersten Therapieansprechen die Überlebenszeit durch die Behandlung nicht verlängert wird (Cunningham *et al.*, 2004, Amado *et al.*, 2008, Karapetis *et al.*, 2008, Van Cutsem *et al.*, 2009, Douillard *et al.*, 2010). Diese sogenannte sekundäre Resistenz kann prinzipiell auf zwei Wegen entstehen. Zum einen kann es sein, dass aufgrund der Heterogenität des Tumors nicht alle Zellen gleich gut auf die Therapie ansprechen. Durch die Therapie werden nur die sensitiven Tumorzellen abgetötet und die zurückbleibenden resistenten Tumorzellen sorgen für eine erneute Tumorprogression. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Tumorzellen während der Behandlung molekulargenetische Veränderungen durchlaufen oder Neumutationen entstehen, die für eine Resistenz verantwortlich sind. Einen Mechanismus für die Entstehung einer Resistenz gegen den

monoklonalen Antikörper Cetuximab konnten Montagut *et al.* aufzeigen. Die Arbeitsgruppe konnte in einer rektalen Karzinomzelllinie, die negativ für Mutationen von *KRAS*, *BRAF* und *PI3K* war und längere Zeit mit Cetuximab behandelt wurde, eine Neumutation für EGFR nachweisen. Diese Mutation sorgt für eine Veränderung der Ligandenbindungsstelle, die dazu führt, dass Cetuximab nicht mehr binden kann. Der EGFR bleibt jedoch weiterhin durch EGF aktivierbar. Die Mutation konnte anschließend auch in einigen Patienten mit sekundärer Resistenz gegen die Cetuximab-basierte anti-EGFR-Therapie identifiziert werden (Montagut *et al.*, 2012).

4.3.2 Der Einfluss anderer Rezeptortyrosinkinasen bei der Resistenz gegen die anti-EGFR-Therapie

Verschiedene weitere Rezeptortyrosinkinasen scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von sekundären Resistenzen zu spielen. Für den EGFR ist bekannt, dass er in der Lage ist, mit allen Mitgliedern der EGFR-Familie Heterodimere zu bilden und dass diese auch natürlicher Weise vorkommen und ein komplexes dynamisches Netzwerk bilden (Yarden und Sliwkowski 2001). In verschiedenen Karzinomzelllinien (z.B. Ovarialkarzinom und nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom) führt eine Inhibition des EGFR zu einer erhöhten Expression der Familienmitglieder HER2 und HER3 (Christensen *et al.*, 2001, Wheeler *et al.*, 2008). Außerdem konnten Jain *et al.* zeigen, dass die Inhibition des EGFR mit dem *small molecule*-Inhibitor Gefitinib oder dem monoklonalen Antikörper Cetuximab in Prostatakarzinomzelllinien zu einer Neustrukturierung des EGFR-Familien-Netzwerks führt. Die längerfristige Behandlung der Zellen mit Gefitinib oder Cetuximab führte zu einem Wechsel von einem EGFR-dominierten Netzwerk hin zu einem HER2-dominierten. So traten statt EGFR-HER3-Heterodimeren vermehrt HER2/HER3-Heterodimere auf. Es gibt weiterhin viele Hinweise darauf, dass auch der IGF-IR an der Entwicklung von Resistenzen gegen die anti-EGFR-Therapie beteiligt ist (Jain *et al.*, 2010). Wang *et al.* konnten in Kolonkarzinomzellen zeigen, dass die Aktivierung der IGF-IR-Achse zu einer erhöhten Expression des EGFR-Liganden TGF- α führt und so eine autokrine Stimulationsschleife aktiviert (Wang *et al.*, 2002). In HER2-überexprimierenden Mammakarzinomzellen ist ein hohes Expressionslevel von IGF-IR mit einem verringerten Ansprechen auf eine anti-HER2-Therapie mit monoklonalen Antikörpern assoziiert. Die Inhibition von HER2 führte nur dann zu einer Proliferationsverminderung, wenn auch die IGF-IR-Achse inhibiert wird (Lu *et al.*, 2001). Chakravati *et al.* zeigten, dass primäre Glioblastomzellen, die *in vivo* eine *de novo*-Resistenz gegen eine anti-EGFR-Therapie entwickelt hatten, eine deutlich erhöhte Expression und Aktivierung des IGF-IR im Vergleich zu einer sensitiven primären Zelllinie mit einer äquivalenten Expression des EGFR. Die Behandlung der sensitiven Zelllinie mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 induzierte Apoptose und führte zu einer

Strahlensensibilisierung und zu einem reduzierten Invasionspotential. In der resistenten Zelllinie war dies nicht der Fall. Weitere Analysen zeigten, dass die Resistenz durch eine verstärkte Aktivierung des PI3K-Signalwegs und damit verbundenen antiapoptotischen und invasionsfördernden Signalen vermittelt wird. Die kombinierte Inhibition des IGF-IR und des EGFR führte in der resistenten Zelllinie zu Apoptose, Strahlensensibilisierung und vermindertem Invasionspotential (Chakravarti *et al.*, 2002). Auch in Prostata- und Mammakarzinomzellen war eine neugewonnene Resistenz gegen die EGFR-Inhibition mit einer erhöhten Aktivität der IGF-IR-Achse assoziiert. Zellen die über einen Zeitraum von drei bis neun Monaten mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib behandelt worden waren, wurden resistent gegen die Behandlung. Verglichen mit den parentalen Zellen zeigten die resistenten eine erhöhte Aktivierung des IGF-IR und der Proteinkinase AKT (PI3K-Signalweg) und reagierten sensitiver auf eine IGF-IR-Inhibition als diese (Jones *et al.*, 2004).

Viele Studien konnten belegen, dass die IGF-IR- und die EGFR-Achse eng miteinander vernetzt sind. So kommt es in murinen Fibroblasten zu einer intrazellulären Transaktivierung des IGF-IR durch den EGFR. Fibroblasten mit einer normalen IGF-IR-Expression und einer Überexpression des EGFR waren in der Lage, in Medium zu proliferieren, das nur EGF und kein IGF-I/II enthielt. Eine Fibroblastenzelllinie ohne IGF-IR-Expression proliferierte unter diesen Bedingungen nicht. Nachdem der IGF-IR stabil in diese Zellen transfiziert worden war, proliferierten auch diese Zellen unter den beschriebenen Bedingungen. Auch die stabile Transfektion von IGF-I-Rezeptoren mit *loss of function* Mutationen, die nicht mehr durch IGF-I/II-Stimulation aktivierbar waren hatte den gleichen Effekt (Burgaud und Baserga 1996). In primären Mammakarzinomzellen führte die Inhibition des EGFR mit einem *small molecule*-Inhibitor dazu, dass der MAPK-Signalweg durch die Stimulation des IGF-IR nicht mehr aktiviert werden konnte (Ahmad *et al.*, 2004). Dies konnte von unserer Arbeitsgruppe und von Hu *et al.* auch für verschiedene kolorektale Karzinomzelllinien gezeigt werden (Hu *et al.*, 2008, Kaufuss *et al.*, 2009).

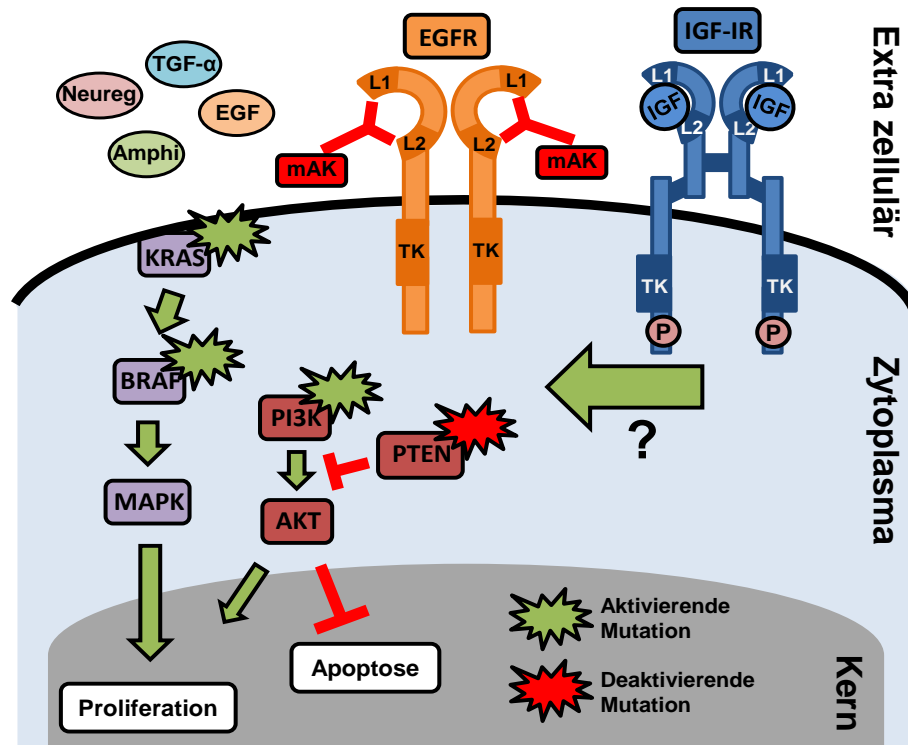


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der Resistenzmechanismen gegen die anti-EGFR-Therapie.

Die Blockade der Ligandenbindungsstelle mit monoklonalen Antikörpern (mAK) verhindert die Aktivierung des EGFR durch seine Liganden. Durch aktivierende Mutationen in *KRAS*, *BRAF* oder *PI3K* bzw. einer deaktivierenden in *PTEN* kommt es trotz inaktivem EGFR zu einer Aktivierung des MAPK- oder PI3K-Signalwegs. Ein weiterer Resistenzmechanismus könnte durch den IGF-IR vermittelt werden. L1/L2: Ligandenbindungsstellen. modifiziert nach (Bardelli und Siena 2010)

Diese Ergebnisse haben uns veranlasst, die Hypothese aufzustellen, dass im kolorektalen Karzinom der *cross-talk* zwischen dem EGFR und dem IGF-IR ein möglicher Resistenzmechanismus für die 5-FU-basierte Radiochemotherapie und die anti-EGFR-Therapie darstellen könnte (Abbildung 4.2).

4.3.2.1 Inhibition des EGFR und IGF-IR bei der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen *in vitro*

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Inhibition der Expression bzw. der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR und des IGF-IR in kolorektalen Tumorzelllinien zu einer verminderten Proliferationsrate und einer gesteigerten Todesrate der Zellen führt. Diese Effekte waren bei gleichzeitiger Inhibition des EGFR und des IGF-IR deutlich stärker ausgeprägt (Kaulfuss *et al.*, 2009). Um diese Hypothese zu untermauern und auch zu analysieren, ob die kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR einen Therapienutzen hat, sollte der Einfluss der Inhibition der Rezeptoren auf die Radiochemotherapie *in vitro* an primären rektalen *responder*- und *non-responder*-Zellen untersucht werden. Da die Generierung dieser Zelllinien nicht erfolgreich verlief, sollten die Analysen mit etablierten

kolorektalen Karzinomzelllinien durchgeführt werden. Es wurden die drei Zelllinien SW837, DLD-1 und Caco-2 verwendet. Die Zelllinie SW837 ist eine rektale Karzinomzelllinie mit einer aktivierenden Mutation im *KRAS*-Gen. Die Zelllinie wurde sowohl für die kombinierte Radiochemotherapie als auch für das 5-FU-Ansprechen als *non-responder* klassifiziert (Mariadason *et al.*, 2003, Spitzner *et al.*, 2010) (Tabelle 4.1). Aufgrund der *KRAS*-Mutation ist zu vermuten, dass eine anti-EGFR-Therapie keinen zusätzlichen Therapienutzen aufweist (Cunningham *et al.*, 2010). Die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 hat neben einer aktivierenden Mutation im *KRAS*-Gen auch eine aktivierende Mutation im *PI3KCA*-Gen. Die DLD-1-Zellen zeigen im Vergleich die stärkste Resistenz gegen 5-FU (Mariadason *et al.*, 2003) (Tabelle 4.3). Aufgrund des Mutationsstatus ist für diese Zelllinie kein größerer Erfolg durch die anti-EGFR-Therapie zu erwarten (Cunningham *et al.*, 2010). Für die Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 sind keine Mutationen bekannt, die im Zusammenhang mit einer Resistenz gegen die anti-EGFR-Therapie stehen. Die Zelllinie wurde sowohl für die kombinierte Radiochemotherapie als auch für das 5-FU-Ansprechen als *responder* klassifiziert (Mariadason *et al.*, 2003, Spitzner *et al.*, 2010). In der Expression des EGFR unterscheiden sich die drei Zelllinien nur wenig. Die Expression des IGF-IR ist in Caco-2- und DLD-1-Zellen ähnlich, in SW837-Zellen jedoch deutlich höher. Die beschriebenen Parameter sowie der Einfluss der Rezeptorinhibition sind in Tabelle 4.3 für die drei Zelllinien dargestellt.

Die Ergebnisse untermauern unsere Hypothese. Bei den als *non-responder* klassifizierten DLD-1-Zellen zeigten weder die Inhibition des EGFR- noch die des IGF-IR alleine einen zusätzlichen Therapieeffekt. Die kombinierte Inhibition führte jedoch zu einem deutlich verbesserten Therapieansprechen. Auch die *non-responder*-Zelllinie SW837 zeigte für die kombinierte Rezeptorinhibition einen deutlich verbesserten Therapieeffekt. Jedoch bewirkte in dieser Zelllinie auch die jeweils einzelne Inhibition ein verbessertes Therapieansprechen. In den als *responder* klassifizierten Caco-2-Zellen führte abhängig von der Expressionsstärke der Rezeptoren schon die jeweils einzelne Inhibition zu einem starken Effekt. Die kombinierte Inhibition steigert diesen jedoch noch deutlich. So war der Effekt auch ohne Bestrahlung wesentlich größer als der von IGF-IR-Inhibition und Bestrahlung mit 8Gy. Wie bereits diskutiert, konnte sowohl für den EGFR als auch für den IGF-IR in Einzelstudien bisher gezeigt werden, dass die Inhibition nicht nur zu einer Proliferationsminderung oder erhöhten Apoptose führen kann, sondern auch zu einer erhöhten Strahlensensibilisierung der Zellen (Dutta und Maity 2007, Valenciano *et al.*, 2012). Wie bereits erwähnt, führt die EGFR-Inhibition auch zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Zellen in der G1-Phase sind deutlich strahlensensitiver als Zellen in der S-Phase (Dutta und Maity 2007). Für den IGF-IR wird angedacht, dass die Strahlensensibilisierung von kolorektalen Karzinomzellen nach der IGF-IR-Inhibition vor allem durch den Wegfall der starken antiapoptotischen Signale verursacht wird (Valenciano *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde

jedoch lediglich für die SW837-Zellen eine Sensibilisierung gegen die Radiochemotherapie detektiert. Die Ursache für den zum Teil großen Therapienutzen, der EGFR-/ IGF-IR-Inhibition muss also größtenteils durch direkte Auswirkungen auf Proliferationsverhalten und Apoptose liegen. Die Mechanismen der zusätzlichen Therapieeffekte werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die Vorarbeiten zeigen, dass die Inhibition des EGFR und des IGF-IR *in vitro* in SW837- und Caco-2-Zellen zu einer Caspase 3/7-vermittelten Apoptose führt. Außerdem konnte eine Inhibition sowohl des MAPK- als auch des PI3K-Signalwegs detektiert werden.

Unsere *in vitro* Ergebnisse der Radiochemotherapie mit zusätzlicher Inhibition des EGFR und IGF-IR und besonders die großen Therapieeffekte bei den *non-responder*-Zellen bestätigen die Möglichkeit, dass der *crosstalk* zwischen dem EGFR und dem IGF-IR auch ein Resistenzmechanismus bei kolorektalen Karzinomzellen darstellen könnte. Dies wird bestätigt durch die bereits diskutierten Analysen in primären Glioblastomzellen, Prostata- und Mammakarzinomzellen (Chakravarti *et al.*, 2002, Jones *et al.*, 2004). Auch Cunningham *et al.* konnten *in vitro* für 12 verschiedene kolorektale Karzinomzelllinien zeigen, dass die kombinierte Inhibition des EGFR (mit einem monoklonalen Antikörper) und des IGF-IR (mit NVP-AEW541) zu einer deutlich stärkeren Verminderung der Proliferation führt als die Inhibition der einzelnen Rezeptoren. Der Effekt der kombinierten Inhibition war unabhängig von der Expressionsstärke der einzelnen Rezeptoren. Lediglich für die Einzelinhibition des EGFR konnte eine Abhängigkeit zur EGFR-Expression detektiert werden (Cunningham *et al.*, 2008). Dong *et al.* inhibierten den EGFR und den IGF-IR mit Hilfe eines Antikörpers, der sowohl den EGFR als auch den IGF-IR in Mamma-, nichtkleinzelligen Bronchial-, Pankreas- und Kolonkarzinomzellen *in vitro* blockiert. Die Behandlung führte zu einer verminderten Aktivierung von AKT (PI3K-Signalweg) und ERK1/2 (MAPK-Signalweg) und einer stark verminderten Proliferationsrate. Auch hier war der Effekt deutlich stärker als bei einer Inhibition der einzelnen Rezeptoren (Dong *et al.*, 2011). Desweiteren konnte auch für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom gezeigt werden, dass eine Interaktion des EGFR mit dem IGF-IR der tumorinhibierenden Funktion von Erlotinib entgegen wirkt (Morgillo *et al.*, 2006). Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse und die Literatur, dass die kombinierte Inhibition von EGFR und IGF-IR zu einem verbesserten Therapieansprechen bei der kolorektalen Karzinomen führen kann.

Um den Therapieeffekt der Inhibition des EGFR und IGF-IR bei der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen weiter zu validieren und um die Therapieverbesserung besonders für *non-responder*-Zelllinien zu bestätigen, sollten die Versuche mit weiteren Zelllinien wiederholt werden. Zusätzlich sollten die Mechanismen der erhöhten Todesrate näher untersucht werden.

Tabelle 4.3 Darstellung der Zelleigenschaften und der Ergebnisse der Radiochemotherapie bei zusätzlicher Inhibition des EGFR und des IGF-IR in den Zelllinien DLD-1, SW837 und Caco-2.

KRAS+: aktivierende KRAS-Mutation, PI3K+: aktivierende PI3K-Mutation, WT: Wildtyp für KRAS und PI3K

	DLD-1	SW837	Caco-2
IGF-IR-Expression (relativ zu CaCo-2)	0,7	12,8	1
EGFR-Expression (relativ zu CaCo-2)	0,9	1,4	1
Mutationsstatus	KRAS+/ PI3K+	KRAS+	WT
Zellüberleben nach 5-FU-Radiochemotherapie (Spitzner et al., 2010) relativ zum höchsten Wert	nicht bestimmt	1	0,78
Apoptoserate nach 50µM 5-FU-Behandlung (Mariadason et al., 2003) relativ zum höchsten Wert	0,51	0,7	1
Bewertung der Zelllinie	<i>non-responder</i>	<i>non-responder</i>	<i>responder</i>
Therapieeffekt der EGFR-Inhibition	kein Effekt	mäßig erhöhte Todesrate	stark erhöhte Todesrate
Therapieeffekt der IGF-IR-Inhibition	kein Effekt	mäßig erhöhte Todesrate	mäßig erhöhte Todesrate
Therapieeffekt der kombinierten Inhibition	erhöhte Todesrate	stark erhöhte Todesrate	sehr stark erhöhte Todesrate

4.3.2.2 Inhibition des EGFR und des IGF-IR bei der Radiochemotherapie von kolorektalen Karzinomzellen *in vivo*

Um die Ergebnisse der *in vitro*-Behandlung auch *in vivo* zu bestätigen, wurden Xenografttumore der Zelllinien DLD-1 (KRAS- und PI3K-Mutation) und SW837 (KRAS-Mutation) mit der 5-FU-basierten Radiochemotherapie und zusätzlicher Rezeptorinhibition behandelt. Die Ergebnisse für die *non-responder* DLD-1-Zellen zeigten genau wie *in vitro* keinen zusätzlichen Effekt der einzelnen Inhibition des EGFR oder des IGF-IR. Die Inhibition des EGFR zeigte im späteren Verlauf sogar einen negativen Effekt auf das Therapieansprechen. Für die kombinierte Inhibition war im Gegensatz zu den *in vitro*-Ergebnissen keine Verbesserung des Therapieansprechens zu erkennen. Für eine gesicherte Aussage sind die behandelten Tiergruppen jedoch noch zu klein.

