

**Relevanz von Antagonisten des Epidermal Growth Factor
Receptor und der Mesenchymal-Epithelial Transition Kinase
in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Sami Sebastian Khaznadar

aus Dessau-Roßlau

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Christian Schmitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Albert Wenzel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.08.2023

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Innere Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Deutsche Zusammenfassung	7
1.1 Einleitung	7
1.1.1 Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC)	7
1.1.2 Pathomechanismen	10
1.1.3 Rezeptortyrosinkinasen als therapeutische Zielstrukturen	11
1.1.4 Notwendigkeit prädiktiver Biomarker	13
1.1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
1.2 Material und Methoden	16
1.2.1 Material, Laborgeräte, Puffer, Solutions	16
1.2.2 HNSCC-Gewebeproben und Eigenschaften der Spender	17
1.2.3 Immunhistochemie (IHC)	20
1.2.4 Meso Scale Discovery (MSD) Sandwich Immunassay	20
1.2.5 Zellkultur	21
1.2.6 Proliferationsexperimente	22
1.2.7 Statistische Auswertung	23
1.3 Ergebnisse	24
1.3.1 Proliferationsexperimente mit HNSCC- und Kontrollzelllinien	24
1.3.2 EGFR und MET in HNSCC- und Kontrollzelllinien	26
1.3.3 EGFR und MET in klinischen Tumorproben	31
1.3.4 Korrelation von EGFR und MET mit klinisch-pathologischen Parametern und Prognose	37

1.4	Diskussion	39
1.4.1	Expression von EGFR und MET in HNSCC-Tumoren und -Zelllinien	39
1.4.2	Aktivität von EGFR und MET in HNSCC-Tumoren und -Zelllinien	41
1.4.3	Prognostische Rolle von MET	46
1.4.4	Abschließende Bewertung der Fragestellungen	49
1.5	Zusammenfassung	52
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	53
2.	Veröffentlichung 1	68
	Abstract	68
	Introduction	68
	Material and Methods	75
	Results	69
	Discussion	73
	References	76
3.	Veröffentlichung 2	79
	Abstract	79
	Introduction	79
	Material and Methods	80
	Results	83
	Discussion	87
	References	88
4.	Danksagung	90
5.	Publikationen	91
	Anhang	92

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
Cis	Cisplatin
Cis/FU	Cisplatin / 5-Fluoruracil
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFR	epidermal growth factor receptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	fötale Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FU	5-Fluoruracil
HNSCC	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom
HPV	humane Papillomviren
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IHC	Immunhistochemie
LA	lokal fortgeschritten
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mCRC	metastasiertes kolorektales Karzinom
MET	mesenchymal-epithelial transition kinase
MSD	Mesoscale Discovery
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
ORR	objektive Ansprechrage
OS	Gesamtüberleben
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PFS	progressionsfreies Überleben

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RCT	Radiochemotherapie
R/M	rezidiert oder metastatisch
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCC	Plattenepithelkarzinome
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TMA	Tissue Microarray

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC)

Epitheliale Kopf- und Halstumore bilden eine anatomisch heterogene Gruppe von Krebserkrankungen. Mit Ausnahme von Haut- und Schilddrüsenkarzinomen handelt es sich bei 90 % der primären Neoplasien im Kopf- und Halsbereich um Plattenepithelkarzinome (squamous cell carcinoma, SCC), welche sich häufig aus den Schleimhautzellen der Nasen- und Mundhöhle, der paranasalen Sinus, des Pharynx oder des Larynx entwickeln (Argiris et al. 2008).

Mit einer globalen Inzidenz von rund 890.000 Fällen pro Jahr gelten Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich (HNSCCs) als die sechsthäufigste Krebsform. Jedes Jahr versterben rund 450.000 Patienten an den Folgen der Erkrankung, womit das HNSCC für 5 % aller weltweiten Todesfälle durch Tumorerkrankungen verantwortlich ist (Bray et al. 2018). Die 5-Jahres-Überlebensrate konnte über die letzten Jahrzehnte kaum verbessert werden und liegt zwischen 50-60 % (Ferlay et al. 2015; Ferlay et al. 2019; Pulte et al. 2010).

Als Risikofaktoren wurden neben einem hohen Lebensalter und genetischer Prädisposition in erster Linie Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten für die Entstehung des HNSCC verantwortlich gemacht (Fang et al. 2018; Guha et al. 2007; Velleuer und Dietrich 2014). Insbesondere der chronische Missbrauch von Alkohol und Tabak wurde kausal mit der Entstehung des HNSCC assoziiert (Machiels et al. 2020; van Oijen et al 1998). So weisen Raucher ein > zehnfach erhöhtes Risiko, in Synergismus mit Alkoholabusus sogar ein > 35-fach-erhöhtes Risiko für die Entwicklung gegenüber der Normalbevölkerung auf (Blot et al. 1988; Jethwa et al. 2017).

In den letzten Jahren wurden zudem vermehrt chronisch-virale Infektionen als Ursache für deutliche Inzidenzanstiege in bestimmten anatomischen Subgruppen ausgemacht. Während das Epstein-Barr-Virus (EBV) eine Assoziation zum SCC des Nasopharynx zeigte, wurden Hochrisiko-Typen Humaner Papillomaviren (HPV-16, HPV-18) mit SCC des Oropharynx assoziiert (Mahal et al. 2019; Tsang et al. 2020). Verschiedene Studien geben die Rate von durch HPV-Infektion verursachten Oropharynxkarzinomen mit 22-

65 % an (Castellsague et al. 2016; Stein et al. 2015a). HPV-assoziierte und HPV-negative Erkrankungen unterscheiden sich sowohl im Erkrankungsalter (medianes Lebensalter bei Diagnosestellung jeweils 53 und 66 Jahre) als auch bei der Prognose (3-Jahres-Überleben 82 % und 57 %) (Ang et al. 2010; Johnson et al. 2020).

Als Gründe für die schlechte Prognose insbesondere bei HPV-negativen Tumoren werden zwei Faktoren diskutiert. Einerseits liegt zum Diagnosezeitpunkt in über 60 % der Fälle bereits ein fortgeschrittenes Stadium vor. Andererseits erreichen nur weniger als die Hälfte der Patienten einen Zustand dauerhafter Remission. Neben dem häufigen Auftreten von Lokalrezidiven neigen behandelte Patienten mit einer Wahrscheinlichkeit von 3-7 % pro Jahr dazu, einen zweiten, unabhängigen Primärtumor in anatomischer Nachbarschaft auszubilden (Leemans et al. 2011). Dies wird dadurch erklärt, dass Tumorinseln in der Regel nicht punktuell entstehen, sondern auf dem Boden flächenhaft vortransformierter Zellfelder („field cancerization“) (Slaughter et al. 1953).

Die Therapie beim HNSCC folgt multimodalen Prinzipien und involviert je nach Tumorstadium, anatomischer Lage des Tumors, Performance Status, Alter und dem Patientenwunsch meist eine Kombination aus Strahlentherapie und operativen sowie medikamentösen Maßnahmen. In frühen Stadien, also bei einer Erkrankung ohne regionalen Lymphknotenbefall oder Fernmetastasierung, erfolgt entweder die chirurgische Tumorentfernung oder eine intensitätsmodulierte Radiotherapie. Ein Langzeitüberleben kann bei 70-80 % der Patienten erreicht werden (Pfister et al. 2014).

Bei rund 60 % aller Patienten ist die Erkrankung zum Behandlungsbeginn jedoch bereits lokal fortgeschritten (LA-HNSCC). Aus therapeutischer Sicht steht in dieser Situation insbesondere die Radiochemotherapie im Vordergrund, welcher je nach möglicher Operabilität eine chirurgische Resektion voraus gehen kann. Daten aus einer großen Metastudie (MACH-NC) konnten belegen, dass die Kombination von Chemo- und Radiotherapie die Prognose gegenüber rein lokaler Behandlung deutlich verbessert (Blanchard et al. 2016; Pignon et al. 2009). Hierbei kommen Zytostatika aus der Gruppe der Platinverbindungen, Cisplatin (Cis) oder Carboplatin, sowie der DNA-Antimetabolit 5-Fluoruracil (FU) zum Einsatz. Patienten, die für eine Zytostatikatherapie nicht in Frage kommen, können alternativ mit dem chimären monoklonalen Antikörper Cetuximab behandelt werden (Bonner et al. 2006). Cetuximab bindet an den epidermal growth factor

receptor (EGFR) und ist neben HNSCC auch zur Behandlung RAS-unmutierter kolorektaler Karzinome zugelassen (Cunningham et al. 2004).

Mehr als 65 % der HNSCC-Patienten entwickeln nach initialer Therapie Lokalrezidive oder tragen bereits zum Diagnosezeitpunkt Fernmetastasen (R/M HNSCC) (Argiris et al. 2008). Für diese Patienten werden in der Regel palliative Behandlungsziele angestrebt. Neben einer Therapie mit Zytostatika stellt für manche Patienten die gezielte Behandlung mit Biologicals eine Option dar. So verglich die EXTREME-Studie die dreifache Kombination aus Cetuximab, Cisplatin und 5-Fluoruracil mit dualer Zytostatikagabe von Cisplatin und 5-Fluoruracil (Cis/FU) (Vermorken et al. 2008). Die zusätzliche Gabe von Cetuximab führte neben einem verbesserten Therapieansprechen auch zu einer deutlichen Verlängerung des progressionsfreien sowie des Gesamtüberlebens. Die Studie gilt in der Behandlung des R/M HNSCC als wegweisend, da die so etablierte Kombinationstherapie bis vor kurzem zur ersten Wahl für nahezu alle Patienten wurde (Vermorken et al. 2008).

Das Verständnis um die Bedeutung der Fähigkeiten von Tumoren zur Immunevasion führte kürzlich zur Entwicklung und Zulassung von Checkpoint-Inhibitoren, monoklonalen Antikörpern gegen programmed death PD-1 oder seinem Ligand PD-L1, und revolutionierte die Behandlung von Tumorerkrankungen vieler Indikationen. Zusammengefasst kommt es durch Interaktion zwischen PD-L1-exprimierenden Tumorzellen und seinem Rezeptor auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten zur Hemmung der Immunantwort (Nishimura et al. 1998). Beim HNSCC führten die PD-1-Antagonisten Nivolumab und Pembrolizumab zu einer Verstärkung der T-Zell-Antwort und verbesserten die Prognose der Erkrankung (Cohen et al. 2019, Ferris et al. 2016). Im Rahmen der KEYNOTE-048-Studie zeigte die Kombination aus Chemotherapie und Pembrolizumab einen Überlebensvorteil gegenüber dem EXTREME-Schema beim R/M HNSCC (Burtness et al. 2019). Aus diesem Grund gilt der Einsatz von Pembrolizumab in Verbindung mit Cis/FU bei unbehandelten Patienten mit nachgewiesener PD-L1-Expression derzeit als Therapie der ersten Wahl (Machiels et al. 2020). Wurden bei einem Patienten innerhalb der vergangenen sechs Monate keine Platinverbindungen eingesetzt (Platin-naive), so wird heute in erster Linie eine Platin-basierte Systemtherapie in Kombination mit Pembrolizumab oder Cetuximab, je nach PD-L1-Status, empfohlen

(Machiels et al. 2020). Hingegen werden bei Platin-vorbehandelten Patienten anti-PD-1-Antikörper oder Cetuximab in Monotherapie eingesetzt. Entgegen den Erwartungen profitiert leider nur ein geringer Prozentsatz der Patienten von den Behandlungen. Es wird geschätzt, dass 80-90 % aller Patienten mit Rezidiven oder Metastasen entweder gar nicht oder nicht dauerhaft auf eine gezielte Therapie ansprechen (Chow et al. 2020). Aus diesem Grund liegt die Vertiefung des Verständnisses um molekulare Zusammenhänge weiterhin im Fokus der Forschung.

1.1.2 Pathomechanismen

Nach derzeitigem Kenntnisstand läuft die Karzinogenese in Fällen von nicht-HPV-assoziiertem HNSCC in einem mehrstufigen Prozess ab, welcher auch aus anderen Tumorindikationen bekannt ist. Nach diesem Modell häufen Tumorzellvorstufen sukzessive tumorfördernde Mutationen in Protoonko- und Tumorsuppressorgenen an und erlangen so schrittweise transformierte Eigenschaften (Leemans et al. 2011). Diese Eigenschaften werden auch als „hallmarks of cancer“ bezeichnet und involvieren gestörte intrazelluläre Signalabläufe. Neben den Fähigkeiten zur Immunevasion, der Induktion von Angiogenese und Apoptoseresistenz ist die Verschiebung der Balance zwischen proliferativen und antiproliferativen Signalen zugunsten der Zellteilung ein zentrales Element bei der Tumorgenese (Hanahan und Weinberg 2011).

Genomanalysen offenbarten den frühzeitigen Verlust tumorsuppressiver Mechanismen bei der Entwicklung vom HNSCC. In über 72 % der Tumoren wurden genetische Veränderungen in Regulatoren des Zellzyklus gefunden, welche Tumorzellen die Fähigkeit zur unkontrollierten DNA-Replikation verleihen (Leemans et al. 2011). Insbesondere *CDKN2A* (kodiert p16) und *TP53* (kodiert p53) oder der kurze Arm von Chromosom 17 (Genlocus p53) sind häufig verändert (Li et al 2020; Zhang et al. 2012).

Die Epithelial-mesenchymale Transition erlaubt Tumorzellen die Loslösung aus Epithelzellverbänden und ermöglicht damit invasives Wachstum und Metastasierung. Auch hier ergab die Sequenzierung von HNSCC-Proben Mutationen in Genen, welche in den Prozess der Zelldifferenzierung involviert sind. So wurden der Verlust von *FAT1* und *NOTCH1*, Gene welche in den WNT-/ β -Catenin-Signalweg involviert sind, sowie die

genetische Amplifikation von *TP63* (kodiert p63) mit der Entstehung des HNSCC in Verbindung gebracht (Lawrence et al. 2015; Porcheri et al. 2019; Solomon et al. 2018).