Ein Vorversuch mit 5 Tieren für die *non-responder* Zelllinie SW837 bestätigte die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente. Hier führte die kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR zu einer deutlichen Verbesserung des Therapieansprechens. Zu Beginn des ersten Behandlungszyklus war eine Abnahme des durchschnittlichen Tumorumfangs erkennbar.

Im weiteren Verlauf dieses Zyklus konnte keine Tumorprogression detektiert werden. Ein Anstieg des Tumolvolumens erfolgt erst in der Behandlungspause. Im zweiten Behandlungszyklus stagnierte die Tumorprogression wieder. Die Validierung dieser Ergebnisse mit weiteren Versuchsreihen und größerer Tierzahlen ist hier dringend notwendig. Die Ergebnisse der DLD-1-Xenograftumore widersprechen nicht nur den *in vitro*-Ergebnissen, sondern auch der Literatur. So konnten Dong *et al.* die unter (4.3.2.1) vorgestellten *in vitro*-Ergebnisse auch in einem kolorektalen Xenograftmodell für die Kolonkarzinomzelllinie GEO (KRAS-Mutation) validieren und zeigen, dass die kombinierte EGFR/IGF-IR-Inhibition zu einer über AKT (PI3K-Signalweg) und ERK (MAPK-Signalweg) vermittelten starken Abnahme der Tumorprogression führt (Dong *et al.*, 2011). Auch Tonra *et al.* konnten für Xenograftumore der beiden Kolonkarzinomzelllinien HCT-8 (KRAS- und PI3K-Mutation) und HT-29 (BRAF-Mutation) nachweisen, dass die kombinierte EGFR/IGF-IR-Inhibition zu einer deutlich verringerten Tumorprogression führt (Tonra *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse und das gute Ansprechen der SW837-Xenograftumore zeigen, dass das Nichtansprechen der DLD-1-Tumore wahrscheinlich nicht mit dem Mutationsstatus von KRAS einhergeht. Auch in einem Xenograftmodell für eine Kopf-Hals-Karzinomzelllinie bewirkte die kombinierte Inhibition beider Rezeptoren einen deutlich stärkeren Rückgang der Tumorprogression als die alleinige Inhibition. Eine zusätzliche Bestrahlung mit zweimal täglich 2Gy führte sogar zu einer Tumorregression. Die alleinige Bestrahlung zeigte in etwa den tumorprogressionsvermindernden Effekt wie die Einzelinhibition der Rezeptoren (Matsumoto *et al.*, 2012). Dies passt gut zu unseren Ergebnissen der SW837-Xenograftumore. Auch hier konnte für die Länge der Behandlungsdauer eine Stagnation des Tumorwachstums detektiert werden. Auch für die *in vivo*-Experimente konnten bisher keine Analysen der Mechanismen des Therapieeffekts durchgeführt werden. Die beim Versuchsende präparierten Tumore sollten hinsichtlich der Aktivität des EGFR und des IGF-IR sowie der nachfolgenden Signalwege näher analysiert werden. Auch die Überprüfung auf vermehrt aktivierte Apoptosemarker erscheint sinnvoll.

Zusammenfassend zeigen die *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse, dass die kombinierte Inhibition von EGFR und IGF-IR das Therapieansprechen in *non-responder*-Zellen deutlich verbessern kann und eine zusätzliche kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR zur 5-FU-basierten-Radiochemotherapie in der Klinik durchaus Sinn machen könnte. In einer ersten klinischen Phase II-Studie wurde der zusätzliche Nutzen der antikörperbasierten IGF-IR-Inhibition zur Erlotinib-basierten EGFR-Inhibition für Patienten mit einem fortgeschrittenem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom bereits untersucht. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem erhöhten Level an IGF-I zu 46% drei Monate tumorprogressionsfreies Überleben zeigten, im Gegensatz zu Patienten mit niedrigem IGF-I-Level, die nur zu 18% drei Monate tumorprogressionsfreies Überleben zeigten. Patienten mit

einer *KRAS*-Mutation konnten deutlich von der zusätzlichen IGF-IR-Inhibition profitieren. Durch die Behandlung mit Erlotinib und einem Placebo erreichte keiner der Patienten drei Monate tumorprogressionsfreies Überleben. Die Behandlung von Erlotinib und dem anti-IGF-IR-Antikörper sorgte dafür, dass 37% der Patienten mit aktivierender *KRAS*-Mutation ein dreimonatiges tumorprogressionsfreies Überleben hatten (Ramalingam *et al.*, 2011).

Weitergehend zeigen die Ergebnisse, dass die gleichzeitige Inhibition mehrerer Rezeptortyrosinkinasen eine vielversprechende Therapieoption für die Zukunft sein könnte.

4.3.3 Aufklärung des *Crosstalk*-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR

Das Vorhandensein einer Interaktion, eines sogenannten *Crosstalks*, zwischen dem EGFR und dem IGF-IR ist in dieser Arbeit auch für das kolorektale Karzinom mehrfach diskutiert worden (Burgaud und Baserga 1996, Roudabush *et al.*, 2000, Ahmad *et al.*, 2004, Hu *et al.*, 2008, Kaufuss *et al.*, 2009). Auch die Tatsache, dass der IGF-IR anscheinend bei der Resistenz gegen die Anti-EGFR-Therapie beteiligt ist, bestätigt diese Annahme (siehe oben). Die Ausbildung von Heterodimeren zwischen EGFR und IGF-IR könnte einen möglichen Mechanismus für diesen *Crosstalk* darstellen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher den *Crosstalk*-Mechanismus weiter aufzuklären und mögliche EGFR/IGF-IR-Heterodimere nachzuweisen.

In vitro konnten wir für die Kolonkarzinomzelllinien SW480 und DLD-1 mittels der Co-Immunitätspräzipitation eindeutig zeigen, dass es in diesen Zellen zu einer Heterodimerisierung des EGFR mit dem IGF-IR kommt. Der Nachweis gelang in beiden Zelllinien mit Hilfe der endogenen Rezeptoren. Auch konnte der Nachweis sowohl über die Präzipitation des EGFR als auch des IGF-IR erbracht werden. Mit Hilfe eines *Proximity Ligation Assays (PLA)* wurde dieses Ergebnis anschließend in beiden Zelllinien validiert.

Da der PLA eine quantitative Aussage über die Menge an Heterodimeren pro Zelle zulässt, konnten wir in DLD-1- und SW480-Zellen zeigen, dass eine gemeinsame Stimulation mit EGF und IGF zu einem Anstieg in der Anzahl der Heterodimere führt. Weitere Studien an SW480-Zellen zeigten, dass für diese induzierte Steigerung beide Liganden (EGF und IGF-I) vorhanden sein müssen. Dies widerspricht den Ergebnissen von Barnes *et al.*. Die Arbeitsgruppe konnte für Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-und-Hals-Karzinoms zeigen, dass auch die Stimulation mit nur einem der Liganden die Heterodimerbildung induzieren kann. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit EGF nur zur Aktivierung des EGFR führt, durch die Stimulation mit IGF-I jedoch beide Rezeptoren aktiviert werden (Barnes *et al.*, 2007). Die Analyse der Heterodimerisierung auf

Rezeptoraktivierung und nachfolgende Signalwege konnte in dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden. Jedoch konnten wir zeigen, dass die Blockade der Ligandenbindungsstellen des EGFR oder des IGF-IR mit monoklonalen Antikörpern dazu führt, dass die Heterodimerisierung nicht mehr stimuliert werden kann. Dies passt zu unseren Ergebnissen, dass für eine verstärkte Dimerinduktion beide Liganden vorhanden sein müssen. Desweiteren konnten wir zeigen, dass auch die Inhibierung der Tyrosinkinaseaktivität mittels der *small molecule*-Inhibitoren Erlotinib (EGFR) und AEW-541 (IGF-IR) die Stimulation verhindert. Nach unseren Erkenntnissen müssen also sowohl der EGFR als auch der IGF-IR funktionsfähig sein.

Weder Serumentzug noch die Inhibition der Rezeptoren führten jedoch zum Verlust der Heterodimere. Da die einzelnen Experimente unabhängig voneinander durchgeführt wurden, lässt sich bisher keine Aussage darüber treffen, ob die Inhibition eines der Rezeptoren *per se* ohne Stimulation schon zu einer erhöhten Anzahl an Heterodimeren führt. Dies könnte bedeuten, dass die Bildung der Heterodimere einen Resistenzmechanismus darstellt. Dass das Auftreten von Heterodimeren einen Einfluss auf die Resistenzbildung hat, ist sowohl für den EGFR wie auch für den IGF-IR vielfach beschrieben. So ist für den EGFR bekannt, dass er normalerweise mit allen seinen Familienmitgliedern Heterodimere bildet (Yarden und Sliwkowski 2001). In verschiedenen Karzinomzelllinien (z.B. Ovarialkarzinom, Prostatakarzinom und nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom) spielt dieses Netzwerk der EGFR-Familie eine Rolle bei der Resistenz gegen die EGFR-Inhibition. So traten nach der Inhibition des EGFR statt EGFR-HER3-Heterodimeren vermehrt HER2/HER3-Heterodimere auf (Christensen *et al.*, 2001, Wheeler *et al.*, 2008, Jain *et al.*, 2010). Der IGF-IR bildet Heterodimere mit beiden Isoformen des Insulinrezeptors (Pollak 2004). Aber auch Heterodimere zwischen dem IGF-IR und dem EGFR-Familien-Mitglied HER2 sind bekannt. In Mammakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass IGF-IR/HER2-Heterodimere für die Resistenz gegen den HER2-Inhibitor Trastuzumab verantwortlich sind. Die Stimulation mit IGF-I führte in resistenten Zellen zu einer Aktivierung von HER2, und eine proliferationsvermindernde Wirkung der HER2-Inhibition war nur in Abwesenheit von IGF-I/II oder nach der Inhibition des IGF-IR zu erreichen (Lu *et al.*, 2001, Nahta *et al.*, 2005, Nahta *et al.*, 2006). In Mammakarzinomzelllinien und Gewebeproben von Mammakarzinomen konnten mittels Co-Immunpräzipitation auch EGFR/IGF-IR-Heterodimere nachgewiesen werden. Eine Herunterregulation des EGFR führt in den Zelllinien zu einer vermehrten Degradation des IGF-IR. Dies zeigt, dass die Heterodimerisierung den IGF-IR stabilisiert (Riedemann *et al.*, 2007). Auch in Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-und-Hals-Karzinoms konnte eine EGFR/IGF-IR-Heterodimerisierung nachgewiesen werden (Barnes *et al.*, 2007). Beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom sorgt die Heterodimerisierung des EGFR mit dem IGF-IR für eine Resistenz gegen den EGFR-Inhibitor Erlotinib. Durch die Behandlung der Zellen

mit Erlotinib stieg die Anzahl der Heterodimere in der Zellmembran. Dies bewirkte in den Zellen eine erhöhte Aktivität des PI3K- und des MAPK-Signalwegs (Morgillo *et al.*, 2006). Die Arbeitsgruppe konnte weiter eine durch *mammalian target of rapamycin* (mTOR, ein Ziel des PI3K-Signalwegmitglieds AKT) vermittelte *de novo* Expression von EGFR und Survivin (auch BIRC5 – *baculoviral IAP repeat containing 5*) nachweisen. Survivin ist ein antiapoptotisches Protein, welches in vielen Karzinomen überexprimiert wird und die Caspase3 inhibiert (Li *et al.*, 1998, Reed und Reed 1999). Eine zusätzliche Inhibition des IGF-IR führte bei Morgillo *et al. in vitro* und im Xenograftmodell zu einer Aufhebung dieser Effekte und einer deutlichen Verminderung der Tumorprogression (Morgillo *et al.*, 2006). Dies zeigt, wie wichtig die Analyse der Anzahl von Heterodimeren pro Zelle und der nachfolgenden Signalwege nach Rezeptorinhibition auch in unseren Experimente ist. Beides konnte in dieser Arbeit noch nicht durchgeführt werden. Ein weiteres wichtiges Ziel wäre es, zu untersuchen, ob die Fähigkeit zur EGFR/IGF-IR-Dimerisierung einen Einfluss auf das Therapieansprechen der Zelllinien auf die Radiochemotherapie hat (siehe 4.3.2.1).

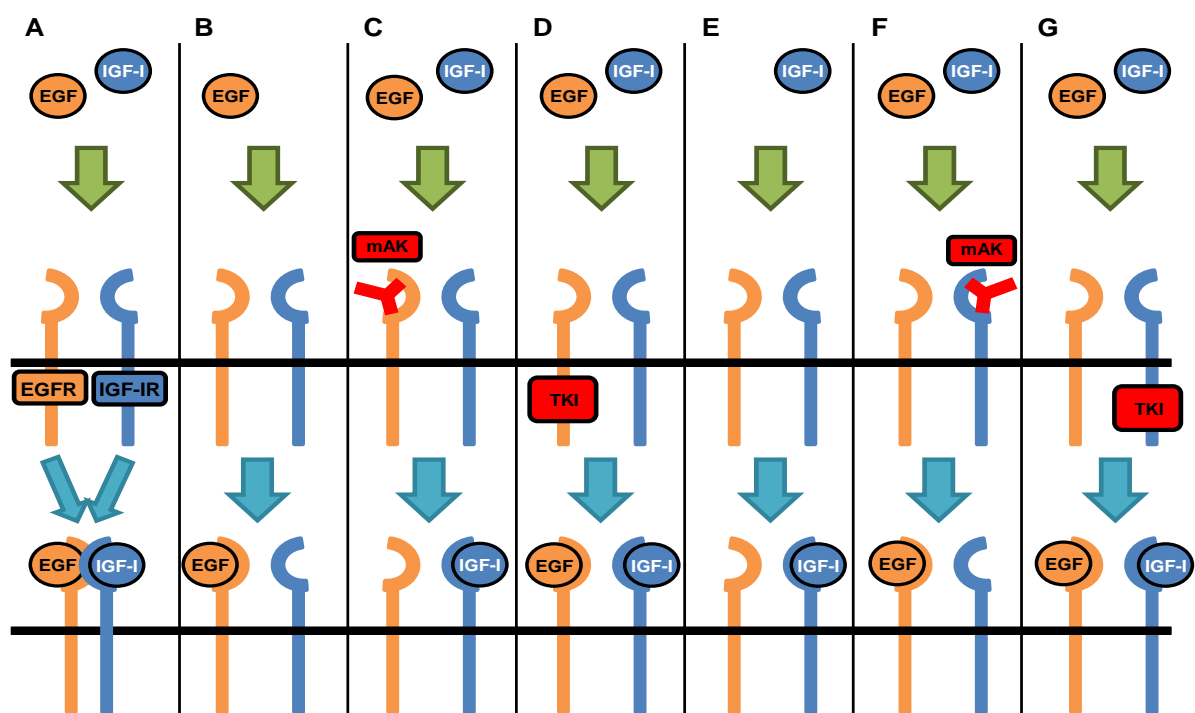


Abbildung 4.3 Schematische Darstellung des Einflusses der Rezeptorinhibition auf die Induzierbarkeit von EGFR/IGF-IR-Heterodimeren in SW480-Zellen.

In SW480-Zellen führt die Stimulation der Zellen mit EGF und IGF-I zu einem vermehrten Auftreten von EGFR/IGF-IR-Heterodimeren (A). Durch die jeweils einzelne Stimulation mit EGF (B) oder IGF (E) ließen sich die Heterodimere nicht induzieren. Die Inhibition der Rezeptoren mit monoklonalen Antikörpern gegen den EGFR (C) oder den IGF-IR (F) bzw. Tyrosinkinaseinhibitoren gegen den EGFR (D) oder den IGF-IR (G) zeigten, dass beide Rezeptoren funktionsfähig sein müssen. mAK: monoklonaler Antikörper, TKI: Tyrosinkinaseinhibitor

Mit Hilfe des PLA konnten wir die EGFR/IGF-IR-Heterodimere auch *in situ* in neun humanen Rektumkarzinomen nachweisen. Eine genaue Quantifizierung der Heterodimere im Tumor- oder Nichttumorgewebe konnte innerhalb dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Ein grober Vergleich der verschiedenen Tumorproben zeigte jedoch, dass die Anzahl der Heterodimere pro Tumorzelle in den verschiedenen Tumoren unterschiedlich ist. Auch gibt es in einigen der Proben einen deutlichen Unterschied bei der Heterodimeranzahl pro Zelle zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Zellen. Da diese Beobachtungen noch nicht quantifiziert sind, konnten bisher keine weiteren Analysen durchgeführt werden. Cunningham *et al.* konnten immunhistochemisch zeigen, dass der IGF-IR, der EGFR und HER2 bei 75% der Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom ko-exprimiert im Tumorgewebe vorliegen. Eine Korrelation von Expressionsstärke der Rezeptoren oder der Ko-Expression konnte jedoch weder mit klinischen Parametern (z.B. Tumorregression, Nodalstatus usw.) noch mit dem Langzeitüberleben hergestellt werden (Cunningham *et al.*, 2006). Die Quantifizierung des Auftretens der EGFR/IGF-IR-Heterodimere für Tumor- und Mesenchymzellen könnte hier neue Ergebnisse bringen. Diese Daten könnten mit dem Therapieansprechen auf die 5-FU-basierte Radiochemotherapie oder die anti-EGFR-Therapie der Patienten in Verbindung gesetzt werden, um zu überprüfen, ob es eine Korrelation zwischen Heterodimeren und Therapieansprechen gibt. Auch eine mögliche Korrelation mit Tumorstadium oder Nodal- und Metastasenstatus sollte überprüft werden. Die bereits diskutierten Ergebnisse von Morgillo *et al.* zeigen, dass die Fähigkeit einer Zelle zur EGFR/IGF-IR-Dimerbildung durchaus Einfluss auf das Therapieansprechen oder die Resistenzentwicklung haben kann (Morgillo *et al.*, 2006). Sollten sich diese Überlegungen bestätigen, könnte langfristig die Quantifizierung der Heterodimere als prognostisches Mittel eingesetzt werden, um z.B. das Therapieansprechen vorherzusagen.