Der Hochregulierung proliferativer Signalwege kommt bei der Karzinogenese ebenfalls eine bedeutende Rolle zu. Mutationen in Protoonkogenen können dazu führen, dass Tumorzellen einen kontinuierlichen Wachstumsreiz erhalten. Beim HNSCC sind onkogene Treibermutationen weniger umfangreich beschrieben als in anderen Indikationen wie beispielsweise der Gruppe nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome (NSCLC) (Knebel et al. 2017; Pao und Girard 2011; Wang et al. 2019). Dennoch zeigten HNSCC-Sequenzierungsstudien genetische Veränderungen in den Signalwegen der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) sowie der Mitogen-activated protein kinase (MAPK) mit Mutationsfrequenzen von 31 % und 8 % (Lui et al. 2013). Solche Wege werden typischerweise von aktivierten Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie denen der ErbB-Familie zur intrazellulären Signaltransduktion genutzt (Le Page et al. 2005; She et al. 2005).

1.1.3 Rezeptortyrosinkinasen als therapeutische Zielstrukturen

Bei der ErbB-Familie (EGFR, HER2/neu, HER3 und HER4) handelt sich um eine Gruppe von Wachstumsfaktor-Rezeptoren vom Typ der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Sie bilden membranständige Proteine mit einer extrazellulären Bindestelle für lösliche Wachstumsfaktoren, einer hydrophoben Transmembran- und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne. Die Ligandenbindung stabilisiert die Rezeptoren in Form von Homo- oder Heterodimeren und zieht eine Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinasefunktion nach sich, welche Tyrosylreste des im Zytoplasma gelegenen C-Terminus des Rezeptors autophosphoryliert (Ferguson 2008). Diese Phosphotyrosylreste fungieren dann (wie unter anderem phosphoryliertes Tyrosin-1173 im Falle des EGFR) als Andockstellen für intrazelluläre Adaptermoleküle, welche Wachstums- und Überlebenssignale über den Ras/MAPK-Weg sowie den PI3K/AKT-Weg in den Zellkern vermitteln (Hsu et al. 2011; Normanno et al. 2006). Trotz seiner physiologischen Expression in gesunden basalen Epithelzellen der Haut, des Bronchialsystems, der oberen Luft- und Speisewege sowie im zentralen Nervensystem und weiteren Geweben ist der EGFR aufgrund seiner transformierenden Eigenschaften eine etablierte Zielstruktur in der Tumorthherapie (Herbst et al. 2005; Jacobi et al. 2017; Linardou et al. 2009).

In HNSCCs wurde die Überexpression des EGFR vielfach beschrieben (Dassonville et al. 1993; Grandis et al. 1993; O-Charoenrat et al. 2002). Klanrit et al. (2009) konnten zeigen, dass diese Hochregulierung mit einer Abhängigkeit der Tumorzellen vom EGFR in vivo einhergeht. Beobachtungen dieser Art sowie die Annahme, dass die EGFR-Überexpression in klinischen Tumorproben auch funktionell relevant ist, ließen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese des HNSCC vermuten (Leemans et al. 2011).

Der Nutzen einer anti-EGFR-basierten Strategie bei der Behandlung des HNSCC konnte erstmalig durch den monoklonalen Antikörper (mAb) Cetuximab klinisch belegt werden (Bonner et al. 2006; Vermorken et al. 2008). Dennoch wurde bis heute kein niedermolekularer Inhibitor für die Indikation zugelassen. Selektive EGFR-gerichtete Tyrosinkinaseinhibitoren (Erlotinib, Gefitinib) sowie Multikinaseinhibitoren verschiedener Generationen (Lapatinib, Tarloxotinib, Afatinib) wurden in klinischen Phase-II und III-Studien erprobt, zeigten jedoch keinen überzeugenden klinischen Nutzen (Alsahafi et al. 2019; Harrington et al. 2015; Martins et al. 2013; Stewart et al. 2009).

Aufgrund der Gemeinsamkeiten in der Signalkette wurde die Hochregulierung der mesenchymal-epithelial transition kinase (MET, auch HGFR) als ein kompensierender Resistenzmechanismus unter anti-EGFR-Therapie diskutiert (Madoz-Gúrpide et al. 2015; Xu et al. 2011). MET ist analog zu Mitgliedern der ErbB-Familie ein typischer Wachstumsfaktor-Rezeptor aus der Gruppe der RTKs. Durch Bindung seines natürlichen Liganden Hepatocyte Growth Factor (HGF) kommt es zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und Signaltransduktion auf dem Ras/MAPK- sowie PI3K/AKT-Weg. Mehrere Arbeiten machten MET für das Auftreten maligner Phänomene wie mesenchymale Transition, Metastasierung und Invasion verantwortlich (Arnold et al. 2017; Tepper et al. 2016). Gesundes Gewebe exprimiert MET nur geringfügig. Amplifikationen sowie aktivierende Genmutationen von *MET* wurden jedoch mit dem Auftreten von Magen-, Lungen sowie Nierenzellkarzinomen assoziiert (Goetsch et al. 2013; Matsumoto et al. 2017). Bei bestimmten Formen von NSCLC gilt MET als Tumortreiber und etablierte Zielstruktur (Miranda et al. 2018; Safi et al. 2020). Beim HNSCC wurde von einer generellen Überexpression in bis zu 85 % der untersuchten Tumore berichtet (Morello et al. 2001; Seiwert et al. 2009).

In-vitro-Experimente konnten zeigen, dass die duale Blockade von MET und EGFR in Zellkultur synergistische Hemmeffekte entfaltet und wiesen auf eine mögliche Strategie bei der Entwicklung zukünftiger Therapien hin (Seiwert et al. 2009). Die retrospektive Korrelation histologischer Daten mit klinischen Verläufen ließ einen prognostischen Zusammenhang zwischen Genamplifikationen von *MET* und dem klinischen Gesamtüberleben erkennen (Cho et al. 2016). Neben niedermolekularen MET-Inhibitoren befinden sich auch HGF-gerichtete monoklonale Antikörper in klinischer Testung (NCT03468218, NCT03422536).

1.1.4 Notwendigkeit prädiktiver Biomarker

HNSCCs werden als eine heterogene Gruppe von Erkrankungen betrachtet, für die ein breites Spektrum an genetischen und pathophysiologischen Ursachen beschrieben wurde (Leemans et al. 2018). Trotz intensiver Erforschung der Tumorgenese und Identifizierung potenzieller Zielstrukturen verbesserten bisher nur wenige Therapieansätze die klinische Situation. Mit Cetuximab, Nivolumab oder Pembrolizumab stehen heute zwar gezielte Behandlungsoptionen zur Verfügung, jedoch ist der therapeutische Nutzen mit unabhängigen Gesamtansprechraten von nur 13 % für Cetuximab, 13 % für Nivolumab und 15 % für Pembrolizumab begrenzt und hinter den Erwartungen zurückgeblieben (Cohen et al. 2019; Ferris et al. 2016; Vermorken et al. 2007).

Voraussetzung für den Erfolg einer gezielten Therapie ist die sorgfältige Selektion von Patienten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Behandlung ansprechen. Obwohl Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib und Gefitinib in vorklinischer Entwicklung vielversprechende Ergebnisse lieferten, wurde während der klinischen Entwicklung dieser Substanzen bisher kein Nutzen für unselektierte Patienten deutlich (Machiels et al. 2020).

Zunehmend wird die Rolle prädiktiver Biomarker beim HNSCC diskutiert. Der prädiktive Stellenwert der RTKs EGFR und MET konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Dies ist jedoch gerade im Hinblick auf die hohe Anzahl laufender klinischer Studien mit Inhibitoren dieser Signalwege von enormer Bedeutung (Anhang 7).

1.1.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der pathophysiologischen Relevanz von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (HNSCCs). Besonderer Fokus liegt dabei auf den klinischen Implikationen von EGF-Rezeptoren (EGFR) und HGF-Rezeptoren (MET).

Primäres Ziel der Arbeit sind Responder-Hypothesen im Zellkulturmodell. Hierbei soll ermittelt werden, ab welcher Rezeptoraktivität Zelllinien durch gezielte Inhibition von EGFR und MET eine Proliferationshemmung erfahren. Um zu prüfen, ob eine Tumorabhängigkeit von EGFR oder MET *in vitro* besteht, wird der Einfluss selektiver Kinaseinhibitoren auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen in einem Panel von 14 HNSCC-Linien bestimmt. Um die zur Proliferationshemmung notwendige Schwelle der Rezeptoraktivität zu ermitteln, werden charakteristische Phosphotyrosylreste von EGFR oder MET in den Zelllinien mittels Sandwich-Immunoassays quantifiziert.

In einem zweiten Schritt wird ein Set klinischer Gewebeproben aus insgesamt 63 Patienten, jeweils Tumor und gesundes Randgewebe, mittels Immunhistochemie und Sandwich-Immunoassays auf Expression und Phosphorylierung von EGFR oder MET hin untersucht und mit den Eigenschaften aus dem Zellkulturmodell verglichen. Durch den Vergleich werden mögliche klinische Implikationen von EGFR und MET bestätigt oder verworfen und die Relevanz der beiden RTKs als potenzielle Zielstrukturen und prädiktive Biomarker beim HNSCC re-evaluiert.

Fragestellung A: EGFR und MET als therapeutische Zielstrukturen beim HNSCC.

Sind die Rezeptoren aufgrund ihrer generellen Überexpression pathophysiologisch relevant und fungieren sie als Tumortreiber in der Indikation? Inwiefern lassen sich rezeptorbezogene Beobachtungen im Zellkulturmodell auf die klinische Situation übertragen?

Fragestellung B: EGFR und MET als prädiktive Biomarker beim HNSCC.

Können anhand von Zellkulturmodellen Schwellenwerte für das Mindestmaß der jeweiligen Rezeptoraktivität definiert und perspektivisch als eine Grundlage für die Abschätzung eines möglichen Therapieansprechens herangezogen werden?

Fragestellung C: Korrelationen des EGFR- oder MET-Expressionslevels mit klinisch-pathologischen Parametern beim HNSCC wie Tumorstadium (TNM-Status), Grad der Tumordifferenzierung, Gesamt- sowie erkrankungsfreies Überleben, HPV-Status und/oder kumulativer Alkohol- und Nikotinkonsum.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Material, Laborgeräte, Puffer, Solutions

Laborgeräte:

ASP200S Vakuuminfiltrator (Leica Biosystems)

Digitales Hellfeldmikroskop (Keyence MIRAX MIDI, Carl Zeiss)

Rotationsmikrotom (Thermo HM355S)

Multimode Mikroplatten-Reader (Tecan)

Lösungsmittel, Reagenzien und Puffer:

Aqua dest.

Antikörper Diluent (Agilent Dako S2022)

Agilent Dako Envision System (K4011)

BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology® 23227)

Bovines Serum Albumin (Sigma-Aldrich® A2153)

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega, Mannheim)

DAB Substrat (Agilent Dako K3468)

Dimethylsulfoxid (Merck 276855)

Isopropanol (Merck 1.09634.2500)

Ethanol (Merck 1.00983.2500)

Fetales bovines Serum (Life technologies™ 16000044)

Hämatoxylin (Agilent Dako CS70030-2)

Isopropanol

MSD Tris Lysepuffer (Meso Scale Discovery® R60TX2)

Multi-Spot Assay Kit, Phospho(Tyr1349)/Total Met (Meso Scale Discovery® K15126D)

Multi-Spot Assay Kit, Phospho(Tyr1173)/Total EGFR (Meso Scale Discovery® K15126D)

Penicillin Streptomycin (Life technologies™ 15140148)

Peroxidase Inhibitorlösung (Agilent Dako S2023)

Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma P0044)

Phosphatgepufferte Salzlösung (Gibco™ 10010023)

Polysorbat 20 (Sigma-Aldrich® P1379)

Protease Inhibitor Cocktail (Pierce Biotechnology® 87785)

Target retrieval solution (Agilent Dako S2367)

TrypLE Express (Gibco™ 12605036)

Xylol (Merck 1.08685.2500)

Antikörper:

Anti-EGFR Antikörper Klon D38B1 (Cell Signaling Technologies)

Anti-MET Antikörper Klon SP44 (Spring Bioscience)

Inhibitoren:

5-Fluoruracil (Tocris® 3257)

BAY-853474 (Bayer Pharmaceuticals)

Cisplatin (Tocris® 2251)

Erlotinib HCl (Abcam® 183319-69-9)

Tab. 1: Angaben zur Herstellung der Nährmedien für die Zellkultur

Zelllinie	Medium	Zugesetzte Komponenten
KYSE-30	50 % RPMI 1640 (# FG 1215) + 50 % Ham's F12 (# FG 0815)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
KYSE-70	RPMI 1640 (Biochrom; # FG 1215)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
KYSE-140	RPMI 1640; (Biochrom; # FG 1215)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
KYSE-150	50 % RPMI 1640 (# FG 1215) + 50 % Ham's F12 (# FG 0815)	FCS (2 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
KYSE-510	RPMI 1640; (Biochrom; # FG 1215)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
SCC-4	DMEM / Ham's F12; (Gibco; # 21331-020)	FCS (10 %); (Bioc # S 0615); Hydrocortison 400ng/mL; L-Glutamin 2 mM
SCC-9	DMEM / Ham's F12; (Gibco; # 21331-020)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); Hydrocortison 400ng/mL; L-Glutamin 2 mM
SCC-15	DMEM / Ham's F12; (Gibco; # 21331-020)	FCS (10 %); (Bioc; # S 0615); Hepes 15mM; Hydrocort. 400ng/mL; L-Glut 2 mM
SCC-25	DMEM / Ham's F12; (Gibco; # 21331-020)	FCS (20 %); (Biochrom; # S 0615); Natriumpyruvat 1mM; L-Glutamin 2 mM
CAL 27	DMEM; (Gibco; # 11960-044)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
CAL 33	DMEM; (Gibco; # 11960-044)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
HSC-3	MEM Earle's; (Biochrom; # FG 0315)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
Detroit 562	MEM Earle's; (Biochrom; # FG 0315)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
FaDu	MEM Earle's; (Biochrom; # FG 0315)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
HCC-827	RPMI 1640 (Biochrom; # FG 1215)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
U-87 MG	MEM Earle's; (Biochrom; # FG 0315)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
KPL-4	RPMI 1640 (Biochrom; # FG 1215)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
MKN-45	RPMI 1640; (Biochrom; # FG 1215)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
SNU-5	DMEM; (Gibco; # 11960-044)	FCS (20 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
HS746T	DMEM; (Gibco; # 11960-044)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)
SNU-1	RPMI 1640; (Biochrom; # FG 1215)	FCS (10 %); (Biochrom; # S 0615); L-Glutamin 2 mM (Gibco; #25030-024)

1.2.2 HNSCC-Gewebeproben und Eigenschaften der Spender

Die Proben aus Berlin wurden im Rahmen einer Studie durch ärztliche Mitarbeiter unter Anleitung des verantwortlichen Studienarztes Dr. med. Martin Khan an der HNO-Klinik (Campus Virchow-Klinikum) der Charité, Universitätsmedizin Berlin entnommen. Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission der Charité genehmigt (EA2/045/10)

und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki 1964 durchgeführt. Informierte Einwilligungserklärungen der Studienteilnehmer wurden vor Beginn eingeholt.