Zusammenfassend zeigen auch die hier diskutierten Ergebnisse, dass

- 1) der IGF-IR zur Resistenzbildung beitragen kann
- 2) die kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR eine gute Therapieoption darstellt
- 3) die kombinierte Inhibition mehrerer Rezeptoren eine weitere Therapieverbesserung sein könnte

4.4 Der Einfluss des PDGFR- β in kolorektalen Karzinomzellen

Wir konnten zeigen, dass die gleichzeitige Inhibition des EGFR und des IGF-IR nicht nur das Therapieansprechen von *non-responder*-Zellen erhöht, sondern allgemein zu einem deutlich verbesserten Therapieeffekt führen kann. Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur erschien uns der PDGFR- β als ein weiteres attraktives Ziel für die therapeutische Rezeptorinhibition.

Wie der EGFR und der IGF-IR ist der PDGFR- β ein Transmembranrezeptor mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität, der über den PI3K- und den MAPK-Signalweg Einfluss auf Proliferation und Zellüberleben nimmt. Neben der β -Form des Rezeptors existiert auch noch eine α -Form. Beide Formen bilden neben Homodimeren auch Heterodimere miteinander. Die vier verschiedenen Liganden PDGF-A/B/C/D kommen nur als Dimere vor. Die Homodimere PDGF-BB/DD und das Heterodimer PDGF-AB sind in der Lage, den PDGFR- β zu aktivieren (Heldin und Westermark 1999, Nishioka *et al.*, 2008, Shim *et al.*, 2010). Bei der Angiogenese spielt die PDGFR- β -Achse eine wichtige Rolle. Diese kann durch PDGF-BB in normalem Gewebe stimuliert werden. Besonders bei der Etablierung der Perizytenummantelung der Endothelzellen ist die PDGFR-Achse wichtig (Jain 2003, McCarty *et al.*, 2007). Für viele verschiedene Tumorentitäten konnte ein Einfluss des PDGFR- β nachgewiesen werden. So wird der PDGFR- β zum Teil in Glioblastomen und Prostatakarzinomen überexprimiert (George 2003). Auch eine Expression des Rezeptors und seiner Liganden in kolorektalen Karzinomen konnte nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2005, Yokoi *et al.*, 2005). Dabei scheint das Expressionslevel im Tumorgewebe mit der Angiogenese, der Invasion und der Metastasierung assoziiert zu sein (Song *et al.*, 2005, Kitadai *et al.*, 2006, Mancuso *et al.*, 2006). In 33 fortgeschrittenen rektalen Karzinomen konnten Erben *et al.* eine Überexpression des PDGFR- β im Vergleich zum normalen Mukosagewebe nachweisen. Die Expression des PDGFR- β korrelierte dabei mit der Therapieantwort auf die Cetuximab-basierte Anti-EGFR-Therapie (Erben *et al.*, 2008). Die Arbeitsgruppe konnte für die Tumore zeigen, dass sich das Expressionslevel des PDGFR- β durch die Radiochemotherapie mit Irinotecan und Cetuximab erhöhte. Der PDGFR- β wird beim Kolonkarzinom vor allem in tumorassoziierten endothelialen Zellen wie Perizyten und anderen Stromazellen exprimiert. Hierbei scheint die Expression des PDGFR- β wichtig für die Aufrechterhaltung einer für das Wachstum und das Überleben des Tumors geeigneten Umgebung zu sein (Radinsky und Fidler 1992, Lindmark *et al.*, 1993, Sundberg *et al.*, 1993, Liotta und Kohn 2001, Kitadai *et al.*, 2006).

4.4.1 Einfluss der PDGFR- β -Inhibition auf zelluläre Prozesse

Um die Bedeutung des PDGFR- β in kolorektalen Karzinomzellen weiter zu analysieren, sollte dieser mittels spezifischer siRNA bzw. dem *small molecule*-Inhibitor Ki11502 blockiert werden. Anschließend sollte der Einfluss der Inhibition des PDGFR- β auf Proliferation und Zellüberleben überprüft werden. In der Kolonkarzinomzelllinie SW480 führten beide Wege der Inhibition zu einer verminderten Proliferationsrate, ohne dabei Einfluss auf die Todesrate auszuüben. Weitere Analysen nach der Inhibition zeigten, dass die Proliferationsverminderung durch eine reduzierte Aktivierung des PI3K-Signalwegs verursacht wurde. Eine Beeinträchtigung des MAPK-Signalwegs konnte dagegen nicht

detektiert werden. Auch Watanabe *et al.* konnten *in vitro* für Glioblastomzellen zeigen, dass eine Inhibition des PDGFR- β zu einer verminderten Aktivierung des PI3K-Signalwegs und einer verminderten Proliferationsrate führt. Dies wurde auch im Xenograftmodell bestätigt. Dort konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die PDGFR- β -Inhibition zu einer verminderten Anzahl an Blutgefäßen im Tumor führte (Watanabe *et al.*, 2013). In der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 führte die Inhibition des PDGFR- β *in vitro* mittels siRNA zu einer deutlichen Proliferationsminderung. Im Xenograftmodell war dieser Effekt noch stärker. Auch hier konnte im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich geringere Dichte der Blutgefäße im Tumorgewebe festgestellt werden (Park *et al.*, 2011). Roberts *et al.* konnten für Xenografttumore aus Glioblastom-, Bronchialkarzinom- und Kolonkarzinomzellen zeigen, dass die PDGFR- β -Inhibition zu einer verringerten Tumorprogression und einer verminderten Gefäßdichte führt (Roberts *et al.*, 2005). Dies konnte auch in einem orthotopen Xenograftmodell mit einer Pankreaskarzinomzelllinie gezeigt werden (Yokoi *et al.*, 2005). Mittels immunzytochemischem Nachweis des *proliferating cell nuclear antigen* konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die Tumorprogression zum Teil durch eine verminderte Proliferation verursacht wurde. Es wurde jedoch auch eine verstärkte Apoptose von Tumorzellen und tumorassoziierten Endothelzellen detektiert. Die PDGFR- β -Inhibition bewirkte zudem eine verminderte Perizytenummantelung der Tumorendothelzellen. Eine Bestätigung unserer Ergebnisse im Xenograftmodell konnte in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Aufgrund der vielfach beschriebenen verminderten Gefäßdichte nach der PDGFR- β -Inhibition erscheint dies jedoch sinnvoll. Auch könnte *in vitro* überprüft werden, ob die PDGFR- β -Inhibition zu einer verminderten Expression von mit der Angiogenese assoziierten Faktoren führt.

Um die Ursachen für die verminderte Proliferation nach der PDGFR- β -Inhibition in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 näher zu analysieren, wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft, ob es nach der PDGFR- β -Inhibition zu einer Veränderung im Zellzyklus kommt. Es zeigte sich, dass die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Ki11502 ab einer Konzentration von 5 μ M zu einem G2/M-Arrest führte. Für die siRNA-vermittelte PDGFR- β -Inhibition konnte dies nicht gezeigt werden. Eine morphologische Analyse konnte dieses Ergebnis bestätigen. Die Behandlung mit Ki11502 führte ab einer Konzentrationen von 5 μ M zu einer deutlichen Zunahme der Zellgröße. Die siRNA-Behandlung zeigte auch hier keine Auswirkungen. In der Literatur findet sich bisher kein Hinweis darauf, dass eine Inhibition des PDGFR- β zu einem G2/M-Arrest führen kann. Es konnte bisher nur ein Einfluss des PDGFR- β in der G1-Phase gezeigt werden. In der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 hat die Aktivierung des PDGFR- β mit PDGF-BB eine proliferationssteigernde Wirkung, die durch einen verstärkten Übergang von der G1- in die S-Phase verursacht wird (Yu *et al.*, 2003). Desweiteren führt eine Aktivierung des PDGFR- β in humanen mesenchymalen Stammzellen

über die Aktivierung des PI3K-Signalwegs zu einer vermehrten Expression von CyclinD1/3. Dadurch wird der Zellzyklus vorangetrieben (Gharibi *et al.*, 2012). Auch in Hamsterfibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der PDGFR- β -Achse den Zellzyklus durch eine erhöhte Expression von Cyclin D1 vorantreibt (Weber *et al.*, 1997).

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen ist in die vier Phasen G1, S, G2 und M unterteilt. Ausdifferenzierte Zellen, die sich nicht mehr teilen, verbleiben in der G1-Phase, die dann als G0-Phase bezeichnet wird. Der Wechsel in die jeweils nächste Zellzyklusphase ist ein hochgradig regulierter Prozess (Abbildung 4.4). Am Ende jeder Zyklusphase gibt es einen sogenannten *checkpoint*, an dem der Zellzyklus bei Bedarf unterbrochen werden kann. Der Wechsel in die nächste Zyklusphase wird durch Komplexe aus einem Cyclin und einer Cyclin-abhängigen Kinase (CDK, *Cyclin Dependent Kinase*) vermittelt. Ein wichtiger Regulationsmechanismus ist hierbei die Expression der Cycline. Zusätzlich kann durch die Expression von bestimmten CDK-Inhibitoren wie p21 oder p27 der Übergang in die nächste Zyklusphase verhindert werden (Nigg 1995, Vermeulen *et al.*, 2003). In Tumorzellen liegt oft eine Störung der Zellzyklusregulation vor. Hier ist besonders der Tumorsuppressor p53 zu nennen, der in 50% aller Tumoren mutiert vorliegt. Infolge des Auftretens von DNA-Schäden sorgt p53 als Transkriptionsfaktor für die Expression des CDK-Inhibitors p21, der in der Lage ist, alle verschiedenen Cyclin/CDK-Komplexe zu inhibieren. Durch Mutationen kann es zum Verlust der p53-Funktion kommen (Stiewe 2007). Das Auftreten von Störungen der Zellzykluskontrolle in Tumorzellen hat jedoch vielfältige Ursachen. Mutationen und Expressionsveränderungen wurden für Cycline, CDKs, CDK-Inhibitoren und CDK-aktivierende Enzyme beschrieben (Vermeulen *et al.*, 2003).

Der Übergang von der G2- in die M-Phase wird durch die Aktivierung des sogenannten *Mitosis-Promoting Factors* (MPF) vermittelt. Der MPF besteht aus Cyclin B1 und CDK1. Er wird aktiviert durch die Phosphorylierung von CDK1 an Threonin 161, vermittelt durch die *cdk Activating Kinase* (CAK), und die Dephosphorylierung an Threonin14 und Tyrosin15 durch CDC25C. Der aktive MPF wandert dann in den Zellkern und initiiert die Mitose (Rieder 2011) (Abbildung 4.4).

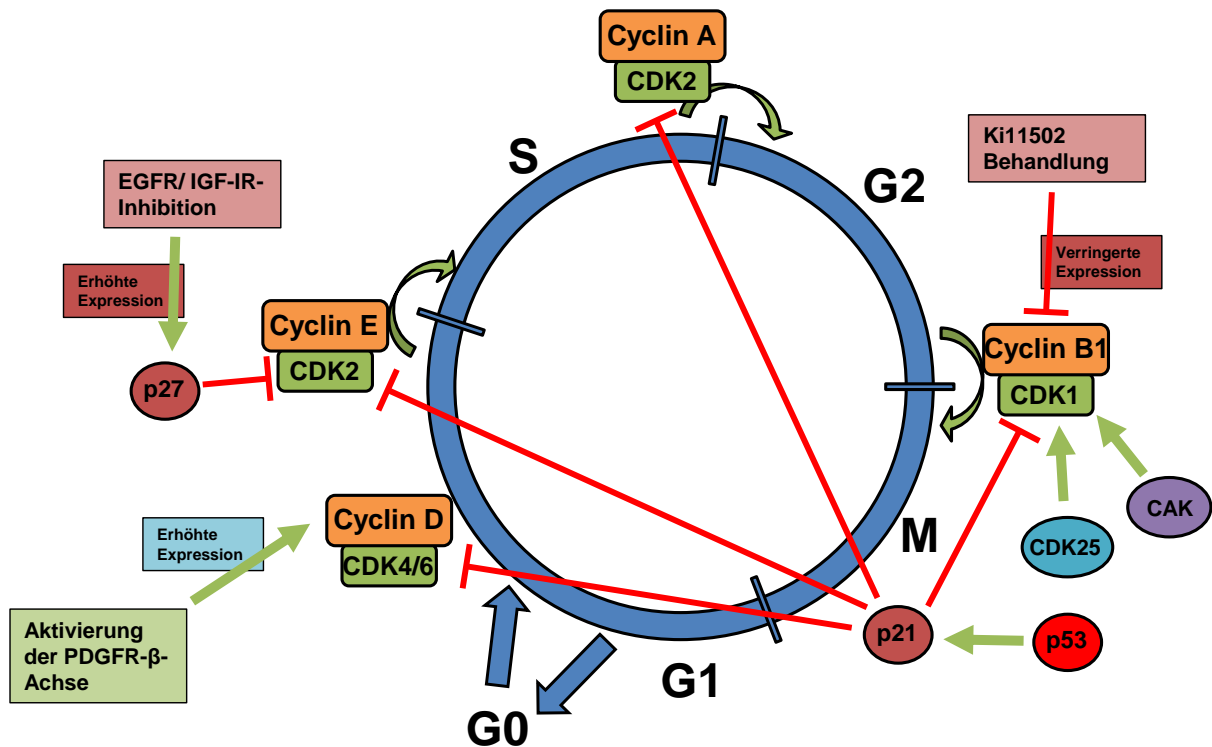


Abbildung 4.4 Schematische Darstellung des Zellzyklus.

Der Zellzyklus ist in die vier Phasen G1, S, G2 und M sowie die Ruhephase G0 unterteilt. Der Übergang von einer Zellzyklusphase in die nächste wird durch Komplexe aus Cyclinen und den cyclinabhängigen Kinasen (CDK) vermittelt. Reguliert werden die Komplexe durch die Expression der Cycline oder die Phosphorylierung der CDKs. Die *cdk activating kinase* (CAK) und CDK25 aktivieren den Komplex aus Cyclin B1 und CDK1 und sorgen so für den Einstieg in die M-Phase. Der Tumorsuppressor p53 sorgt in Folge von DNA-Schäden für eine Expression von p21. p21 ist in der Lage alle Cyclin/CDK-Komplexe zu inhibieren. Die Inhibition des EGFR oder des IGF-IR kann zu einem G1-Arrest führen. Die Aktivierung der PDGFR- β -Achse treibt den Zellzyklus durch eine erhöhte Cyclin D-Expression voran. Die Behandlung der SW480-Zellen mit Ki1502 führt durch eine verminderte Expression von Cyclin B1 zu einem G2/M-Arrest. Modifiziert nach (Cox und Lane 1995, Vermeulen *et al.*, 2003).

Die Western Blot-basierte Analyse verschiedener Zellzyklusregulatoren in den mit Ki1502 behandelten SW480-Zellen ergab, dass die Behandlung zu einer verminderten Expression von CyclinB1 führt, welches als Bestandteil des MPF-Komplexes für den Übergang von der G2- in die M-Phase verantwortlich ist. Wie bereits dargestellt, konnte dieses Ergebnis bisher in der Literatur nicht bestätigt werden.

Da der G2/M-Arrest nur in den mit dem Inhibitor behandelten SW480-Zellen auftrat, nicht aber in den mit PDGFR- β -siRNAs behandelten Zellen, stellte sich die Frage, ob der G2/M-Arrest tatsächlich nur durch die Inhibition des PDGFR- β hervorgerufen wurde. Weiterhin findet sich in der Literatur kein Hinweis darauf, dass die Inhibition des PDGFR- β zu einem G2/M-Arrest führen kann. Prinzipiell wird dem Tyrosinkinaseinhibitor Ki1502 eine sehr hohe Spezifität zugeschrieben (mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) $<10\text{nM}$ für die eosinophile Leukämiezelllinie EOL-1). Für hohe Konzentrationen (deutlich über der

angegebenen benötigten Konzentration für die Inhibition des PDGFR- β) konnte jedoch auch eine Inhibition der Rezeptortyrosinkinase cKIT (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) durch den Inhibitor Ki11502 nachgewiesen werden (IC₅₀ 86,81nM in EOL-1) (Furuta *et al.*, 2006, Nishioka *et al.*, 2008). Dazu passend führt die Inhibition von cKIT in primären spermatogonialen Zellen zu einem G2/M-Arrest (Sikarwar und Reddy 2008). Yasuda *et al.* konnten zeigen, dass die Inhibition von cKIT in kolorektalen Karzinomzellen eine durch den PI3K-Signalweg vermittelte Verminderung der Proliferationsrate bewirkt (Yasuda *et al.*, 2007). Da die SW480-Zellen cKIT exprimieren, wäre die Ki11502-bedingte Inhibition des cKIT-Rezeptors eine mögliche Ursache für den G2/M-Arrest.

Der cKIT-Rezeptor ist eine dem PDGFR- β eng verwandte transmembrane Rezeptortyrosinkinase (Yarden *et al.*, 1987). Die Bindung des Liganden *stem cell factor* (SCF) führt zu einer Homodimerisierung, die durch eine Autophosphorylierung des Rezeptordimers zu dessen Aktivierung führt (Williams *et al.*, 1990, Blume-Jensen *et al.*, 1991). Über den MAPK- und den PI3K-Signalweg fördert die Aktivierung von cKIT die Proliferation, Differenzierung und das Zellüberleben (Ashman 1999, Heinrich *et al.*, 2002, Roskoski 2005). Die Deregulierung des cKIT-Signalwegs konnte bereits in Mammakarzinom-, Bronchialkarzinom-, Prostatakarzinom- und kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesen werden (Turner *et al.*, 1992, Bellone *et al.*, 1997, Hines *et al.*, 1999, Simak *et al.*, 2000). Bellone *et al.*, konnten eine Expression von cKIT und SCF *in situ* in kolorektalen Karzinomen und benachbartem Mukosagewebe nachweisen. In weiter entferntem Mukosagewebe war eine Expression von cKIT und SCF nicht nachweisbar (Bellone *et al.*, 1997).

4.4.2 Vergleich der Auswirkungen der PDGFR- β -siRNA-Behandlung mit der Ki11502-Behandlung in Kolonkarzinomzellen mit unterschiedlich starker cKIT-Expression

Um zu überprüfen, ob der G2/M-Arrest durch eine Inhibierung von cKIT verursacht wurde, wurde der Einfluss der PDGFR- β -siRNA und der Ki11502-Behandlung auf die Proliferation, das Zellüberleben und den Zellzyklus in den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und Caco-2 untersucht und mit den Ergebnissen der SW480-Zellen verglichen. DLD-1-Zellen zeigen eine deutlich höhere cKIT-Expression als SW480-Zellen, Caco-2-Zellen dagegen eine sehr geringe cKIT-Expression. Die Expression des PDGFR- β unterscheidet sich nur geringfügig zwischen den Zelllinien. Die Ergebnisse der Analysen sind schematisch in Abbildung 4.5 zusammengefasst. Der Vergleich der Effekte der PDGFR- β -siRNA- und Ki11502-Behandlung in den unterschiedlichen Zellen scheint die Annahme zu bestätigen, dass der Inhibitor Ki11502 nicht nur den PDGFR- β sondern auch cKIT inhibiert. Die Inhibition des

PDGFR- β mittels siRNA führte in allen drei Zelllinien zu einem moderaten Rückgang der Proliferationsrate. Dieser Effekt war in der Zelllinie SW480, die den PDGFR- β am stärksten exprimiert, am Größten. Eine Auswirkung auf den Zellzyklus die oder Todesrate konnte in keiner der Zelllinien beobachtet werden. Vergleicht man die Auswirkungen der Ki11502-Behandlung zwischen den Zelllinien, so lässt sich feststellen, dass die Effekte der Behandlung mit zunehmender cKIT-Expression stärker werden. In den Caco-2-Zellen mit der geringsten c-KIT-Expression führte die Behandlung zu einem moderaten Rückgang der Proliferationsrate. Erst bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μ M verringerte sich der Anteil der Zellen in der G1-Phase zugunsten der S- und G2-Phase. In den SW480-Zellen waren diese Effekte stärker ausgeprägt. Die Abnahme der Proliferationsrate war größer und schon ab einer Konzentration von 5 μ M war der Großteil der Zellen in der G2-Phase arretiert. Bei den DLD-1-Zellen, die den cKIT-Rezeptor deutlich stärker als die anderen Zellen exprimieren (x70), waren die Inhibitoreffekte am stärksten. Neben einer Proliferationsverminderung von bis zu 60% stieg auch die Todesrate der Zellen. Dies wurde auch in der Zellzyklusanalyse sichtbar. Der Großteil der Zellen befand sich in der subG1-Phase. Diese Ergebnisse werden in der Literatur bestätigt. Bellone *et al.* konnten für verschiedene kolorektale Karzinomzelllinien zeigen, dass die Inhibition des cKIT-Rezeptors zu einer verminderten Proliferationsrate führt. In der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 bewirkte die Inhibition von cKIT mittels siRNA oder spezifischen Antikörpern eine verminderte Migrationsfähigkeit und eine durch die Herunterregulation der Matrix-Metalloproteinase 9 vermittelte, verminderte Invasionsfähigkeit der Zelle. Zusätzlich führte die Inhibition von cKIT zu einer erhöhten Apoptoserate (Bellone *et al.*, 2001). Yasuda *et al.* konnten in den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 zeigen, dass die Stimulation mit SCF zu einer Aktivierung des PI3K- und des MAPK-Signalwegs führte. Durch den MAPK-Signalweg wurde die Invasionsfähigkeit gefördert, durch den PI3K-Signalweg vor allem die Proliferation (Yasuda *et al.*, 2007). Die Behandlung mit Imatinib, einem Inhibitor, der sowohl cKIT als auch den PDGFR- β inhibiert, führte in DLD-1-Zellen zu einem starken Anstieg der Apoptose. Dieser wurde durch eine verringerte Expression des antiapoptotischen Proteins BCL2 und einer erhöhten Expression des Apoptose fördernden BCL-xS vermittelt (Bellone *et al.*, 2004). Für die Kolonkarzinomzelllinien HT-29, HCT8 und HCT116 konnten Attoub *et al.* nachweisen, dass die Behandlung mit Imatinib *in vitro* zu einer verminderten Proliferation führt (Attoub *et al.*, 2002). Im Xenograftmodell konnte außerdem eine erhöhte Apoptoserate gezeigt werden.

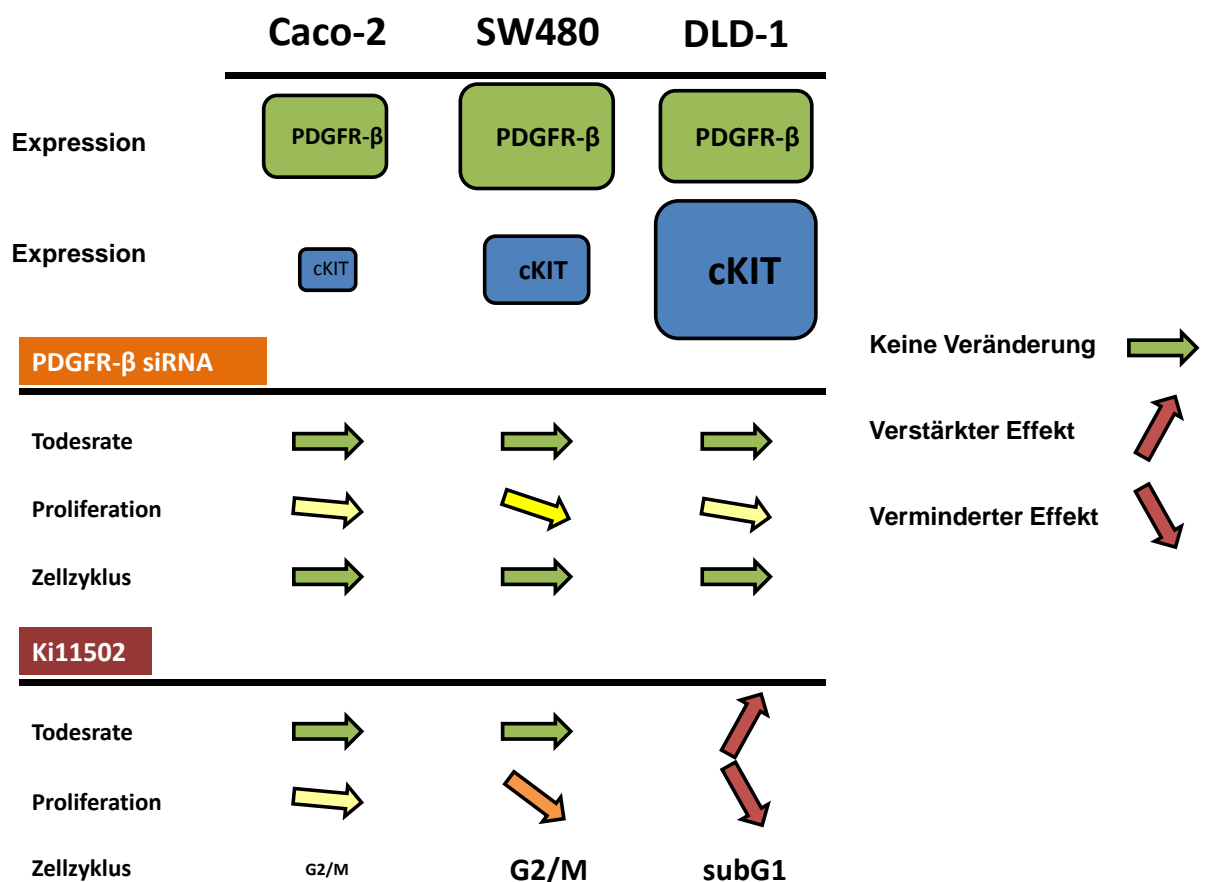


Abbildung 4.5 Vergleich der Auswirkungen der PDGFR-β-siRNA-Behandlung mit der Ki11502-Behandlung in den Zelllinien Caco-2, SW480 und DLD-1.

Dargestellt sind jeweils die Expressionsstärke für den PDGFR-β und cKIT, sowie der Einfluss der PDGFR-β-siRNA- und der Ki11502-Behandlung auf die Todesrate, die Proliferationsrate und den Zellzyklus der Zellen. Die siRNA-Behandlung bewirkte in allen Zelllinien einen moderaten Rückgang in der Proliferationsrate. Auswirkungen auf das Zellüberleben und den Zellzyklus waren nicht zu detektieren. Die Behandlung mit Ki11502 hatte in Caco-2-Zellen lediglich einen kleinen Einfluss auf Proliferation und Zellzyklus. In den SW480-Zellen, die eine stärkere cKIT-Expression aufweisen, führte die Behandlung zu einer stärkeren Proliferationsminderung und einem G2/M-Arrest. In den DLD-1-Zellen führte die Behandlung zu einem Anstieg in der Todesrate und einer deutlich geringeren Proliferation. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Inhibitor Ki11502 auch den cKIT-Rezeptor inhibiert.

Um die These zu bestätigen, dass der Inhibitor Ki11502 neben dem PDGFR-β auch den cKIT-Rezeptor inhibiert, wurde dieser mittels spezifischer siRNA in den Zelllinien SW480 und DLD-1 inhibiert. Diese Behandlung führte in beiden Zelllinien zu einer moderaten Verminderung der Proliferationsrate. Diese fiel jedoch geringer aus, als die Proliferationsminderung durch die Behandlung mit 5µM oder 20µM Ki11502. Auch ein G2/M-Arrest in den SW480-Zellen war nach der Inhibition von cKIT nicht detektierbar. Für die DLD-1-Zellen konnte lediglich für eine der siRNAs ein geringer Anstieg in der Todesrate beobachtet werden. Auch die kombinierte Inhibition des PDGFR-β und des cKIT-Rezeptors

mittels siRNA in SW480-Zellen zeigte keinerlei Auswirkungen auf den Zellzyklus. Verglichen mit den Ergebnissen der Ki11502-Behandlung der Caco-2-, SW480- und DLD-1-Zellen weisen die Resultate der siRNA-Inhibition darauf hin, dass die Auswirkungen der Ki11502-Behandlung auf Zellzyklus und Todesrate auf andere Ursachen zurückzuführen sind. Auffällig ist jedoch, dass die von Bellone *et al.* gezeigte erhöhte Apoptoserate der DLD-1-Zellen nach siRNA vermittelter cKIT-Inhibition in unseren Ergebnissen nur durch eine verwendete siRNA bestätigt werden konnte. Der Anstieg der Todesrate war jedoch nur sehr schwach ausgeprägt. Desweiteren ist nicht geklärt, ob der Inhibitor Ki11502 in den verwendeten Konzentrationen den cKIT-Rezeptor in den von uns verwendeten kolorektalen Karzinomzelllinien inhibiert oder nicht. Um das zu überprüfen, könnte man den Aktivitätsstatus von cKIT nach Inhibitorbehandlung und Stimulation mit seinem Liganden SCF analysieren. Dies konnte in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.4.3 Inhibition von SRC durch Ki11502

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass der Tyrosinkinase-Rezeptor cKIT nicht die alleinige Ursache für den G2/M-Arrest nach der Behandlung mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 in SW480-Zellen darstellt. Um den Grund für diesen Zellzyklusarrest zu identifizieren, sollte der Einfluss des Inhibitors Ki11502 auf die Aktivität verschiedenster Rezeptoren und deren nachfolgende Signalmoleküle untersucht werden. Dafür wurde in SW480-Zellen der Phosphorylierungsstatus verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und Signalmoleküle nach Behandlung mit dem Inhibitor Ki11502 oder PDGFR- β - bzw. cKIT-spezifischer siRNA mit Hilfe des antikörperbasierten *PathScan RTK signaling antibody array* der Firma Cell Signaling untersucht. Mit Hilfe dieser Analysen konnte eine verminderte Aktivierung der Tyrosinkinase SRC (*v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*) nach Behandlung der SW480-Zellen mit dem PDGFR- β -Inhibitor Ki11502 nachgewiesen werden.

SRC ist eine Zellmembran-assoziierte zytoplasmatische Tyrosinkinase und nimmt eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären Signaltransduktion ein. SRC besitzt vier sogenannte SRC-Homologiedomänen (SH1-4), wobei die Kinasedomäne (SH1) am C-Terminus liegt (Abbildung 4.6). In der N-terminalen Region liegen die Myristoylierungsstellen, die für die Lokalisation an der Membran verantwortlich sind. Eine Phosphorylierung des C-terminal liegenden Tyrosins 530 durch CSK (*c-src tyrosine kinase*) führt über eine Konformationsänderung zur Inaktivierung von SRC. Andere intrazelluläre Phosphatasen können den Tyrosinrest wieder dephosphorylieren und SRC damit aktivieren. Eine Autophosphorylierung an Tyrosin 419 führt zu einem Anstieg der intrinsischen Aktivität. Unabhängig vom Phosphorylierungszustand des Tyrosins 530 kann SRC über die SH2- oder SH3-Domäne Komplexe mit Interaktionspartnern bilden, was zu einer Aktivierung von SRC führt. Dadurch kann SRC sowohl durch verschiedene Rezeptoren (darunter auch EGFR,

IGF-IR und PDGFR- β) als auch durch Integrine aktiviert werden. In seiner aktiven Form fördert SRC über den PI3K-, den MAPK- und den STAT-Signalweg (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) die Proliferation, die Differenzierung, die Migration und das Zellüberleben (Bromann *et al.*, 2004, Frame 2004, Lieu und Kopetz 2010, Sen und Johnson 2011) (Abbildung 4.6). Ein Einfluss von Deregulierungen der SRC-Signalkette konnte in Ovarialkarzinom-, Mammakarzinom-, Prostatakarzinom-, Bronchialkarzinom-, Leberkarzinom-, Pankreaskarzinom- und kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesen werden (Summy und Gallick 2003, Dehm und Bonham 2004). Verglichen mit normalem Mukosagewebe konnte in 80% aller untersuchten kolorektalen Karzinome eine Überexpression von SRC detektiert werden (Hurwitz *et al.*, 2004). Cam *et al.* konnten zum Teil eine verminderte Expressionen des SRC-Inhibitors CSK in Kolonkarzinomzellen und kolorektalen Zelllinien nachweisen. Die verminderte Expression dieses SRC-Regulators führt zu einer verstärkten Aktivierung der SRC-Achse (Cam *et al.*, 2001). In kolorektalen Metastasen konnte zum Teil eine nochmals erhöhte SRC-Expression verglichen zum Primärtumor gefunden werden (Bolen *et al.*, 1987, Termuhlen *et al.*, 1993). Die Aktivität von SRC korreliert beim kolorektalen Karzinom mit Tumorstadium und Nodalstatus. Auch konnte eine erhöhte SRC-Aktivität als unabhängiger Marker für eine schlechte Prognose beim kolorektalen Karzinom identifiziert werden. Immunzytochemische Analysen an kolorektalen Karzinomen verschiedener UICC-Stadien konnten nachweisen, dass eine erhöhte SRC-Aktivität mit einer niedrigen Überlebenserwartung und einem kürzeren krankheitsfreien Überleben korreliert ist (Aligayer *et al.*, 2002). Außerdem konnte eine erhöhte SRC-Expression mit einer Resistenz gegen Cetuximab assoziiert werden. Kolonkarzinomzellen, die durch eine längere Behandlung mit Cetuximab *in vitro* eine Resistenz gegen Cetuximab entwickelt hatten, wiesen eine deutlich erhöhte SRC-Aktivität auf. Die Inhibition von SRC machte die Zellen wieder sensitiv gegen die Cetuximab-Behandlung (Lu *et al.*, 2007). Kopetz *et al.* konnten in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien im Mausmodell zeigen, dass eine Behandlung mit Oxaliplatin zu einer chronischen SRC-Aktivierung führte (Kopetz *et al.*, 2009). In Fibroblasten und kolorektalen Karzinomzelllinien konnte außerdem gezeigt werden, dass SRC einen Komplex mit EGFR bilden kann, in dessen Folge der EGFR und die nachfolgenden Signalwege auch ohne Ligandenbindung aktiviert werden (Maa *et al.*, 1995, Stover *et al.*, 1995, Biscardi *et al.*, 1999, Tice *et al.*, 1999).

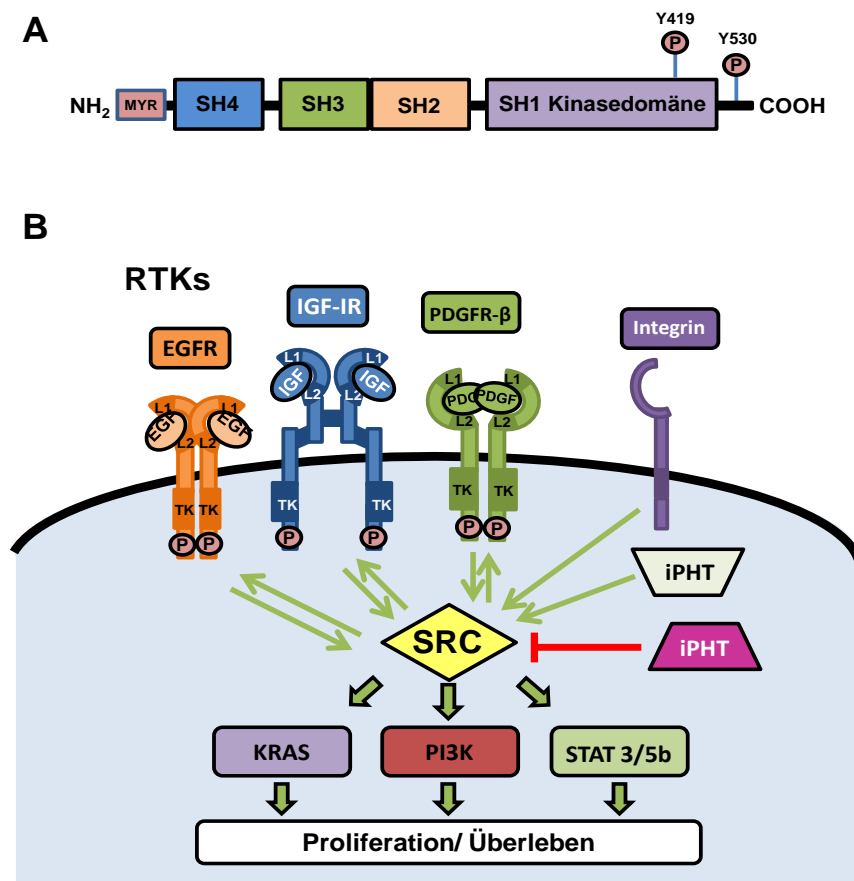


Abbildung 4.6 Schematische Darstellung der SRC-Struktur (A) und der SRC-Signaltransduktion (B).

SRC besitzt vier Domänen (SH1-4). N-terminal liegen die Myristoylierungsstellen (MYR) die für eine Lokalisation an der Membran verantwortlich sind. Eine Phosphorylierung des Tyrosins (Y) 530 führt zur Inaktivierung von SRC. Eine Autophosphorylierung an Tyrosin (Y) 419 führt zu einem Anstieg der intrinsischen Aktivität. SRC kann durch die Bindung verschiedener Rezeptoren (RTKs) (z.B. EGFR, IGF-IR und PDGFR- β) an SH2 und SH3 als auch durch Integrine aktiviert werden. Intrazelluläre Phosphatasen (iPHT) können SRC aktivieren oder inhibieren. SRC fördert über den PI3K-, den MAPK- und den STAT-Signalweg Proliferation und Zellüberleben. Außerdem kann SRC Einfluss auf die Aktivität der RTKs nehmen. Modifiziert nach (Lieu und Kopetz 2010, Krishnan *et al.*, 2012).

4.4.3.1 Nachweis der SRC-Inhibition durch Ki11502

Weitergehende Analysen in SW480- und DLD-1-Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor Ki11502 oder PDGFR- β - bzw. cKIT-spezifischer siRNA sowie dem SRC-spezifischen Inhibitor PP2 konnten bestätigen, dass der Inhibitor Ki11502 auch SRC inhibiert. Für die in den vorhergehenden Experimenten verwendeten Ki11502-Konzentrationen von 5 μ M und 20 μ M konnte zum Teil eine komplette Inhibition von SRC nachgewiesen werden. Eine Aktivierung von SRC konnte nach der Inhibitorbehandlung der Zellen weder durch eine Stimulation mit 10% FKS, EGF, IGF-I oder PDGF-BB induziert werden. Der Effekt der Verminderung der SRC-Aktivität war in den DLD-1-Zellen durch die Behandlung mit 5 μ M oder 20 μ M Ki11502 größer als durch die Behandlung mit dem SRC-Inhibitor PP2. Die

Inhibition des PDGFR- β mit siRNA bewirkte, dass eine Stimulierung der Zellen mit PDGF-BB nicht mehr zu einer erhöhten SRC-Aktivierung führt. Auf die Stimulierbarkeit der SRC-Aktivität durch FKS, IGF-I und EGF hatte die siRNA-Behandlung keinen Einfluss.