In der Klinik wurden von 63 Patienten mit Plattenepithelzellkarzinomen im Kopf und Halsbereich Gewebeproben entnommen. Die Entnahme umfasste ein Stück Gewebe aus dem Tumor sowie ein weiteres Stück aus dem gesunden Randbereich (in dieser Arbeit als Normalgewebe bezeichnet). Alle intraoperativ gewonnenen Proben wurden geteilt und entweder für spätere immunhistochemische Färbungen in Formalin fixiert oder für Analysen mittels Sandwich-Immunassays schockgefroren und bei -80 °C eingelagert. Klinisch-demographische Angaben zu den Spendern der Proben sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Klinisch-demographische Angaben zu den Spendern klinischer Proben der Charité, Berlin. Von insgesamt 63 Patienten liegen vollständige Angaben zu klinischen Merkmalen nur bei n = 51 Patienten vor. Tabelle übernommen aus Khaznadar et al. (2018), Tab. 2.

Merkmal		Wert oder Anzahl n	Anteil in %
Alter (Median)		66 Jahre	
Geschlecht	männlich	39	76,5
	weiblich	12	23,5
Tumorlokalisation	Mundhöhle	7	13,7
	Oropharynx	21	41,2
	Hypopharynx	6	11,8
	Larynx	15	29,4
	Sonstige	2	3,9
Tumorstadium	I	6	11,8
	II	1	2,0
	III	6	11,8
	IVa	26	51,0
	IVb	5	9,8
	IVc	7	13,7
Grad der Differenzierung	gut (G1)	1	2,0
	mäßig (G2)	3	5,9
	niedrig (G3)	35	68,6
	anaplastisch (G4)	12	23,5

Der Probensatz aus Finnland wurde in Form eines tissue microarray (TMA) von Dr. Johannes Routila und Dr. Sami Ventelä der Universität Turku (Turku, Finnland)

bereitgestellt. Hierfür wurden aus Paraffinblöcken der Auria Biobank (Turku, Finnland) von insgesamt 255 Patienten mit HNSCC geeignete Bereiche von 1 mm Durchmesser herausgestanzt und nebeneinander im Array-Format, in einen Paraffin-Block eingesetzt. Die Verwendung der Proben wurde durch die Nationale Behörde für medizinrechtliche Angelegenheiten in Finnland (Dnro 8005/06.01.03.01/2014, Dnro 889/04/047/08) sowie durch die Ethikkommission der Universität Turku (Dnro 146/2007) und durch die Wissenschaftskommission der Auria Biobank (AB15-6487) genehmigt. Färbungen und Auszählungen der TMA-Schnitte erfolgten ebenfalls durch Dr. Johannes Routila und Dr. Sami Ventelä der Universität Turku.

Tab. 3: Klinisch-demographische Angaben zu den Spendern klinischer Proben aus Turku, Finnland (Pathologisches Archiv Auria Biobank), n = 255. Tabelle übernommen aus Khan et al. (2020), Tab. 2.

Merkmalsname	Merkmalswert	Wert oder Anzahl n	Anteil in %
Alter (Median)		62 Jahre	
Geschlecht	männlich	165	64,7
	weiblich	90	35,3
Tumorlokalisation	Mundhöhle	128	50,2
	Oropharynx	51	20,0
	Hypopharynx	43	16,9
	Larynx	15	5,9
	Sonstige	18	7,1
Tumorstadium	I	58	22,7
	II	48	18,8
	III	46	18,0
	IV	103	40,4
HPV-Status	positiv	43	16,9
	negativ	212	83,1
5-Jahres-Überleben	ja	106	41,6
	nein	149	58,4
N-Status zum Zeitpunkt der Diagnosestellung	N0	148	58,0
	> N0	107	42,0

1.2.3 Immunhistochemie (IHC)

Für die Immunhistochemie von Zellpellets und Tumorgewebe wurden aus Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeblöcken am Mikrotom 3 µm dicke Schnittpräparate angefertigt (6 µm für TMA-Blöcke) und auf Objektträgern aufgebracht. Nach der Entparaffinierung mittels absteigender Alkoholreihe wurden die Präparate mit Antigen Retrieval Lösung bei pH 9 (Agilent Dako S2367) für 17 min aufgeköcht. Um unspezifischen Färbereaktionen entgegenzuwirken, wurde die Aktivität endogener Peroxidasen durch Auftragen einer Inhibitorlösung (Agilent Dako S2023) für 15 min blockiert. Für die Immunmarkierung von EGFR und MET wurden die Präparate für 120 min mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Für EGFR wurde der (rabbit) anti-EGFR Antikörperklon D38B1 (Cell Signaling Technologies®) in einer Verdünnung von 1:900 (Agilent Dako 2022, Antibody Diluent) verwendet. MET wurde durch den primären (rabbit) anti-MET Antikörperklon SP44 (Spring Bioscience®) in einer Verdünnung von 1:100 (Agilent Dako 2022, Antibody Diluent) immunmarkiert. Anschließend wurden die Präparate für 60 min mit dem (anti-rabbit) Sekundärantikörper (Agilent Dako K4011, Envision System) inkubiert und durch Auftragen des chromogenen Substrates 3,3'-Diaminobenzidin für 10 min angefärbt (braun). Zellkerne wurden durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin sichtbar gemacht (blau-violett). Um das Ausmaß an Verdampfung zu reduzieren, erfolgten Inkubationen mit Primär- und Sekundärantikörper in einer Feuchtkammer. Vor Etablierung der Protokolle wurden die Färbebedingungen (Konzentration und Inkubationszeit von Primärantikörpern, pH-Wert der Aufköchlösung) variiert und in Vorexperimenten untersucht, um möglichst optimale Kontrastumfänge zu erreichen. Die Präparate wurden mikroskopisch untersucht und digitalisiert. Die Auswertung erfolgte durch manuelle Auszählung und Beurteilung der Färbeintensitäten nach dem Vier-Augen-Prinzip. Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte.

1.2.4 Meso Scale Discovery (MSD) Sandwich Immunassay

Die Quantifizierung der EGFR und MET-Expressionen sowie die der Phosphotyrosinreste 1173 (für pEGFR) und 1349 (für pMET) erfolgte in Lysaten mittels Elektro-Chemilumineszenz-basiertem Sandwich-Immunassay (Meso Scale Discovery®, Rockville, MD). Die Lysate wurden aus schockgefrorenem Tumormaterial oder kultivierten Tumorzellen mittels Lysepuffer (MSD®, R60TX2) unter Zugabe von Phosphatase-

(Sigma-Aldrich® P0044, P-5726) und Protease-Inhibitoren (Pierce Biotechnology® 87785) hergestellt. Für die Messung wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate im Assay nach Bradford bestimmt und 20 µg Protein pro Probe verwendet. Gemessene Signale wurden so auf den Gesamtproteingehalt der Probe normiert und als MSD-Signal pro verwendetem µg Protein angegeben.

1.2.5 Zellkultur

Alle Arbeiten an Zellkultur und Medien wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle 14 HNSCC- und weitere sieben Kontrollzelllinien wurden von ATCC oder DSMZ erworben. Tab. 4 beinhaltet Angaben zu Ursprungsgewebe und Herkunft aller verwendeten Zelllinien. Als Positiv- oder Negativkontrolle wurden in dieser Arbeit Zelllinien eingeschlossen, für welche entweder eine stabile Überexpression (EGFR: HCC-827, U-87 MG, MET: MKN-45, SNU-5, HS746T) oder eine nur minimale Expression (EGFR: KPL-4, MET: SNU-1) der jeweiligen RTK beschrieben wurde. Die Zelllinien HCC-827, U-87 MG und KPL-4 fungieren als Kontrollen für Experimente mit Erlotinib und MKN-45, HS746T, SNU-5 und SNU-1 als Kontrollen für Experimente mit MET-Inhibitor BAY-853474.

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 36,5 °C und einem PCO₂ von 5,06 kPa (5 %) kultiviert. Tab. 1 bietet eine Übersicht über verwendete Nährmedien und zugesetzte Komponenten. Nährmedien und Puffer wurden vor Einsatz in Zellkultur auf Zimmertemperatur erwärmt. In Intervallen von maximal drei Tagen erfolgte entweder ein Wechsel des Nährmediums oder eine Aufteilung der kultivierten Zellpassage. Ab der 10. Passage wurden kultivierte Zellen vollständig verworfen und durch eine junge Passage ersetzt. Für experimentelle Versuche wurden Suspensionen auf einen absoluten Zellgehalt normiert. Verwendet wurden lediglich Zellpassagen, die ein konfluentes Wachstum von 70-90 % aufwiesen.

Für die Erzeugung der Lysate wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert, mehrmals mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer (MSD®, R60TX2) auf Eis unter Zugabe von Phosphatase- (Sigma-Aldrich® P0044, P-5726) und Protease-Inhibitoren (Pierce Biotechnology® 87785) für 30 min inkubiert. Lysate wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Herstellung der FFPE-Blöcke wurden die Zellen bei maximal 80-prozentiger Konfluenz geerntet, mit PBS gewaschen, pelletiert und in einer Lösung mit 10 % Formalin für 8-18 h bei Raumtemperatur fixiert. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung in 70 % Ethanol gelagert, dann entwässert, mit Paraffinwachs vakuumfiltriert (Leica ASP200S) und in Paraffin eingebettet.

Tab. 4: Angaben zum jeweiligen Typ des Tumors sowie des jeweiligen Ursprungsgewebes der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. 14 HNSCC-Linien wurden ergänzt durch die jeweiligen positiven (HCC-827, U-87 MG, MKN-45, SNU-5, HS746T) und negativen Kontrolllinien (KPL-4, SNU-1).

Zelllinie	Typ und Ursprung	bezogen von	Referenz
KYSE-30	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	DSMZ, ACC 351	Shimada et al. 1992
KYSE-70	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	DSMZ, ACC 363	Shimada et al. 1992
KYSE-140	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	DSMZ, ACC 348	Shimada et al. 1992
KYSE-150	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	DSMZ, ACC 375	Shimada et al. 1992
KYSE-510	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	DSMZ, ACC 374	Shimada et al. 1992
SCC-4	Plattenepithelkarzinom der Lingua	ATCC®, CRL-1624™	Rheinwald und Beckett 1980
SCC-9	Plattenepithelkarzinom der Lingua	ATCC®, CRL-1629™	Rheinwald und Beckett 1981
SCC-15	Plattenepithelkarzinom der Lingua	ATCC®, CRL-1623™	Rheinwald und Beckett 1980
SCC-25	Plattenepithelkarzinom der Lingua	DSMZ, ACC 617	Rheinwald und Beckett 1981
CAL 27	Plattenepithelkarzinom der Lingua	DSMZ, ACC 446	Gioanni et al. 1988
CAL 33	Plattenepithelkarzinom der Lingua	DSMZ, ACC 447	Gioanni et al. 1988
HSC-3	Plattenepithelkarzinom der Lingua	JCRB, JCRB0623	Momose et al. 1989
Detroit 562	Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx	ATCC®, CCL-138™	Peterson et al. 1968
FaDu	Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx	ATCC®, HTB-43™	Rangan 1972
HCC-827	Adenokarzinom der Lunge (NSCLC)	DSMZ, ACC 566	Virmani et al. 1998
U-87 MG	Glioblastom	ATCC®, HTB-14™	Ponten und Macintyre 1968
KPL-4	Mammakarzinom, inflammatorischer Typ	Kawasaki University Japan	Kurebayashi et al. 1999
MKN-45	Adenokarzinom des Magens	DSMZ, ACC 409	Naito et al. 1984
SNU-5	Karzinom des Magens	ATCC®, CRL-5973™	Park et al. 1990
HS746T	Karzinom des Magens	ATCC®, HTB-135™	Smith 1979
SNU-1	Karzinom des Magens	ATCC®, CRL-5971™	Park et al. 1990

1.2.6 Proliferationsexperimente

Für diese Arbeit wurde die Wachstumsabhängigkeit kultivierter Tumorzellen von EGFR und MET in einem Zellkulturpanel von 14 HNSCC- und sieben weiteren Kontrollzelllinien untersucht. Hierfür wurde die Proliferation der Tumorzellen unter Zugabe eines EGFR-selektiven Inhibitors Erlotinib, eines MET-selektiven Inhibitors BAY-853474 (Bayer AG, Berlin) oder einer korrespondierenden Menge des Lösungsmittels (Dimethylsulfoxide, DMSO) beobachtet. Um die standard-of-care Chemotherapie beim HNSCC in vitro nachzuahmen, wurde eine fixe Kombination der zytostatischen Substanzen Cisplatin und 5-Fluoruracil (Verhältnis von 1:3,33) getestet und in Konzentrationen, welche sich an

gängigen Plasmaspiegeln orientieren, als zusätzliche Kontrolle in die Experimente eingeschlossen.

Tumorzellen wurden 24 h vor Zugabe von Inhibitorlösung oder DMSO-Kontrolle in 96-well-Platten in einer Konzentration von 2000 Zellen pro well ausgesät und bei 36,5 °C mit Nährmedium prä-inkubiert. Anschließend wurden die Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationsstufen oder die jeweilige Menge DMSO zugegeben. Um das Risiko unspezifischer off-target-Effekte zu minimieren, wurden Konzentrationsbereiche für Erlotinib von 0,15 nM bis 3 µM und für BAY-853474 von 0,1 nM bis 1 µM gewählt. Cis und FU wurden in einem Verhältnis von 1 zu 3,33 kombiniert und für Konzentrationen von 30 nM bis 300 µM (Cisplatin) beziehungsweise 100 nM bis 1 mM (FU) getestet. Tumorzellen wurden für 72 h bei 36,5 °C mit den Substanzen inkubiert und anschließend wurde die Viabilität der Zellen in einem ATP-Lumineszenz-basierten Verfahren (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Mannheim) quantifiziert. Das Ausmaß der Proliferationshemmung wurde für jede Zelllinie und jeden Inhibitor anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurven unter Angabe halbmaximaler Hemmkonzentration (IC₅₀) und maximaler Wirksamkeit (efficacy) ausgewertet.