Proliferationsanalysen in SW480-Zellen und DLD-1-Zellen bestätigten außerdem den Einfluss der SRC-Inhibition auf die Proliferationsrate. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit siRNA gegen den PDGFR- β und dem SRC-Inhibitor PP2 führte zu einem stärkeren Rückgang der Proliferation als die siRNA-Behandlung alleine. Interessanterweise war die Verminderung der Proliferationsrate durch die Behandlung mit Ki11502 größer als die durch die PP2-Behandlung. Die Auswirkungen der PP2-Behandlung auf das Zellüberleben und den Zellzyklus konnten in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch eindeutig, dass Ki11502 neben PDGFR- β auch SRC inhibieren kann (Abbildung 4.7). Zusammen mit der Erkenntnis, dass die gemeinsame Inhibition von PDGFR- β und cKIT weder zu einem G2/M-Arrest in den SW480-Zellen noch zu einer erhöhten Todesrate der DLD-1-Zellen führt, legt die Vermutung nahe, dass diese Effekte durch die zusätzliche Inhibition von SRC verursacht wurden. Diese Annahme wird zum Teil durch die Literatur bestätigt. Moasser *et al.* konnten mittels durchflusszytometrischer Methoden zeigen, dass die Inhibition von SRC in acht verschiedenen Mammakarzinomzelllinien sowie je einer Bronchialkarzinom-, Prostatakarzinom-, Ovarialkarzinom-, Kolonkarzinom- (HT-29) und Fibroblastenzelllinie zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase führte (Moasser *et al.*, 1999). Auch Anbalagan *et al.* konnten in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien einen G2/M-Arrest nachweisen. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die Inhibition von SRC bei einigen Zelllinien zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate führte (Anbalagan *et al.*, 2012). Desweiteren bewirkte die SRC-Inhibition in verschiedenen Bronchialkarzinomzelllinien einen über den STAT3-Signalweg vermittelten G2/M-Arrest oder führte zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate (Song *et al.*, 2003). Für eine Fibrosarkomzelllinie konnten Vigneron *et al.* nachweisen, dass eine Überexpression von SRC bewirkte, dass eine Behandlung mit Adriamycin nicht mehr zu einer erhöhten Expression von p21 und einer damit verbundenen Inhibition des Zellzyklus am G1/S- und am G2/M-Übergang führte (Vigneron *et al.*, 2005). In einem Mausmodell für das Mammakarzinom, bei dem es durch eine spezifische Expression des *polyomavirus middle-T antigen* zur Bildung von Mammakarzinomen kommt, führte eine konstitutive Inhibition von SRC im Brustdrüsenepithel zu einer verminderten Zellzyklusprogression, die durch eine verminderte Expression von Cyclin B1 vermittelt wurde (Marcotte *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und der bisher diskutierten Literatur zum Einfluss der SRC-Inhibition auf einen G2/M-Arrest stehen die Erkenntnisse von Vigneron *et al.*, Mamidipudi *et al.*, und Hikita *et al.*. Alle drei Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Inhibition von SRC in kolorektalen Karzinomzelllinien (darunter auch SW480 und HT-29)

einen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bewirkt (Vigneron *et al.*, 2005, Mamidipudi *et al.*, 2007, Hikita *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass die Behandlung der SW480-Zellen mit Ki11502 zu einem G2/M-Arrest führt, lässt sich dadurch erklären, dass Ki11502 neben SRC auch den PDGFR- β und eventuell den cKIT-Rezeptor inhibiert. Dazu passend wiesen Hikita *et al.* nach, dass die alleinige Inhibition von SRC in SW480- und HT-29-Zellen mit PP2 zu einem G1/S-Arrest, die Behandlung mit einem Inhibitor, der neben SRC auch verschiedene CDKs inhibiert, zu einem G2/M-Arrest führte (Hikita *et al.*, 2010). Eine Überprüfung, ob der G2/M-Arrest in den SW480-Zellen nur durch die kombinierte Inhibition von PDGFR- β und SRC hervorgerufen wird, konnte in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

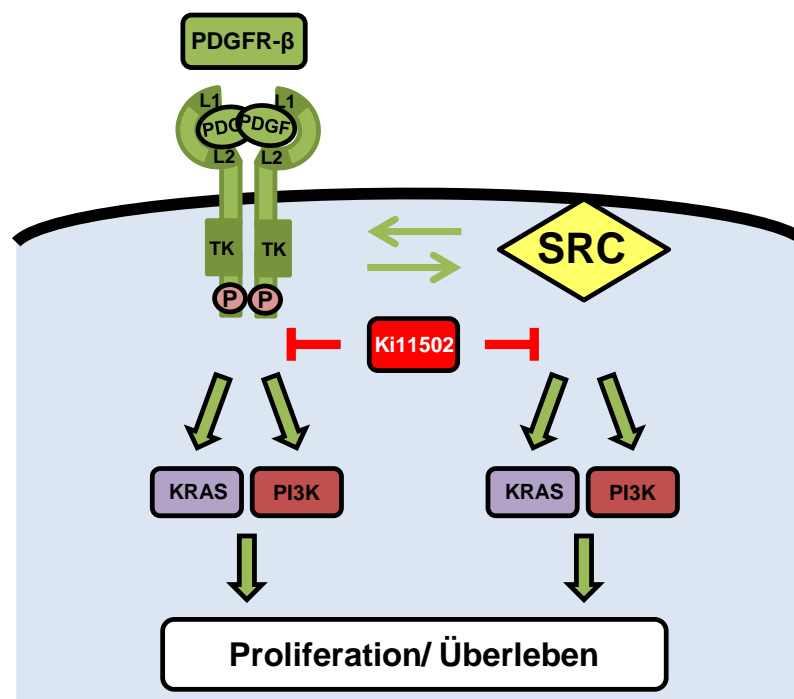


Abbildung 4.7 Einfluss des Inhibitors Ki11502 auf kolorektale Karzinomzellen.

Der Inhibitor Ki11502 inhibiert sowohl den PDGFR- β als auch die SRC-Kinase und verhindert die Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass nach unseren Ergebnissen der Effekt der alleinigen PDGFR- β -Inhibition *in vitro* relativ gering ausfällt. Die Inhibition mittels siRNA führte in verschiedenen kolorektalen Karzinomzellen, abhängig von der Expressionsstärke des PDGFR- β , lediglich zu einer moderaten Verminderung der Proliferationsrate von 10% bis 20%. Eine erhöhte Apoptoserate war nicht zu detektieren. Die bereits diskutierten Ergebnisse der PDGFR- β -Inhibition in Prostatakarzinom-, Glioblastom-, Bronchialkarzinom- und Kolonkarzinomzellen zeigen jedoch (Roberts *et al.*, 2005, Yokoi *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2011, Watanabe *et al.*, 2013), dass der Antitumoreffekt der PDGFR- β -Inhibition im Xenograftmodell *in vivo* durch eine verminderte Angiogenese stärker ausfällt als der Effekt *in*

in vitro. Nähere Analysen mit Xenografttumoren scheinen angebracht, um das tatsächliche Potential der PDGFR- β -Inhibition bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms zu untersuchen.

Trotz der hier diskutierten anti-Tumor-Effekte der SRC-Inhibition zeigten erste Phase II-Studien für eine anti-SRC-Monotherapie für verschiedene Tumorentitäten, dass die alleinige Inhibition von SRC keinen klinischen Nutzen hat (Tabelle 4.4). Verglichen mit nicht behandelten Patienten (palliative Pflege) zeigte die SRC-Inhibition mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Saracatinib oder Bosutinib keine Verbesserung für Therapieansprechen oder Überlebensprognose.

Tabelle 4.4 Darstellung und Vergleich zwischen verschiedenen klinischen Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit einer SRC-Inhibition bei der Therapie verschiedener Tumorentitäten

Referenz	Teilnehmer	Behandlung	Patienten	Therapieeffekt (Therapieansprechen oder Überleben verglichen mit palliative Pflege)
(Gucalp <i>et al.</i> , 2011)	hormonunabhängiges metastasiertes Mammakarzinom	Saracatinib	9	keiner
(Gangadhar <i>et al.</i> , 2012)	metastasiertes Melanom	Saracatinib	23	keiner
(Mackay <i>et al.</i> , 2012)	metastasiertes Magenkarzinom	Saracatinib	17	keiner
(Daud <i>et al.</i> , 2012)	inoperables fortgeschrittenes Pankreas-, Mamma-, Bronchial- und Kolonkarzinom	Bosutinib	112	keiner
(Campone <i>et al.</i> , 2012)	metastasiertes Mammakarzinom	Bosutinib	73	keiner

Wie bereits für den EGFR und den IGF-IR diskutiert, bestätigen auch unsere Ergebnisse mit dem Inhibitor Ki11502 die Hypothese, dass es sinnvoll sein könnte, eine Antitumorthherapie zu favorisieren, die sich gegen mehrere Ziele richtet. So führte die gemeinsame Inhibition von PDGFR- β , cKIT und SRC oder die Verwendung des Inhibitors Ki11502 zu deutlich stärkeren Effekten als die alleinige Inhibition des PDGFR- β . Auch die Literatur bestätigt diese Hypothese. Die gleichzeitige Inhibition des EGFR, VEGFR und PDGFR- β führte *in vitro* und in einem orthotopen Mausmodell für das Pankreaskarzinom verglichen mit der Einzelinhibition zu einem deutlich besseren Therapieerfolg. Eine Behandlung der orthotopen Xenografttumoren mit einem Zytostatikum (Gemcitabine) und *small molecule*-Inhibitoren gegen den EGFR, den VEGFR und den PDGFR- β sorgte für ein deutlich längeres Überleben der Tiere. 100 Tage nach der Implantation der Zellen (Start der Behandlung an Tag 20, durchgehend weitergeführt) waren noch 80% der Tiere am Leben. Alle nur mit einem Wirkstoff behandelten Tiere waren spätestens 80 Tage nach der Implantation gestorben (nicht behandelte Kontrolle 40 Tage) (Yokoi *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe konnte

außerdem zeigen, dass die kombinierte Behandlung zu einer deutlich geringeren Tumorprogressionsrate, einer erhöhten Apoptoserate der Tumorzellen und einer reduzierten Anzahl an Blutgefäßen führte. Tonra *et al.* konnten in verschiedenen Karzinomzelllinien (Pankreas-, Prostata-, Mamma-, Hals-und-Kopf-, nichtkleinzelliges Bronchial- und Kolonkarzinom) nachweisen, dass die kombinierte Inhibition des EGFR, des IGF-IR und des VEGFR2 mit monoklonalen Antikörpern zu einer deutlich verminderten Proliferationsrate führt. Der Effekt war für die kombinierte Inhibition aller drei Rezeptoren größer als der der Einzelinhibitionen oder der Inhibition von jeweils nur zwei Rezeptoren. Dies konnte auch in Xenograftmodellen bestätigt werden. Für die Kolonkarzinomzelllinien HCT-8 und HT-29 konnte mit der kombinierten Inhibition des EGFR, IGF-IR und VEGFR2 eine Stagnation der Tumorprogression erreicht werden (Tonra *et al.*, 2009). Neben der in dieser Arbeit bereits mehrfach diskutierten Erkenntnis, dass eine kombinierte Inhibition von zwei oder drei verschiedenen Zielen den Therapieeffekt vergrößern kann, spielt bei der klinischen Behandlung von Karzinomen auch die Heterogenität der Tumore eine Rolle. Kuwai *et al.* konnten mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen an Gewebeschnitten kolorektaler Karzinome eine inter- und intratumorale Heterogenität der Expression von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen, wie dem EGFR, dem VEGFR-2 und dem PDGFR- β , nachweisen (Kuwai *et al.*, 2008). Auch Goranova *et al.* konnten in 42 kolorektalen Karzinomen mit einer nachgewiesenen Mutation für KRAS, APC (*Adenomatous-polyposis-coli*) und p53 eine Heterogenität innerhalb eines Tumors nachweisen. Die Arbeitsgruppe analysierte pro Tumor in jeweils mehreren verschiedenen kleinen Gewebeproben bestehend aus ca. 200 Zellen den Mutationsstatus von APC, KRAS und p53. Es zeigte sich, dass sich der Mutationsstatus von verschiedenen Stücken aus ein und demselben Tumor zum Teil unterschied. Dies lässt vermuten, dass ein Tumor aus vielen verschiedenen Subpopulationen besteht, die verschiedene Fähigkeiten oder Resistenzen haben können (Goranova *et al.*, 2011). Eine Therapie, die sich gegen mehrere Ziele zugleich richtet, verringert die Wahrscheinlichkeit, dass eine resistente Population zurückbleibt und einen neuen Tumor bilden kann.

In klinischen Studien werden bereits Tyrosinkinaseinhibitoren getestet, die nicht mehr spezifisch gegen ein Ziel gerichtet sind, sondern mehrere Ziele inhibieren können. Beispiele hierfür sind die *small molecule*-Inhibitoren Imatinib Mesylat, Sunitinib und Sorafenib, die neben dem PDGFR- β auch noch den VEGF und cKIT bzw. die RAF-Signalkaskade inhibieren. In einer Phase II-Studie führte die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem, nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom mit einer nachgewiesenen KRAS-Mutation, die zuvor nicht auf die Radiochemotherapie angesprochen hatten, mit einer Sorafenib-Monotherapie zu einer Verbesserung der klinischen Situation. 8,8% der Patienten zeigten ein Therapieansprechen, weitere 43,8% *stable disease*. Sorafenib inhibiert neben dem PDGFR- β auch den VEGFR und RAF (Dingemans *et al.*, 2013). In einer Phase II-Studie

für Sunitinib (inhibiert PDGFR- β , cKIT, VEGF, *fms-related tyrosine kinase 3* und RET) mit Patienten mit fortgeschrittenem inoperablen Pankreaskarzinom profitierten insgesamt 75% der Patienten von der Behandlung. Bei 50% konnte ein teilweises Therapieansprechen beobachtet werden. Weitere 25% der Patienten zeigten *stable disease* (Ito *et al.*, 2012). Für den Tyrosinkinaseinhibitor ABT-348 konnte gezeigt werden, dass er neben der Aurora Kinase auch den VEGFR, den PDGFR- α/β und SRC inhibiert. Für verschiedene Karzinomzelllinien (z.B. Fibrosarkom und Pankreaskarzinom) konnten erste Versuche *in vitro* und am Xenografttumor zeigen, dass die Behandlung mit ABT-348 zu einer deutlichen Proliferationsverminderung bzw. einer deutlichen Verminderung der Tumorprogression führt (Glaser *et al.*, 2012). Zusammengefasst Unter Berücksichtigung der Befunde in der Literatur zeigen unsere Ergebnisse, dass die gemeinsame Inhibition mehrerer Rezeptoren bzw. Signalwege einen zusätzlichen Nutzen bei der Therapie von Karzinomen hat und zu neuen Therapieoptionen führen könnte.

4.5 Perspektiven

4.5.1 Etablierung von primären Rektumkarzinomzelllinien

Die Suche nach Biomarkern, die bereits vor Therapiebeginn eine Aussage über das Ansprechen auf verschiedene Therapieoptionen zulassen, ist weiterhin von großem Interesse. Dabei wäre die Bereitstellung einer großen Sammlung primärer Karzinomzelllinien ein wichtiges Hilfsmittel. Die Einteilung der Zellen in *responder*- und *non-responder*-Zelllinien würde es erlauben, *in vitro* nach molekulargenetischen Unterschieden zwischen diesen beiden Gruppen zu suchen. Die Zelllinien könnten auch als Grundlage für die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten dienen, von denen besonders *non-responder*-Patienten profitieren könnten. Aufgrund kleinerer Teilerfolge bei der Xenograftkultivierung und der dreidimensionalen Zellkultur könnte hier angeknüpft werden. Vermeulen *et al.* konnten zeigen, dass Tumorstammzellen aus Kolonkarzinomen durch eine Expression der Stammzellmarker CD133 und CD166 und eine hohe Aktivität des Wnt-Signalwegs charakterisiert sind, und die Stammzeleigenschaften unter Standardbedingungen verlieren. Weitere Analysen der Arbeitsgruppe zeigten, dass für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften von Myofibroblasten sezernierte Faktoren (insbesondere HGF) verantwortlich sind. Für die Etablierung primärer Rektumkarzinomzelllinien könnte die Kultivierung der Zellen in der dreidimensionalen Zellkultur mit dem Zusatz von HGF erfolgreich sein.

Sollte die Etablierung der primären Zelllinien in Zukunft erfolgreich verlaufen, so müssten diese zunächst anhand der Patientendaten oder des Resistenzverhaltens bei der

Radiochemotherapie *in vitro*, in *responder* und *non-responder* eingeteilt werden. Langfristig könnte dann nach molekulargenetischen Unterschieden zwischen den Gruppen gesucht werden. Unterschiede in den Transkriptomen der Gruppen könnten mit Hilfe von Microarrays identifiziert werden. Sollten hierbei bestimmte Expressionssignaturen identifiziert werden, könnten diese Ergebnisse dadurch validiert werden, dass die zwischen den Gruppen unterschiedlich exprimierte Gene in ihrer Expression verändert werden, um so den *responder*-Status zu verändern. Überexprimierte Gene könnten mittels der siRNA-Technik herunterreguliert, niedrig exprimierte Gene mit Hilfe von Expressionsvektoren überexprimiert werden. Mit Hilfe des *next generation sequencing* ließen sich Mutationscluster identifizieren, die für eine der beiden Gruppen spezifisch sind.

4.5.2 5-FU-basierte Radiochemotherapie mit zusätzlicher Inhibition des EGFR und des IGF-IR *in vitro* und *in vivo*

Aufgrund des signifikanten Einflusses von Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Signalwege bei der Regulierung der Tumorprogression, der Invasion, der Angiogenese und der Metastasierung ist die Inhibition verschiedener Rezeptoren und deren Signalwege mittlerweile zu einer neuen Therapiemöglichkeit von Karzinomen geworden. Da viele Patienten nicht von einer Monotherapie profitieren oder während der Behandlung eine Resistenz entwickeln, wird in zunehmendem Maße untersucht, ob die kombinierte Inhibition mehrerer Rezeptoren einen größeren Therapienutzen haben könnte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse aus den *in vitro*-Studien der kombinierten Radiochemotherapie mit zusätzlicher EGFR- bzw. IGF-IR-Inhibition zeigten einen deutlichen Therapienutzen der gemeinsamen Inhibition von EGFR und IGF-IR. Auch in als *non-responder* klassifizierten Zelllinien zeigte die kombinierte Inhibition große Wirkung. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, sollten diese Experimente zunächst mit weiteren kolorektalen Karzinomzelllinien wiederholt werden. Auch der Einfluss der Radiochemotherapie in Kombination mit der Rezeptorinhibition in der Zelle sollte weiter aufgeklärt werden. So könnte der Aktivitätsstatus verschiedener DNA-Reparatur- und Zellzyklusregulatoren sowie mit der Apoptose assoziierter Proteine untersucht werden, um festzustellen, auf welche Weise der zusätzliche Therapieeffekt der Inhibitorbehandlung zustande kommt. Desweiteren scheint die *in vitro*-Behandlung geeignet, um zu überprüfen, ob die Inhibition zusätzlicher Rezeptoren oder *downstream* liegender Signalmoleküle einen weiteren Therapienutzen aufweist.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Behandlung sollten zunächst auf jeden Fall verifiziert werden. Besonders für die SW837-Zellen muss überprüft werden, ob der verbesserte Therapieeffekt durch die kombinierten Rezeptorinhibition bestätigt werden kann. Zusätzlich sollten weitere

Zelllinien zur Überprüfung herangezogen werden. Im Xenograftmodell kann über die Bestimmung der Blutgefäßdichte überprüft werden, welchen Einfluss die Behandlung auf die Angiogenese hat. Sollte sich bei der *in vitro*-Behandlung zeigen, dass die Inhibition eines weiteren zusätzlichen Rezeptors oder Signalmoleküls den Therapienutzen weiter verbessert, so müssten diese Ergebnisse auch im Xenograftmodell bestätigt werden.

4.5.3 Der Einfluss der Heterodimerbildung zwischen dem EGFR und dem IGF-IR beim kolorektalen Karzinom

Es ist bereits bekannt, dass der *crosstalk* zwischen dem EGFR und dem IGF-IR zur Resistenzentwicklung gegen eine anti-EGFR-Therapie beitragen kann. Hierbei scheint auch die Bildung von EGFR/IGF-IR-Heterodimeren eine Rolle zu spielen. In dieser Arbeit konnte das Vorhandensein von EGFR/IGF-IR-Heterodimeren in zwei verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Zunächst sollte hier überprüft werden, ob auch in weiteren kolorektalen Karzinomzelllinien EGFR/IGF-IR-Heterodimere nachweisbar sind. Um zu überprüfen, ob der EGFR oder der IGF-IR als Heterodimer aktiviert vorliegt, oder ob sie weiterhin durch eine Ligandenbindung aktiviert werden können, könnte man den Phosphorylierungszustand des co-präzipitierten Rezeptors nach Serumentzug oder nach Ligandenstimulation mittels Western Blot analysieren. Ein weiteres wichtiges Ziel wäre es zu untersuchen, ob die Fähigkeit zur EGFR/IGF-IR-Dimerisierung einer Zelllinie einen Einfluss auf die Resistenz dieser gegenüber der anti-EGFR- bzw. der Radiochemotherapie hat. Da der PLA eine quantitative Auswertung erlaubt, könnte überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Menge der Heterodimere und dem Therapieansprechen gibt. In diesem Zusammenhang erscheint es außerdem sinnvoll zu überprüfen, ob die Inhibition eines Rezeptors mit monoklonalen Antikörpern oder *small molecule*-Inhibitoren *per se* zu einem Anstieg der Heterodimere in den Zellen führt.

Die erfolgreiche Etablierung des PLA an Gewebeschnitten von kolorektalen Karzinomen bietet die Möglichkeit die Anzahl der Heterodimere auch *in vivo* in Bezug zum Therapieansprechen zu setzen. Hierbei kann auch nach dem Auftreten der Heterodimere in verschiedenen Zelltypen (Tumor- und Mesenchymalzellen) differenziert werden. Auch eine mögliche Korrelation mit Tumorstadium oder Nodal- und Metastasenstatus sollte überprüft werden. Zudem könnte auch die Anzahl der Heterodimere während des Therapieverlaufs verfolgt und bei jeder entnommenen Biopsie eine Analyse durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die Anzahl der Heterodimere während der Therapie zunimmt, und ob dies mit einem Therapieansprechen korreliert ist. Sollten sich solche Zusammenhänge bestätigen, könnte die Quantifizierung der Heterodimere langfristig als prognostisches Mittel eingesetzt

werden, um z.B. das Therapieansprechen, den Tumorstatus oder den Nodalstatus vorherzusagen.

4.5.4 Der Einfluss der PDGFR- β -Inhibition im kolorektalen Karzinom

Um weitere mögliche Ziele für die Therapie des kolorektalen Karzinoms zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der PDGFR- β -Inhibition in kolorektalen Karzinomzelllinien näher untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition des PDGFR- β in den von uns getesteten Zelllinien *in vitro* lediglich zu einer, über den PI3K-Signalweg vermittelten, moderaten Verminderung der Proliferationsrate führt. Da der PDGFR- β stark mit der Angiogenese verknüpft ist, könnte die Inhibition des PDGFR- β *in vivo* jedoch größeren Einfluss haben. Um dies zu überprüfen, könnte die Expression verschiedener für die Angiogenese wichtiger Faktoren nach der PDGFR- β -Inhibition untersucht werden. Auch die Analyse der Blutgefäßdichte und des Tumorprogressionsverhalten im Xenograftmodell nach der PDGFR- β -Inhibition könnte weitere Erkenntnisse erbringen. Eine zusätzliche Inhibition des PDGFR- β zur kombinierten Inhibition von EGFR und IGF-IR bei der Radiochemotherapie im Xenograftmodell könnte zudem die Hypothese untermauern, dass eine Inhibition von mehreren Rezeptortyrosinkinasen eine höhere Erfolgsquote aufweist als die Einzelinhibition.

Die Ergebnisse bei der Verwendung des Inhibitors Ki11502 haben bestätigt, dass die kombinierte Inhibition mehrere Ziele gleichzeitig von Nutzen sein kann. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass Ki11502 ein potenter Inhibitor in der Therapie sein könnte. Um dies zu überprüfen, könnte der Einfluss der Ki11502-Behandlung im Xenograftmodell untersucht werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen auf das Tumorwachstum und -überleben sowie auf den Therapieerfolg der 5-Fluoruracil- (5-FU) basierten Radiochemotherapie und das Auftreten von Resistenzen im kolorektalen Karzinom analysiert werden.

5.1 Etablierung von primären Rektumkarzinomzelllinien

Ein großes Problem bei der Behandlung des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms liegt darin, dass die kombinierte Radiochemotherapie nicht bei allen Patienten den gleichen Erfolg aufweist. Einige Patienten profitieren von der Behandlung, bei anderen zeigt sich keine Verbesserung des Krankheitsbildes (Sauer *et al.*, 2004, Cunningham *et al.*, 2010). Seit einigen Jahren wird daher versucht, sogenannte Biomarker zu identifizieren, die schon vor Therapiebeginn eine Prognose über das Therapieansprechen erlauben. Dies könnte in Zukunft dazu führen, dass Patienten eine individuell zugeschnittene Therapie erhalten. Um die molekularen Ursachen der Unterschiede im Therapieansprechen von Patienten mit Rektumkarzinom zu untersuchen, war es ein Ziel dieser Arbeit primäre rektale Karzinomzelllinien zu generieren, die anschließend anhand der Patientendaten in *responder*- und *non-responder*-Zelltypen eingeteilt und analysiert werden sollten. Insgesamt wurden 86 prätherapeutische Biopsien von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom und neun Gewebeproben von nicht vorbehandelten, komplett entnommenen Rektumkarzinomen aus dem oberen Rektumdrittel verwendet. Obwohl einige der Proben zunächst anwuchsen und Kolonien bildeten, ließ sich keine Zelllinie länger als sechs Wochen kultivieren. Eine zweite Strategie für die Etablierung primärer Rektumkarzinomzelllinien in dieser Arbeit war die Vermehrung der Zellen subkutan in immundefizienten Mäusen. Dafür wurde Material von 46 Rektumkarzinombiopsien und sechs Gewebeproben kolorektaler Tumorsektate verwendet. Nur eine Probe führte zur Entwicklung eines Xenografttumors. Histopathologische Analysen zeigten, dass es sich bei dem entstandenen Tumor um ein mittelgradig differenziertes, teils schleimbildendes Adenokarzinom handelte, das dem des Patienten histopathologisch ähnlich war. Auch die Überführung dieser Zellen in die Zellkultur blieb erfolglos. Material von zwölf Rektumkarzinombiopsien wurde außerdem für die dreidimensionale Zellkultur verwendet. Eine der verwendeten Biopsien wuchs an und konnte drei Monate kultiviert werden. Zukünftig könnte die Kultivierung der primären Zellen in der dreidimensionalen Zellkultur mit dem Zusatz von HGF Erfolg bringen.

5.2 5-FU-basierte Radiochemotherapie mit zusätzlicher Inhibition des EGFR und des IGF-IR *in vitro* und *in vivo*

Aufgrund des großen Einflusses des EGFR und seines Signalwegs bei der Regulierung der Tumorprogression, der Invasion, der Angiogenese und der Metastasierung (beschrieben unter 4.3) wird bei der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms zum Teil zusätzlich zur Radiochemotherapie der EGFR inhibiert (Cunningham *et al.*, 2010). Lediglich 10% bis 15% der Patienten zeigen jedoch eine verbesserte Therapieantwort auf diese Behandlung (Bardelli und Siena 2010). Um zu überprüfen, ob die Interaktion des EGFR mit dem IGF-IR ein möglicher Resistenzmechanismus auf die Radiochemotherapie darstellen könnte und ob eine kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR eine Verbesserungsmöglichkeit für die Therapie darstellt, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Inhibition der Rezeptoren auf eine kombinierte 5-FU-basierte Radiochemotherapie *in vitro* und *in vivo* im Xenograftmodell untersucht. Für die Experimente wurden die *non-responder* Kolonkarzinomzelllinie DLD-1, die *responder* Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 sowie die *non-responder* Rektumkarzinomzelllinie SW837 ausgewählt. Die Radiochemotherapie erfolgte dann in Anwesenheit der Tyrosinkinaseinhibitoren AEW-541 (IGF-IR-Inhibitor) und Erlotinib (EGFR-Inhibitor). Bei den als *non-responder* klassifizierten DLD-1-Zellen zeigten weder die Inhibition des EGFR- noch die des IGF-IR alleine einen zusätzlichen Therapieeffekt. Die kombinierte Inhibition führte jedoch zu einem deutlich verbesserten Therapieansprechen. Auch die *non-responder*-Zelllinie SW837 zeigte für die kombinierte Rezeptorinhibition einen deutlich verbesserten Therapieeffekt. Jedoch bewirkte in dieser Zelllinie auch die einzelne Inhibition ein verbessertes Therapieansprechen. In den als *responder* klassifizierten Caco-2-Zellen führte abhängig von der Expressionsstärke der Rezeptoren schon die einzelne Inhibition zu einem starken Effekt. Die kombinierte Inhibition steigerte diesen jedoch noch deutlich. Die Mechanismen der zusätzlichen Therapieeffekte werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Um den Therapieeffekt der Rezeptorinhibition auch *in vivo* zu bestätigen, wurden Xenografttumoren aus DLD-1- bzw. SW837-Zellen der Radiochemotherapie mit zusätzlicher EGFR- und IGF-IR-Inhibition unterzogen. Für die DLD-1-Xenografttumore (*non-responder*) zeigte sich weder für die einzelne noch für die kombinierte Inhibition ein Einfluss auf die Tumorprogression. Ein Vorversuch mit 5 Tieren für die *non-responder* Zelllinie SW837 bestätigte die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente. Hier führte die kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR zu einer deutlichen verlangsamten Tumorprogression. Zusammenfassend zeigen die *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse, dass die kombinierte Inhibition von EGFR und IGF-IR das Therapieansprechen in *non-responder*-Zellen deutlich verbessern können, und eine zusätzliche kombinierte Inhibition des EGFR und des IGF-IR zur 5-FU-basierten-Radiochemotherapie in der Klinik durchaus Sinn machen könnte.

5.3 Aufklärung des *crosstalk*-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, den *crosstalk*-Mechanismus zwischen dem EGFR und dem IGF-IR zu analysieren. Mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation konnten sowohl in SW480- als auch in DLD-1-Zellen Hybridrezeptoren zwischen dem EGFR und dem IGF-IR nachgewiesen werden. Der Nachweis der Heterodimere gelang dabei mittels der endogenen Rezeptoren, sowohl über die Präzipitation des EGFR als auch des IGF-IR. Mit einem *Proximity Ligation Assay* konnte dieses Ergebnis in SW480- und DLD-1-Zellen bestätigt werden. Da der PLA eine quantitative Aussage über die Menge der Heterodimere pro Zelle zulässt, konnten wir zeigen, dass eine gemeinsame Stimulation der Rezeptoren mit den Liganden EGF und IGF-I zu einer vermehrten EGFR/IGF-IR-Hybridrezeptorbildung führt. Weitere Analysen zeigten, dass für die induzierte Heterodimerisierung beide Liganden notwendig sind und beide Rezeptoren funktionsfähig sein müssen. Ein Serumentzug oder die Inhibition der Rezeptoren führten jedoch nicht dazu, dass keine EGFR/IGF-IR-Heterodimere mehr zu detektieren waren. Die Frage, ob die Inhibition eines der Rezeptoren *per se* ohne Stimulation schon zu einer erhöhten Anzahl an Heterodimeren führt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Dies könnte bedeuten, dass die Bildung der Heterodimere einen Resistenzmechanismus darstellt.

Mit Hilfe des *Proximity Ligation Assay* konnten in dieser Arbeit IGF-IR/EGFR-Hybridrezeptoren auch *in situ* in humanen Rektumtumoren nachgewiesen werden. Eine genaue Quantifizierung der Heterodimere im Tumor- oder Nichttumorgewebe konnte innerhalb dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Ein grober Vergleich der verschiedenen Tumorproben zeigte jedoch, dass die Anzahl der Heterodimere pro Tumorzelle in den verschiedenen Tumoren unterschiedlich ist. Auch gibt es in einigen der Proben einen deutlichen Unterschied bei der Heterodimeranzahl pro Zelle zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Zellen. Eine Quantifizierung der Heterodimere könnte mit dem Therapieansprechen auf die 5-FU-basierte Radiochemotherapie oder die anti-EGFR-Therapie der Patienten in Verbindung gesetzt werden, um zu überprüfen, ob es eine Korrelation zwischen Heterodimeren und Therapieansprechen gibt. Sollte dies der Fall sein, könnte die Quantifizierung der EGFR/IGF-IR-Heterodimer pro Zelle langfristig als prognostischer Marker eingesetzt werden.

5.4 Der Einfluss des PDGFR- β in kolorektalen Karzinomzellen

Im letzten Teil der Arbeit sollte die Bedeutung des PDGFR- β im kolorektalen Karzinom untersucht werden. In SW480-Zellen führte die Inhibition des PDGFR- β mit Hilfe von siRNA

oder dem Tyrosinkinaseinhibitor Ki11502 zu einer verminderten Proliferationsrate der Zellen, ohne jedoch die Todesrate zu erhöhen. Weitere Analysen konnten zeigen, dass die Inhibition des PDGFR- β zu einer verminderten Aktivierung des PI3K-Signalwegs führte. Im Gegensatz zur siRNA-Behandlung führte die Inhibition mit dem Inhibitor Ki11502 zu einem, über eine verminderte Cyclin B1-Expression vermittelten, G2/M-Arrest in SW480-Zellen. Da der Inhibitor Ki11502 in hohen Konzentrationen auch den Rezeptor cKIT inhibieren kann und q-RT-PCR Analysen zeigten, dass die SW480-Zellen diesen auch exprimieren, sollte überprüft werden, ob der Zellzyklusarrest durch eine Inhibition von cKIT verursacht wird. Dafür wurde der Einfluss der PDGFR- β -siRNA-Inhibition und der Ki11502-Behandlung auf die Proliferation, das Zellüberleben und den Zellzyklus in den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und Caco-2 untersucht und mit den Ergebnissen der SW480-Zellen verglichen. DLD-1-Zellen zeigen eine deutlich höhere cKIT-Expression als SW480-Zellen, Caco-2-Zellen dagegen eine sehr geringe cKIT-Expression. Die Expression des PDGFR- β unterscheidet sich nur geringfügig zwischen den Zelllinien. Die Ergebnisse des Vergleichs schienen die Annahme zu bestätigen, dass der Inhibitor Ki11502 in den von uns genutzten Konzentrationen auch cKIT inhibiert. Die Effekte der Behandlung wurden mit zunehmender cKIT-Expression der Zelllinie stärker. In den Caco-2-Zellen führte die Behandlung zu einem moderaten Rückgang der Proliferationsrate. Erst bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μ M verringerte sich der Anteil der Zellen in der G1-Phase zugunsten der S- und G2-Phase. In den SW480-Zellen war die Abnahme der Proliferationsrate größer und schon ab einer Konzentration von 5 μ M war der Großteil der Zellen in der G2-Phase arretiert. Bei den DLD-1-Zellen stieg neben einer starken Verminderung der Proliferationsrate die Todesrate der Zellen um 60%. Die Analyse des Zellzyklus zeigte, dass die Zellen durch Ki11502-Behandlung in die SubG1-Phase wechselten. Diesen Hinweisen folgend wurde nun der Einfluss einer spezifischen cKIT-Inhibition mittels siRNA in den Zelllinien SW480 und DLD-1 untersucht. Die Inhibition führte in beiden Zelllinien zu einem moderaten Rückgang der Proliferation ohne Veränderung der Todesrate. Ein Einfluss auf den Zellzyklus ließ sich nicht nachweisen. Auch die kombinierte Inhibition des PDGFR- β und cKIT via siRNA führte zu keiner Veränderung im Zellzyklus. Somit konnte gezeigt werden, dass der G2/M-Arrest der SW480-Zellen nach der Inhibitorbehandlung nicht cKIT-abhängig war. Durch die Verwendung eines Arrays zur Analyse der Aktivität verschiedener Rezeptoren und Kinasen konnte die Proteinkinase SRC als möglicher Vermittler für den G2/M-Arrest identifiziert werden. Weitergehende Western Blot-Analysen in den Zelllinien SW480 und DLD-1 konnten zeigen, dass der Inhibitor Ki11502 die Aktivität von SRC in erheblichem Umfang inhibiert, wohingegen die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der PDGF- β - bzw. cKIT-Expression zu einer erhöhten SRC-Aktivierung führte. Die zusätzliche Inhibition von SRC mit PP2 nach Herunterregulierung der PDGFR- β - und cKIT-Expression verminderte die Proliferation vergleichbar mit der Ki11502-

Behandlung von SW480- und DLD-1-Zellen. Aus diesen Ergebnissen konnten wir schlussfolgern, dass Ki11502 neben PDGFR- β auch cKIT und v.a. SRC inhibiert und dass der PDGFR- β im kolorektalen Karzinom (zumindest *in vitro*) eine untergeordnete Rolle spielt.

Zusammenfassend konnte jedoch im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass die kombinierte Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen (EGFR+IGF-IR) bzw. Tyrosinkinasen (PDGFR- β) und SRC einen stärkeren Effekt auf zelluläre Prozesse von kolorektalen Zellen wie Proliferation, Zelltod, Ansprechen auf Radiochemotherapie hat als die Inhibition einzelner Tyrosinkinasen. Diese Ergebnisse sollten nun in Zukunft in die Entwicklung neuer Therapieoptionen v.a. beim metastasierten Kolorektalkarzinom einfließen.

6 Literaturverzeichnis

Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Auflage, Berlin: Robert Koch-Institut (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes)

(2008). Screening for colorectal cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of internal medicine* **149**: 627-637.

Ahmad T, Farnie G, Bundred NJ, Anderson NG (2004). The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry* **279**: 1713-1719.

Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, Sammalkorpi H, Jarvinen H, Mecklin JP *et al* (2005). SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 2606-2611.

Alhopuro P, Alazzouzi H, Sammalkorpi H, Davalos V, Salovaara R, Hemminki A *et al* (2005). SMAD4 levels and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 6311-6316.

Aligayer H, Boyd DD, Heiss MM, Abdalla EK, Curley SA, Gallick GE (2002). Activation of Src kinase in primary colorectal carcinoma: an indicator of poor clinical prognosis. *Cancer* **94**: 344-351.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ *et al* (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 1626-1634.

Anbalagan M, Carrier L, Glodowski S, Hangauer D, Shan B, Rowan BG (2012). KX-01, a novel Src kinase inhibitor directed toward the peptide substrate site, synergizes with tamoxifen in estrogen receptor alpha positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **132**: 391-409.

Ashman LK (1999). The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *The international journal of biochemistry & cell biology* **31**: 1037-1051.