1.2.7 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden mittels GraphPad Prism Version 7 (San Diego, CA) ausgewertet. Mittelwerte wurden inklusive Standardfehler (SEM) oder Standardabweichung (SD) angegeben. Der Stichprobenumfang n wurde jeder Abbildung in der Beschriftung beigefügt. Den Stichproben wurde im Hinblick auf Expression und Phosphorylierung keine Normalverteilung zugrunde gelegt. Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen wurden daher mittels nichtparametrischem Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft. Beim parallelen Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurden Unterschiede durch Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis inklusive Post-hoc-Test nach Dunn auf Signifikanz geprüft. Unterschiede zwischen Tumor und Normalgewebe eines Spenders wurden hingegen mittels nichtparametrischem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben verglichen. Gruppendaten zum Gesamt- und erkrankungsfreiem-Überleben wurden nach der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet und mittels log-rank-Tests verglichen. Statistische Signifikanz wurde ab einem Niveau von $\alpha < 0,05$ akzeptiert.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Proliferationsexperimente mit HNSCC- und Kontrollzelllinien

Die Arbeit untersuchte die Effekte des EGFR-Inhibitors Erlotinib (Khaznadar et al. 2018) sowie des MET-Inhibitors BAY853474 (Khan et al. 2020) auf die Wachstumseigenschaften von Tumorzellen in Kultur. Hierfür wurde ein Zellpanel von insgesamt 21 Linien, darunter 14 HNSCC-Linien, kultiviert und untersucht. Die übrigen sieben Zelllinien wurden als Kontrollen in Experimente eingebunden. Alle HNSCC-Linien wurden jeweils auf ihre Empfindlichkeit gegenüber beiden Inhibitoren getestet und die Zusammenhänge in Konzentrations-Wirkungs-Kurven erfasst. Zur Verifizierung der experimentellen Hemmbarkeit der Linien wurde zusätzlich das Wachstum des gesamten Zellpanels unter Wirkung einer zytostatischen Substanzkombination (Cis/FU) untersucht.

Alle 21 Zelllinien wurden durch die Inkubation mit der zytostatischen Substanzkombination konzentrationsabhängig in der Proliferation gehemmt. Die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50} -Werte) wurden auf Cisplatin bezogen und lagen im mikromolaren Bereich (Tab. 5), welche den klinisch erreichten Wirkstoffkonzentrationen im Serum entsprechen (Blaschke et al. 2012, Ikeda et al. 1998).

Um die Proliferationshemmung durch Erlotinib zu untersuchen, wurden die Linien KPL-4 (Mammakarzinom) als Negativkontrolle ($IC_{50} > 3000$ nM) sowie HCC-827 (Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom) als Positivkontrolle ($IC_{50} 18 \pm 1$ nM) ausgewählt. Auffällig war, dass HNSCC-Zelllinien in großer Mehrheit Erlotinib empfindlich reagierten und durch Inkubation mit Erlotinib in ihrer Proliferation gehemmt wurden (Tab. 5). Die bestimmten IC_{50} -Werte rangierten dabei im Bereich von 234 ± 27 nM bis 1710 ± 1506 nM für SCC-25 und HSC-3. Allerdings liegen die IC_{50} -Werte der HNSCC-Zelllinien mindestens zehnfach über dem der Positivkontrolle HCC-827, die mit einer aktivierenden Mutation im EGFR der klinischen Zielgruppe entspricht. Nur zwei der 14 getesteten Linien waren vollständig unempfindlich gegenüber Erlotinib im getesteten Konzentrationsbereich von maximal 3 μ M.

Im Kontrast zum EGFR-Inhibitor bewirkte MET-Inhibitor BAY-853474 in Konzentrationen von bis zu 1 μ M keine Hemmung der Zellproliferation in HNSCC-Linien. IC_{50} -Werte für die MET-positiven Magenkarzinomlinien MKN-45, SNU-5 und HS746T lagen bei 41 ± 2 nM,

13 ± 4 nM und 17 ± 3 nM. Die Negativkontrolle SNU-1 wurde nicht in ihrer Proliferationsrate gehemmt (Tab. 5).

Tab. 5: Übersicht über halbmaximale Hemmkonzentrationen (IC₅₀) sowie maximale Hemmung (max. Effekt) der Proliferation von 14 HNSCC-, und sieben Kontrollzelllinien durch eine zytostatische Substanzkombination (Cis/FU), Erlotinib oder BAY-853474 (TKIs). Bei Inkubation mit zytostatischen Substanzen zeigten alle Linien und bei Inkubation mit Erlotinib 12 von 14 HNSCC-Linien eine konzentrationsabhängige Hemmung. Im Vergleich dazu waren alle Linien gegen MET-Inhibitor BAY-853474-resistent. Abbildung adaptiert aus Khan et al. (2020), Abb. 2 und Khaznadar et al. (2018), Tab. 1.

Zelllinie	Cisplatin / 5-Fluoruracil		Erlotinib		BAY-853474	
	IC ₅₀ ± SD (nM)	max. Effekt (%)	IC ₅₀ ± SD (nM)	max. Effekt (%)	IC ₅₀ ± SD (nM)	max. Effekt (%)
KYSE-30	4013 ± 479	100	854 ± 207	80	> 1000	0
KYSE-70	1670 ± 752	100	> 3000	31	> 1000	0
KYSE-140	668 ± 533	100	384 ± 31	80	> 1000	0
KYSE-150	2367 ± 1436	100	190 ± 156	76	> 1000	0
KYSE-510	903 ± 90	100	> 3000	0	> 1000	0
SCC-4	2316 ± 296	100	265 ± 69	47	> 1000	0
SCC-9	5423 ± 969	100	352 ± 44	95	> 1000	0
SCC-15	5560 ± 1049	100	450 ± 54	100	> 1000	0
SCC-25	2739 ± 321	100	234 ± 27	99	> 1000	0
CAL 27	2285 ± 550	100	309 ± 19	88	> 1000	0
CAL 33	4736 ± 685	100	712 ± 189	85	> 1000	0
HSC-3	2972 ± 586	100	1710 ± 1506	68	> 1000	0
Detroit 562	1765 ± 162	100	431 ± 381	67	> 1000	0
FaDu	3913 ± 1613	100	568 ± 403	68	> 1000	0
Kontrolle						
HCC-827	4004 ± 665	100	18 ± 1	95	-	-
U-87 MG	2656 ± 1331	100	> 3000	0	-	-
KPL-4	1929 ± 611	100	> 3000	32	-	-
MKN-45	703 ± 306	100	(> 3000)	(0)	41 ± 2	95
SNU-5	2960 ± 1500	100	-	-	13 ± 4	100
HS746T	4850 ± 1500	100	-	-	17 ± 3	96
SNU-1	539 ± 407	100	(> 3000)	(0)	> 1000	0

Anmerkungen zur Tabelle: Zellen wurden in 96-well-Platten für 24 h prä-inkubiert, dann für weitere 72 h in Anwesenheit der Hemmsubstanzen oder der jeweiligen Lösungsmittel inkubiert und die Viabilität der Zellen am dritten Tag quantifiziert. Jede Messung erfolgte mit n ≥ 3 und wurde anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurven ausgewertet. Die Zelllinien HCC-827 und KPL-4 fungieren als Kontrollen für Experimente mit Erlotinib und

MKN-45, HS746T, SNU-5 und SNU-1 als Kontrollen für Experimente mit dem BAY-853474. Die Verbindungen Cisplatin und 5-Fluoruracil bilden die zytostatische Substanzkombination in einem Verhältnis von 1:3,33. Maximal getestete Konzentrationen waren 300 μM (Cis/FU, Konzentrationen bezogen auf Cisplatin), 3 μM (Erlotinib) und 1 μM (BAY-853474). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD (IC_{50}).