Attoub S, Rivat C, Rodrigues S, Van Bocxlaer S, Bedin M, Bruyneel E *et al* (2002). The c-kit tyrosine kinase inhibitor STI571 for colorectal cancer therapy. *Cancer research* **62**: 4879-4883.

Balko JM, Black EP (2009). A gene expression predictor of response to EGFR-targeted therapy stratifies progression-free survival to cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *BMC cancer* **9**: 145.

Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R (1998). Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **273**: 1568-1573.

Bardelli A, Siena S (2010). Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 1254-1261.

Barnes CJ, Ohshiro K, Rayala SK, El-Naggar AK, Kumar R (2007). Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**: 4291-4299.

Bellone G, Silvestri S, Artusio E, Tibaudi D, Turletti A, Geuna M *et al* (1997). Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF-beta 1. *Journal of cellular physiology* **172**: 1-11.

Bellone G, Carbone A, Sibona N, Bosco O, Tibaudi D, Smirne C *et al* (2001). Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer research* **61**: 2200-2206.

Bellone G, Ferrero D, Carbone A, De Quadros MR, Gramigni C, Prati A *et al* (2004). Inhibition of cell survival and invasive potential of colorectal carcinoma cells by the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Cancer biology & therapy* **3**: 385-392.

Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S *et al* (2007). Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer research* **67**: 2643-2648.

Berardi R, Onofri A, Pistelli M, Maccaroni E, Scartozzi M, Pierantoni C *et al* (2010). Panitumumab: the evidence for its use in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Core evidence* **5**: 61-76.

Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B *et al* (2009). Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol

89803. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 1814-1821.

Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C *et al* (2011). A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer discovery* **1**: 508-523.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**: 332-337.

Bielen A, Perryman L, Box GM, Valenti M, de Haven Brandon A, Martins V *et al* (2011). Enhanced efficacy of IGF1R inhibition in pediatric glioblastoma by combinatorial targeting of PDGFRalpha/beta. *Molecular cancer therapeutics* **10**: 1407-1418.

Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *The Journal of biological chemistry* **274**: 8335-8343.

Bissell MJ, Radisky D (2001). Putting tumours in context. *Nature reviews Cancer* **1**: 46-54.

Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermarck B, Heldin CH (1991). Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *The EMBO journal* **10**: 4121-4128.

Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F *et al* (2009). Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 663-671.

Bolen JB, Veillette A, Schwartz AM, DeSeau V, Rosen N (1987). Activation of pp60c-src protein kinase activity in human colon carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 2251-2255.

Bowers G, Reardon D, Hewitt T, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K *et al* (2001). The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* **20**: 1388-1397.

Boyle P, Langman JS (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* **321**: 805-808.

Brettingham-Moore KH, Duong CP, Heriot AG, Thomas RJ, Phillips WA (2011). Using gene expression profiling to predict response and prognosis in gastrointestinal cancers-the promise and the perils. *Annals of surgical oncology* **18**: 1484-1491.

Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA (2004). The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* **23**: 7957-7968.

Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, Portera CA, Tsan R, McConkey DJ *et al* (2000). Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**: 1936-1948.

Burgaud JL, Baserga R (1996). Intracellular transactivation of the insulin-like growth factor I receptor by an epidermal growth factor receptor. *Experimental cell research* **223**: 412-419.

Cam WR, Masaki T, Shiratori Y, Kato N, Ikenoue T, Okamoto M *et al* (2001). Reduced C-terminal Src kinase activity is correlated inversely with pp60(c-src) activity in colorectal carcinoma. *Cancer* **92**: 61-70.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**: 1395-1413.

Campane M, Bondarenko I, Brincaat S, Hotko Y, Munster PN, Chmielowska E *et al* (2012). Phase II study of single-agent bosutinib, a Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer pretreated with chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**: 610-617.

Chakravarti A, Loeffler JS, Dyson NJ (2002). Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer research* **62**: 200-207.

Chen PH, Chen X, He X (2012). Platelet-derived growth factors and their receptors: Structural and functional perspectives. *Biochimica et biophysica acta*.

Christensen JG, Schreck RE, Chan E, Wang X, Yang C, Liu L *et al* (2001). High levels of HER-2 expression alter the ability of epidermal growth factor receptor (EGFR) family tyrosine kinase inhibitors to inhibit EGFR phosphorylation in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**: 4230-4238.

Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A *et al* (2005). Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**: 1803-1810.

Citri A, Yarden Y (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 505-516.

Cox LS, Lane DP (1995). Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **17**: 501-508.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A *et al* (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **351**: 337-345.

Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B *et al* (2010). Colorectal cancer. *Lancet* **375**: 1030-1047.

Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, Green M, Lovell DP, Topham C *et al* (2006). Coexpression of the IGF-IR, EGFR and HER-2 is common in colorectal cancer patients. *International journal of oncology* **28**: 329-335.

Cunningham MP, Thomas H, Marks C, Green M, Fan Z, Modjtahedi H (2008). Co-targeting the EGFR and IGF-IR with anti-EGFR monoclonal antibody ICR62 and the IGF-IR tyrosine kinase inhibitor NVP-AEW541 in colorectal cancer cells. *International journal of oncology* **33**: 1107-1113.

Dalerba P, Guiducci C, Poliani PL, Cifola I, Parenza M, Frattini M *et al* (2005). Reconstitution of human telomerase reverse transcriptase expression rescues colorectal carcinoma cells from in vitro senescence: evidence against immortality as a constitutive trait of tumor cells. *Cancer research* **65**: 2321-2329.

Dangles-Marie V, Pocard M, Richon S, Weiswald LB, Assayag F, Saulnier P *et al* (2007). Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer research* **67**: 398-407.

Daud AI, Krishnamurthi SS, Saleh MN, Gitlitz BJ, Borad MJ, Gold PJ *et al* (2012). Phase I study of bosutinib, a src/abl tyrosine kinase inhibitor, administered to patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**: 1092-1100.

DeAngelis T, Ferber A, Baserga R (1995). Insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet-derived growth factor receptor. *Journal of cellular physiology* **164**: 214-221.

Debucquoy A, Machiels JP, McBride WH, Haustermans K (2010). Integration of epidermal growth factor receptor inhibitors with preoperative chemoradiation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**: 2709-2714.

Dehm SM, Bonham K (2004). SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **82**: 263-274.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P *et al* (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 5705-5712.

Dingemans AM, Mellema WW, Groen HJ, van Wijk A, Burgers SA, Kunst PW *et al* (2013). A Phase II Study of Sorafenib in Patients with Platinum-Pretreated, Advanced (Stage IIIb or IV) Non-Small Cell Lung Cancer with a KRAS Mutation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**: 743-751.

Dong J, Sereno A, Aivazian D, Langley E, Miller BR, Snyder WB *et al* (2011). A stable IgG-like bispecific antibody targeting the epidermal growth factor receptor and the type I insulin-like growth factor receptor demonstrates superior anti-tumor activity. *mAbs* **3**: 273-288.

Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M *et al* (2010). Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 4697-4705.

Dutta PR, Maity A (2007). Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer letters* **254**: 165-177.

Erben P, Horisberger K, Muessle B, Muller MC, Treschl A, Ernst T *et al* (2008). mRNA expression of platelet-derived growth factor receptor-beta and C-KIT: correlation with pathologic response to cetuximab-based chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **72**: 1544-1550.

Frame MC (2004). Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *Journal of cell science* **117**: 989-998.

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M *et al* (2007). PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *British journal of cancer* **97**: 1139-1145.

Furuta T, Sakai T, Senga T, Osawa T, Kubo K, Shimizu T *et al* (2006). Identification of potent and selective inhibitors of PDGF receptor autophosphorylation. *Journal of medicinal chemistry* **49**: 2186-2192.

Gaedcke J, Grade M, Jung K, Schirmer M, Jo P, Obermeyer C *et al* (2010). KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **94**: 76-81.

Gangadhar TC, Clark JI, Karrison T, Gajewski TF (2012). Phase II study of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) in metastatic melanoma. *Investigational new drugs*.

George D (2003). Targeting PDGF receptors in cancer--rationales and proof of concept clinical trials. *Advances in experimental medicine and biology* **532**: 141-151.

Gharibi B, Ghuman MS, Hughes FJ (2012). Akt- and Erk-mediated regulation of proliferation and differentiation during PDGFRbeta-induced MSC self-renewal. *Journal of cellular and molecular medicine* **16**: 2789-2801.

Gibson PR, Rosella O, Wilson AJ, Mariadason JM, Rickard K, Byron K *et al* (1999). Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. *Carcinogenesis* **20**: 539-544.

Glaser KB, Li J, Marcotte PA, Magoc TJ, Guo J, Reuter DR *et al* (2012). Preclinical characterization of ABT-348, a kinase inhibitor targeting the aurora, vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor, and Src kinase families. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **343**: 617-627.

Goranova TE, Ohue M, Shimoharu Y, Kato K (2011). Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clinical & experimental metastasis* **28**: 427-435.

Grade M, Wolff HA, Gaedcke J, Ghadimi BM (2012). The molecular basis of chemoradiosensitivity in rectal cancer: implications for personalized therapies. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* **397**: 543-555.

Grothey A, Allegra C (2012). Antiangiogenesis therapy in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Therapeutic advances in medical oncology* **4**: 301-319.

Gucalp A, Sparano JA, Caravelli J, Santamauro J, Patil S, Abbruzzi A *et al* (2011). Phase II trial of saracatinib (AZD0530), an oral SRC-inhibitor for the treatment of patients with hormone receptor-negative metastatic breast cancer. *Clinical breast cancer* **11**: 306-311.

Hakam A, Yeatman TJ, Lu L, Mora L, Marcet G, Nicosia SV *et al* (1999). Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer. *Human pathology* **30**: 1128-1133.

- Hammerman PS, Janne PA, Johnson BE (2009). Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 7502-7509.
- Han R, Yang YM, Dietrich J, Luebke A, Mayer-Proschel M, Noble M (2008). Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the central nervous system. *Journal of biology* **7**: 12.
- Harris AL, Nicholson S, Sainsbury JR, Farndon J, Wright C (1989). Epidermal growth factor receptors in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu. *Journal of steroid biochemistry* **34**: 123-131.
- Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA (2002). Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Human pathology* **33**: 484-495.
- Heldin CH, Westermark B (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews* **79**: 1283-1316.
- Hemming AW, Davis NL, Klufftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B *et al* (1992). Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *Journal of surgical oncology* **51**: 147-152.
- Hikita T, Oneyama C, Okada M (2010). Purvalanol A, a CDK inhibitor, effectively suppresses Src-mediated transformation by inhibiting both CDKs and c-Src. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **15**: 1051-1062.
- Hines SJ, Litz JS, Krystal GW (1999). Coexpression of c-kit and stem cell factor in breast cancer results in enhanced sensitivity to members of the EGF family of growth factors. *Breast cancer research and treatment* **58**: 1-10.
- Hu YP, Patil SB, Panasiwicz M, Li W, Hauser J, Humphrey LE *et al* (2008). Heterogeneity of receptor function in colon carcinoma cells determined by cross-talk between type I insulin-like growth factor receptor and epidermal growth factor receptor. *Cancer research* **68**: 8004-8013.
- Huang SM, Bock JM, Harari PM (1999). Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer research* **59**: 1935-1940.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W *et al* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **350**: 2335-2342.

Ito T, Okusaka T, Nishida T, Yamao K, Igarashi H, Morizane C *et al* (2012). Phase II study of sunitinib in Japanese patients with unresectable or metastatic, well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumor. *Investigational new drugs*.

Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, Hatashita E, Yamada Y, Fukuoka M *et al* (2009). Inhibition of insulin-like growth factor 1 receptor by CP-751,871 radiosensitizes non-small cell lung cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 5117-5125.

Jain A, Penuel E, Mink S, Schmidt J, Hodge A, Favero K *et al* (2010). HER kinase axis receptor dimer partner switching occurs in response to EGFR tyrosine kinase inhibition despite failure to block cellular proliferation. *Cancer research* **70**: 1989-1999.

Jain RK (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine* **9**: 685-693.

Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS *et al* (2008). PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer research* **68**: 1953-1961.

Jones HE, Goddard L, Gee JM, Hiscox S, Rubini M, Barrow D *et al* (2004). Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocrine-related cancer* **11**: 793-814.

Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalberg JR, Tu D, Au HJ *et al* (2007). Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **357**: 2040-2048.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC *et al* (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **359**: 1757-1765.

Katz D, Ito E, Liu FF (2009). On the path to seeking novel radiosensitizers. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **73**: 988-996.

Kaulfuss S, Burfeind P, Gaedcke J, Scharf JG (2009). Dual silencing of insulin-like growth factor-I receptor and epidermal growth factor receptor in colorectal cancer cells is associated with decreased proliferation and enhanced apoptosis. *Molecular cancer therapeutics* **8**: 821-833.

Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S *et al* (2007). Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**: 3230-3237.

Kim SJ, Uehara H, Yazici S, He J, Langley RR, Mathew P *et al* (2005). Modulation of bone microenvironment with zoledronate enhances the therapeutic effects of STI571 and paclitaxel against experimental bone metastasis of human prostate cancer. *Cancer research* **65**: 3707-3715.

Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, Hamilton SR *et al* (2006). Expression of activated platelet-derived growth factor receptor in stromal cells of human colon carcinomas is associated with metastatic potential. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **119**: 2567-2574.

Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA (1992). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine reviews* **13**: 3-17.

Kopetz S, Lesslie DP, Dallas NA, Park SI, Johnson M, Parikh NU *et al* (2009). Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer research* **69**: 3842-3849.

Krishnan H, Miller WT, Goldberg GS (2012). SRC points the way to biomarkers and chemotherapeutic targets. *Genes & cancer* **3**: 426-435.

Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL (2009). Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **74**: 673-688.

Kuwai T, Nakamura T, Kim SJ, Sasaki T, Kitadai Y, Langley RR *et al* (2008). Intratumoral heterogeneity for expression of tyrosine kinase growth factor receptors in human colon cancer surgical specimens and orthotopic tumors. *The American journal of pathology* **172**: 358-366.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC *et al* (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**: 580-584.

Lieu C, Kopetz S (2010). The SRC family of protein tyrosine kinases: a new and promising target for colorectal cancer therapy. *Clinical colorectal cancer* **9**: 89-94.

Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E *et al* (2008). KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 374-379.

Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P *et al* (2008). Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-

targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *The lancet oncology* **9**: 962-972.

Lindmark G, Sundberg C, Glimelius B, Pahlman L, Rubin K, Gerdin B (1993). Stromal expression of platelet-derived growth factor beta-receptor and platelet-derived growth factor B-chain in colorectal cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **69**: 682-689.

Liotta LA, Kohn EC (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**: 375-379.

Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z (2000). Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *British journal of cancer* **82**: 1991-1999.

Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M (2001). Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *Journal of the National Cancer Institute* **93**: 1852-1857.

Lu Y, Li X, Liang K, Luwor R, Siddik ZH, Mills GB *et al* (2007). Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer research* **67**: 8240-8247.

Maa MC, Leu TH, McCarley DJ, Schatzman RC, Parsons SJ (1995). Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 6981-6985.

Mackay HJ, Au HJ, McWhirter E, Alcindor T, Jarvi A, MacAlpine K *et al* (2012). A phase II trial of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) in patients with metastatic or locally advanced gastric or gastro esophageal junction (GEJ) adenocarcinoma: a trial of the PMH phase II consortium. *Investigational new drugs* **30**: 1158-1163.

Malaguarnera R, Belfiore A (2011). The insulin receptor: a new target for cancer therapy. *Frontiers in endocrinology* **2**: 93.

Malumbres M, Barbacid M (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews Cancer* **3**: 459-465.

Mamidipudi V, Dhillon NK, Parman T, Miller LD, Lee KC, Cartwright CA (2007). RACK1 inhibits colonic cell growth by regulating Src activity at cell cycle checkpoints. *Oncogene* **26**: 2914-2924.

Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T *et al* (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *The Journal of clinical investigation* **116**: 2610-2621.

Marcotte R, Smith HW, Sanguin-Gendreau V, McDonough RV, Muller WJ (2012). Mammary epithelial-specific disruption of c-Src impairs cell cycle progression and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 2808-2813.

Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C *et al* (2003). Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer research* **63**: 8791-8812.

Matsumoto F, Valdecanas DN, Mason KA, Milas L, Ang KK, Raju U (2012). The impact of timing of EGFR and IGF-1R inhibition for sensitizing head and neck cancer to radiation. *Anticancer research* **32**: 3029-3035.

Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* **71**: 2454-2460.

McCarty MF, Somcio RJ, Stoeltzing O, Wey J, Fan F, Liu W *et al* (2007). Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content. *The Journal of clinical investigation* **117**: 2114-2122.

Minsky BD (2009). Is preoperative chemoradiotherapy still the treatment of choice for rectal cancer? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 5115-5116.

Moasser MM, Srethapakdi M, Sachar KS, Kraker AJ, Rosen N (1999). Inhibition of Src kinases by a selective tyrosine kinase inhibitor causes mitotic arrest. *Cancer research* **59**: 6145-6152.

Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M *et al* (2012). Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nature medicine* **18**: 221-223.

Morgillo F, Woo JK, Kim ES, Hong WK, Lee HY (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer research* **66**: 10100-10111.

Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, Arnold L, Boman B, Cunningham A *et al* (1997). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer research* **57**: 4838-4848.

Mueller MM, Fusenig NE (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews Cancer* **4**: 839-849.

Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer research* **65**: 11118-11128.

Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ (2006). Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature clinical practice Oncology* **3**: 269-280.

Nigg EA (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **17**: 471-480.

Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Miwa A, Tasaka T, Kuwayama Y *et al* (2008). Ki11502, a novel multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor, induces growth arrest and apoptosis of human leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* **111**: 5086-5092.

Novosyadlyy R, Dudas J, Pannem R, Ramadori G, Scharf JG (2006). Crosstalk between PDGF and IGF-I receptors in rat liver myofibroblasts: implication for liver fibrogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **86**: 710-723.

Oikonomou E, Kothonidis K, Taoufik E, Probert E, Zografos G, Nasioulas G *et al* (2007). Newly established tumourigenic primary human colon cancer cell lines are sensitive to TRAIL-induced apoptosis in vitro and in vivo. *British journal of cancer* **97**: 73-84.

Park YH, Seo SY, Ha M, Ku JH, Kim HH, Kwak C (2011). Inhibition of prostate cancer using RNA interference-directed knockdown of platelet-derived growth factor receptor. *Urology* **77**: 1509 e1509-1515.

Perrone F, Da Riva L, Orsenigo M, Losa M, Jocolle G, Millefanti C *et al* (2009). PDGFRA, PDGFRB, EGFR, and downstream signaling activation in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Neuro-oncology* **11**: 725-736.

Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ *et al* (1999). Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **5**: 257-265.

Pollak MN (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Foundation symposium* **262**: 84-98; discussion 98-107, 265-108.

Popat S, Hubner R, Houlston RS (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**: 609-618.

Poston GJ, Figueras J, Giuliante F, Nuzzo G, Sobrero AF, Gigot JF *et al* (2008). Urgent need for a new staging system in advanced colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 4828-4833.

Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ (2002). Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**: 994-1003.

Puthillath A, Patel A, Fakih MG (2009). Targeted therapies in the management of colorectal carcinoma: role of bevacizumab. *OncoTargets and therapy* **2**: 1-15.

Radinsky R, Fidler IJ (1992). Regulation of tumor cell growth at organ-specific metastases. *In Vivo* **6**: 325-331.

Ramalingam SS, Spigel DR, Chen D, Steins MB, Engelman JA, Schneider CP *et al* (2011). Randomized phase II study of erlotinib in combination with placebo or R1507, a monoclonal antibody to insulin-like growth factor-1 receptor, for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**: 4574-4580.

Reed JC, Reed SI (1999). Survivin' cell-separation anxiety. *Nature cell biology* **1**: E199-200.

Reinmuth N, Fan F, Liu W, Parikh AA, Stoeltzing O, Jung YD *et al* (2002). Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **82**: 1377-1389.

Reiss K, Ferber A, Travali S, Porcu P, Phillips PD, Baserga R (1991). The protooncogene c-myc increases the expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor messenger RNAs by a transcriptional mechanism. *Cancer research* **51**: 5997-6000.

Riedemann J, Takiguchi M, Sohail M, Macaulay VM (2007). The EGF receptor interacts with the type 1 IGF receptor and regulates its stability. *Biochemical and biophysical research communications* **355**: 707-714.

Rieder CL (2011). Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **19**: 291-306.

Roberts WG, Whalen PM, Soderstrom E, Moraski G, Lyssikatos JP, Wang HF *et al* (2005). Antiangiogenic and antitumor activity of a selective PDGFR tyrosine kinase inhibitor, CP-673,451. *Cancer research* **65**: 957-966.

Rodel C, Hofheinz R, Liersch T (2012). Rectal cancer: state of the art in 2012. *Current opinion in oncology* **24**: 441-447.

Roskoski R, Jr. (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **338**: 1307-1315.

Roudabush FL, Pierce KL, Maudsley S, Khan KD, Luttrell LM (2000). Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells. *The Journal of biological chemistry* **275**: 22583-22589.

Rougier P, Mitry E (2003). Epidemiology, treatment and chemoprevention in colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **14 Suppl 2**: ii3-5.

Sachdev D, Yee D (2007). Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics* **6**: 1-12.

Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ (2004). Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**: 1201-1208.

Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine reviews* **28**: 20-47.

Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P *et al* (2009a). Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PloS one* **4**: e7287.

Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S *et al* (2009b). PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer research* **69**: 1851-1857.

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE *et al* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**: 262-265.

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R *et al* (2004). Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England journal of medicine* **351**: 1731-1740.

Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R *et al* (2008). [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **46**: 799-840.

Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE (2007). The chemoradiation paradigm in head and neck cancer. *Nature clinical practice Oncology* **4**: 156-171.

Sen B, Johnson FM (2011). Regulation of SRC family kinases in human cancers. *Journal of signal transduction* **2011**: 865819.

Shim AH, Liu H, Focia PJ, Chen X, Lin PC, He X (2010). Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 11307-11312.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012). Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **62**: 10-29.

Sikarwar AP, Reddy KV (2008). siRNA-mediated silencing of c-kit in mouse primary spermatogonial cells induces cell cycle arrest. *Oligonucleotides* **18**: 145-160.

Simak R, Capodiceci P, Cohen DW, Fair WR, Scher H, Melamed J *et al* (2000). Expression of c-kit and kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues. *Histology and histopathology* **15**: 365-374.

Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP *et al* (2008). EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 2311-2319.

Song L, Turkson J, Karras JG, Jove R, Haura EB (2003). Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene* **22**: 4150-4165.

Song S, Ewald AJ, Stallcup W, Werb Z, Bergers G (2005). PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nature cell biology* **7**: 870-879.

Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R *et al* (2005). Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **16**: 102-108.

Spitzner M, Emons G, Kramer F, Gaedcke J, Rave-Frank M, Scharf JG *et al* (2010). A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **78**: 1184-1192.

Steel GG, Peckham MJ (1979). Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **5**: 85-91.

Steel GG, Peacock JH (1989). Why are some human tumours more radiosensitive than others? *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **15**: 63-72.

Stiewe T (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature reviews Cancer* **7**: 165-168.

Stover DR, Becker M, Liebetanz J, Lydon NB (1995). Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. *The Journal of biological chemistry* **270**: 15591-15597.

Summy JM, Gallick GE (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews* **22**: 337-358.

Sundberg C, Ljungstrom M, Lindmark G, Gerdin B, Rubin K (1993). Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *The American journal of pathology* **143**: 1377-1388.

Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, Deutsch E (2007). Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nature clinical practice Oncology* **4**: 591-602.

Tateishi M, Ishida T, Kohdono S, Hamatake M, Fukuyama Y, Sugimachi K (1994). Prognostic influence of the co-expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein in human lung adenocarcinoma. *Surgical oncology* **3**: 109-113.

Tejpar S, Saridaki Z, Delorenzi M, Bosman F, Roth AD (2011). Microsatellite instability, prognosis and drug sensitivity of stage II and III colorectal cancer: more complexity to the puzzle. *Journal of the National Cancer Institute* **103**: 841-844.

Termuhlen PM, Curley SA, Talamonti MS, Saboorian MH, Gallick GE (1993). Site-specific differences in pp60c-src activity in human colorectal metastases. *The Journal of surgical research* **54**: 293-298.

Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, Parsons SJ (1999). Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 1415-1420.

Tonra JR, Corcoran E, Deevi DS, Steiner P, Kearney J, Li H *et al* (2009). Prioritization of EGFR/IGF-IR/VEGFR2 combination targeted therapies utilizing cancer models. *Anticancer research* **29**: 1999-2007.

Turner AM, Zsebo KM, Martin F, Jacobsen FW, Bennett LG, Broudy VC (1992). Nonhematopoietic tumor cell lines express stem cell factor and display c-kit receptors. *Blood* **80**: 374-381.

Uberall I, Kolar Z, Trojanec R, Berkovcova J, Hajduch M (2008). The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Experimental and molecular pathology* **84**: 79-89.

Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C *et al* (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal* **5**: 2503-2512.

Ullrich A, Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.

Valenciano A, Henriquez-Hernandez LA, Moreno M, Lloret M, Lara PC (2012). Role of IGF-1 receptor in radiation response. *Translational oncology* **5**: 1-9.

Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B *et al* (2007). Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**: 1658-1664.

Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A *et al* (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **360**: 1408-1417.

Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Hockel M (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer research* **51**: 3316-3322.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation* **36**: 131-149.

Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T *et al* (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature cell biology* **12**: 468-476.

Vigneron A, Roninson IB, Gamelin E, Coqueret O (2005). Src inhibits adriamycin-induced senescence and G2 checkpoint arrest by blocking the induction of p21waf1. *Cancer research* **65**: 8927-8935.

Wang D, Patil S, Li W, Humphrey LE, Brattain MG, Howell GM (2002). Activation of the TGF α autocrine loop is downstream of IGF-I receptor activation during mitogenesis in growth factor dependent human colon carcinoma cells. *Oncogene* **21**: 2785-2796.

Watanabe T, Ohtani T, Aihara M, Ishiuchi S (2013). Enhanced antitumor effect of YM872 and AG1296 combination treatment on human glioblastoma xenograft models. *Journal of neurosurgery*.

Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *The Biochemical journal* **326 (Pt 1)**: 61-68.

Weichselbaum RR, Little JB (1982). Radioresistance in some human tumor cells conferred in vitro by repair of potentially lethal X-ray damage. *Radiology* **145**: 511-513.

Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S *et al* (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* **27**: 3944-3956.

Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ *et al* (1990). Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* **63**: 167-174.

Wolff HA, Daldrup B, Jung K, Overbeck T, Hennies S, Matthias C *et al* (2011). High-grade acute organ toxicity as positive prognostic factor in adjuvant radiation and chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *Radiology* **258**: 864-871.

- Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J (1995). Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *The Journal of clinical investigation* **95**: 1897-1905.
- Wu X, Rubin M, Fan Z, DeBlasio T, Soos T, Koff A *et al* (1996). Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* **12**: 1397-1403.
- Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D (2002). Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer research* **62**: 1030-1035.
- Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Buchler M, Beger HG, Korc M (1993). Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer research* **13**: 565-569.
- Yao H, Song E, Chen J, Hamar P (2004). Expression of FAP-1 by human colon adenocarcinoma: implication for resistance against Fas-mediated apoptosis in cancer. *British journal of cancer* **91**: 1718-1725.
- Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ *et al* (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO journal* **6**: 3341-3351.
- Yarden Y, Ullrich A (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annual review of biochemistry* **57**: 443-478.
- Yarden Y (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S3-8.
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 127-137.
- Yasuda A, Sawai H, Takahashi H, Ochi N, Matsuo Y, Funahashi H *et al* (2007). Stem cell factor/c-kit receptor signaling enhances the proliferation and invasion of colorectal cancer cells through the PI3K/Akt pathway. *Digestive diseases and sciences* **52**: 2292-2300.
- Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP *et al* (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**: 406-410.
- Yokoi K, Sasaki T, Bucana CD, Fan D, Baker CH, Kitadai Y *et al* (2005). Simultaneous inhibition of EGFR, VEGFR, and platelet-derived growth factor receptor signaling combined with gemcitabine produces therapy of human pancreatic carcinoma and prolongs survival in an orthotopic nude mouse model. *Cancer research* **65**: 10371-10380.

Yu J, Liu XW, Kim HR (2003). Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor-alpha-activated c-Jun NH2-terminal kinase-1 is critical for PDGF-induced p21WAF1/CIP1 promoter activity independent of p53. *The Journal of biological chemistry* **278**: 49582-49588.

Zaider M, Hanin L (2011). Tumor control probability in radiation treatment. *Medical physics* **38**: 574-583.

7 Anhang

Auflistung der erhaltenen Gewebeproben und deren Verwendung. Die erhaltenen Gewebeproben wurden enzymatisch oder mechanisch aufgearbeitet und anschließend direkt kultiviert bzw. subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert. In der Tabelle ist für jede erhaltene Probe dargestellt, auf welche Weise die Aufarbeitung erfolgte, und ob das Material direkt kultiviert bzw. injiziert wurde. Weiterhin sind die Erfolge in Zellkultur und Injektion dokumentiert. **P-Nr.:** anonymisierte Patienten-Nr. der Biopsie, **Enz:** enzymatische Aufarbeitung, **Mech:** mechanische Aufarbeitung, **RZC:** Rattenschwanzcollagen, **FN:** Fibronektin, **IrEZM:** lamininreiche extrazelluläre Matrix, **NEAA:** *nonessential amino acids*, **kon. Medium:** konditioniertes Medium.

P-Nr.	Aufarbeitung		Plattenbeschichtung				Zellkultur			Injektion in eine Maus				Überlebenszeit in Wochen
	Enz	Mech	ohne	RZC	FN	IrEZM	Besonderheiten	angewachsen	kultivierbar	injiziert	Linie	IrEZM	Tumor	
310	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X	JA	SCID		JA	27,1
311	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X	JA	SCID		X	6,0
313	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X	JA	SCID		X	5,7
312	JA	JA	JA	X	X	X	z.T. 20%FKS	X	X	X				
325	X	JA	JA	X	X	X	z.T. 20%FKS	X	X	JA	SCID		X	30,0
326	JA	JA	JA	X	X	X	z.T. 20%FKS	X	X	JA	SCID		X	19,6
327	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	SCID		X	18,6
328	JA	X	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	SCID		X	7,9
330	JA	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
331	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	JA	SCID		X	27,0
332	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
334	JA	JA	JA	JA	X	X	z.T. 20%FKS	JA	X	X				
335	X	JA	X	JA	JA	X	z.T. 20%FKS	X	X	X				
336	JA	JA	JA	JA	JA	X	z.T. 20%FKS	JA	X	X				
337	JA	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X				
SCID1	JA	JA	JA	JA	JA	X	X	JA	JA	JA	SCID		JA	27,0
341	JA	X	JA	JA	JA	X	z.T. + NEAA	JA	X	JA	SCID		X	11,6
344	JA	JA	JA	JA	JA	X	z.T. + NEAA	X	X	JA	SCID		X	6,1
346	X	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X				
347	X	JA	JA	JA	JA	X	z.T. + NEAA	X	X	X				
348	JA	JA	JA	JA	JA	X	z.T. + NEAA	X	X	JA	SCID		X	45,9
350	JA	X	JA	JA	JA	X	X	X	X	JA	SCID		X	4,6
351	JA	X	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	SCID		X	6,3
352	JA	JA	JA	JA	X	X	z.T. kon. Medium	X	X	JA	SCID		X	43,0
355	JA	X	JA	JA	X	X	z.T. kon. Medium	X	X	JA	SCID		X	39,0
T1	JA	JA	JA	JA	JA	X	z.T. kon. Medium	JA	JA	JA	SCID		X	50,0
357	JA	JA	X	JA	JA	X	X	X	X	JA	SCID		X	52,6
360	JA	JA	X	JA	JA	X	X	X	X	JA	Beige		X	11,0
361	JA	JA	X	JA	JA	X	z.T. kon. Medium	X	X	JA	Beige		X	48,0
SCID1.2	JA	JA	JA	JA	JA	X	X	JA	JA	JA	Beige		X	8,1
T2	JA	JA	JA	JA	JA	X	X	JA	JA	JA	Beige		X	59,0
T3	JA	JA	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	Beige	JA	X	9,9
T4	JA	JA	JA	JA	JA	JA	X	JA	X	JA	Beige	JA	X	15,1
364	JA	JA	JA	JA	X	X	z.T. kon. Medium	X	X	JA	Beige	JA	X	42,0
365	JA	X	JA	JA	X	X	z.T. kon. Medium	JA	X	X				
366	X	JA	JA	JA	X	JA	X	X	X	JA	Beige	JA	X	45,9
T5	JA	JA	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	Beige	JA	X	28,9
367	X	JA	JA	X	X	JA	X	JA	X	X				
368	X	JA	JA	X	X	JA	X	X	X	X				
369	X	JA	JA	X	X	X	X	JA	X	X				
370	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X	X				
371	JA	X	JA	X	X	X	X	X	X	JA	Beige		X	80,9
T6	JA	JA	JA	JA	JA	JA	X	JA	JA	X				
372	X	JA	JA	X	X	JA	X	X	X	X				
T7	JA	JA	JA	JA	JA	JA	X	JA	X	X				
37	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X	X				
T8	JA	JA	JA	JA	JA	JA	X	JA	JA	X				
377	X	JA	JA	JA	X	X	z.T. 20%FKS	X	X	X				
378	X	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
379	X	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
380	X	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	X				
382	X	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	JA	Beige	JA	X	25,9
384	X	JA	JA	JA	X	X	z.T. 20%FKS	X	X	JA	Beige	JA	X	13,6
385	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	Beige	JA	X	40,4
T9	JA	JA	JA	JA	JA	JA	X	JA	X	JA	Beige	JA	X	33,6
386	X	JA	JA	JA	X	X	z.T. 20%FKS	JA	X	JA	Beige	JA	X	65,4
Scid1	JA	X	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	Beige	JA	X	15,0
387	JA	X	JA	JA	X	X	z.T. 20%FKS	X	X	JA	Beige	JA	X	12,6
388	X	JA	JA	X	X	JA	X	X	X	JA	Beige	JA	X	64,0
391	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X	X				

393	X	JA	JA	X	X	X	X	JA	X	X				
397	X	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	Beige	nein	X	7,4
398	JA	JA	JA	JA	X	JA	X	X	X	JA	Beige	JA	X	5,0
399	JA	JA	JA	JA	X	JA	X	X	X	JA	Beige	JA	X	54,1
1200	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X	X				
1001	X	JA	JA	JA	X	JA	X	X	X	X				
1201	X	JA	JA	X	X	X	X	JA	X	X				
1202	X	JA	JA	JA	X	JA	X	X	X	X				
1203	X	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
1205	X	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	X				
1208	X	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	X				
1209	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X	JA	Beige	JA	X	9,9
1210	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X	JA	Beige	JA	X	3,3
1213	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	JA	Rag1	JA	X	58,0
1214	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X	JA	Rag1	JA	X	58,9
1216	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X	X				
1218	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	JA	Rag1	JA	X	55,4
1219	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	JA	Rag1	JA	X	2,9
1220	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	X				
1221	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
1227	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
1228	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	JA	NUDE	JA	X	2,7
1229	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	NUDE	JA	X	
1228 re	JA	JA	JA	JA	X	X	X	JA	X	JA	NUDE	JA	X	
1230	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	SCID	JA	X	
1231	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	NUDE	JA	X	
1327	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	NUDE	JA	X	
1232	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X	JA	NUDE	JA	X	7,2x5,4li
1233	JA	X	JA	X	X	X	X	X	X	JA	NUDE	JA	X	
1237	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	NUDE	JA	X	
1238	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	JA	NUDE	JA	X	
NN	JA	X	JA	X	X	X	X	X	X	X				
NN	JA	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
1356	X	JA	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
NN	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X	X				
NN	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X	X				
NN	JA	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X				
NN	JA	X	JA	JA	X	X	X	X	X	X				

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Engel für die Betreuung meiner Arbeit, für seine hilfreichen Anregungen sowie die Durchsicht meiner Manuskripte bedanken.

Frau Prof. Dr. Hoyer-Fender möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Peter Burfeind für die Möglichkeit meine Arbeit in der Laborgemeinschaft 311/312, sowie seit Neuestem 307, anfertigen zu können. Außerdem bedanke ich mich für den freundschaftlichen Umgang, viele interessante Gespräche und nächtliche Schneeballschlachten.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Silke Kauffuß, für ihre unermüdliche Hilfe bei der Versuchsplanung, bei der Lösung von Problemen sowie bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne ihre Unterstützung und ausdauernden Korrekturbemühungen wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Desweiteren möchte ich mich auch für das freundschaftliche Verhältnis bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ralf Dressel und Dr. Peter Middel für die Zusammenarbeit und die Hilfe während dieser Arbeit.

Bei allen meinen Kollegen aus den Laboren 307, 311 und 312 möchte ich mich für die schöne Zeit, die tolle Arbeitsatmosphäre und den guten Umgang auch außerhalb des Labors bedanken. Die schöne Zeit die ich mit euch verbringen durfte werde ich immer in guter Erinnerung behalten.

Besonderer Dank gilt Rovena für den vielen Spaß, gute Gespräche und die unendliche Geduld bei der Beantwortung von Fragen schon seit der Diplomarbeit. Auch für ihre Geduld bei dem von mir verbreiteten Chaos möchte ich mich bedanken.

Britta danke ich für ihre großartige Unterstützung (auch mal nach Feierabend) und ihre unerschütterliche gute Laune.

Daria möchte ich für die vielen tollen Raucherpausen, Gespräche, Dr.-Feiern und Hilfe in allen Lebenslagen danken.

Julia danke ich für ihren unermüdlichen Arbeitswillen, die vielen guten Ergebnisse und den freundschaftlichen Umgang.

Lisa danke ich für die lustige Zeit und all die Klonierungen, die ohne ihre Hilfe wohl immer noch nicht fertig wären.

Nicole möchte ich besonders für die große Unterstützung bei der Anfertigung der Gewebeschnitte danken.

Rabär danke ich für ihre unendliche Fröhlichkeit und der guten Laune die sie in unserer Arbeitsgruppe verbreitet hat.

Sascha danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und den guten Umgang miteinander.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik.

Bei Markus und Basti bedanke ich mich für die bestmögliche Einführung in das Studentendasein und die weitere Hilfe und Freundschaft.

Auch bei allen meinen anderen Freunden bedanke ich mich für die schöne Zeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Eva. Ihre Unterstützung und ihr Beistand auch in schwierigen Zeiten haben dafür gesorgt, dass ich die Kraft gefunden habe diese Arbeit fertig zu stellen. Danke!

Ich danke meiner Familie und besonders meinen Eltern für die große Unterstützung, die Ermöglichung meines Studiums und die Hilfe in allen Lebenslagen.