1.3.2 EGFR und MET in HNSCC- und Kontrollzelllinien

Im Unterschied zur reinen Expression stellt die Menge phosphorylierter Rezeptoren einen konkreten Parameter zur Quantifizierung der Rezeptoraktivität dar. Um die Hintergründe eines möglichen RTK-abhängigen Wachstums untersuchter Tumorzellen besser zu verstehen, erfolgten in Khan et al. (2020) und Khaznadar et al. (2018) sowohl die semiquantitative Untersuchung der Expression durch spezifische Anfärbung in der Immunhistochemie (IHC) als auch die Quantifizierung von Rezeptorexpression (EGFR/MET) und -phosphorylierung (pEGFR/pMET) mittels Sandwich-Immunassays. Für Details zur experimentellen Validierung und Durchführung wird auf den Methodenteil dieser Arbeit verwiesen.

Alle untersuchten HNSCC-Linien zeigten in der IHC eine positive Immunreaktivität für EGFR (Anhang 1) und MET (Anhang 2). Beobachtete Signale waren überwiegend auf den Bereich der Zellmembran beschränkt. Auch in den Immunassays zeigte sich, dass alle HNSCC-Linien EGFR exprimierten (Abb. 1). Signale für pEGFR korrelierten positiv mit denen für EGFR. Die NSCLC-Linie HCC-827, welche mit einer aktivierenden Mutation im *EGFR*-Gen als Positivkontrolle in die Messung eingeschlossen wurde, zeigte jedoch eine noch wesentlich stärkere Phosphorylierung (Anhang 3).

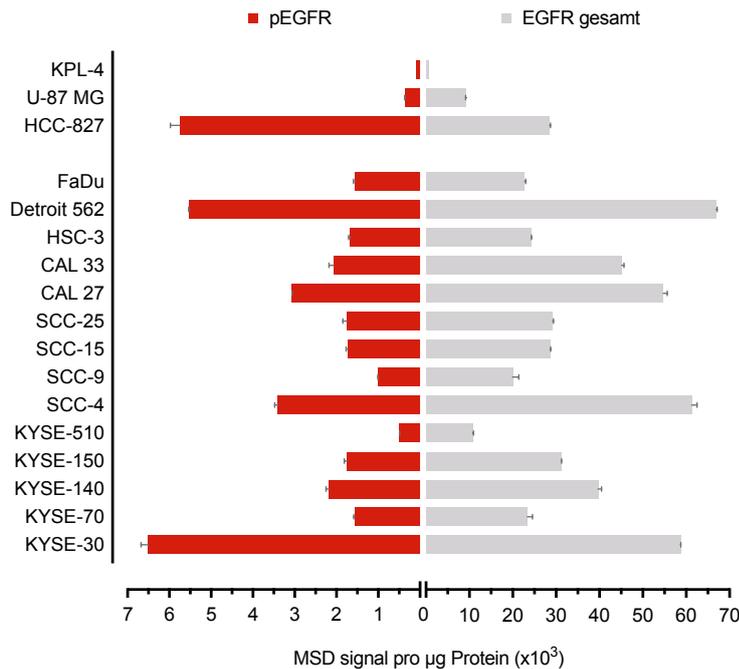


Abb. 1: EGFR-Expression (grau) und -Phosphorylierung (rot) in einem Panel von 14 HNSCC- und drei Kontrollzelllinien. HNSCC-Linien zeigen hohe Level an Expression und Phosphorylierung. Für die Messung wurden Lysate exponentiell-wachsender Tumorzellen angefertigt und auf einen Proteingehalt von 20 µg normiert. Die Messung der Proben erfolgte mittels Elektro-Chemilumineszenz-basiertem Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery®, MSD). Angegeben sind Mittelwerte für Phosphotyrosin-1173 oder gesamt-EGFR Signal pro µg Gesamtprotein \pm SEM aus einem Probenumfang von $n = 3$ pro Gruppe. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. (2018), Abb. 1.

Im Gegensatz zum EGFR waren Expression und Aktivität von MET in HNSCC noch deutlich stärker unterhalb derer der verwendeten Positivkontrollen (Khan et al. 2020). So exprimierten HNSCC-Linien MET auf einem Level deutlich unterhalb von MKN-45, SNU-5 und HS746T, welche genomische Amplifikationen von MET aufweisen. Besondere Unterschiede zum EGFR wurden beim Vergleich der Phosphorylierungssignale deutlich. So lagen die in HNSCC-Linien gemessenen Werte für pMET in dem Bereich der Negativkontrolle SNU-1 und hoben sich damit kaum vom Hintergrundsignal ab (Abb. 2). Eine Korrelation von MET-Expression und pMET-Signalen ist daher nicht gegeben.

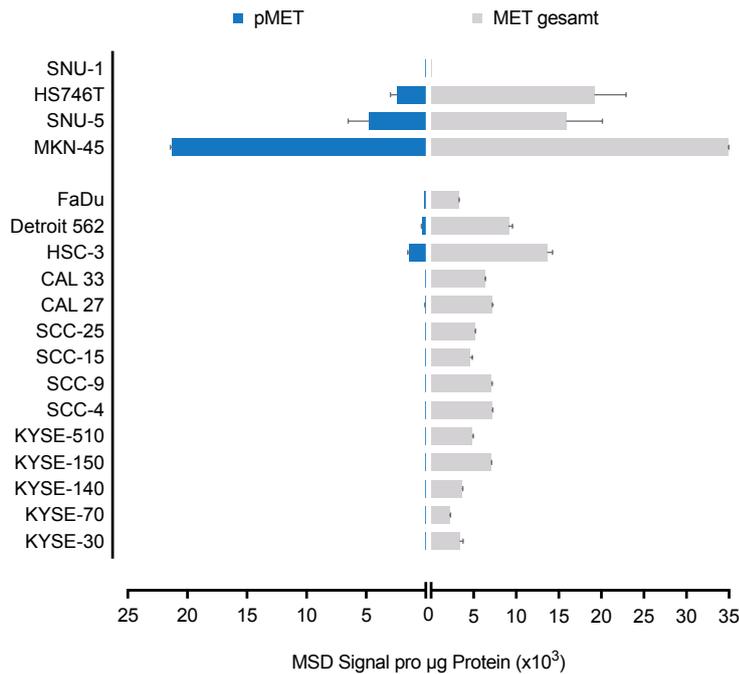


Abb. 2: MET-Expression (grau) und Phosphorylierung (blau) in einem Panel von 14 HNSCC- und vier Kontrollzelllinien. Die MET-abhängige Tumorzelllinie MKN-45 (Positivkontrolle) zeigt hohe Level an Expression und Phosphorylierung. In HNSCC Zellen wird MET zwar exprimiert, phosphorylierte Rezeptoren werden jedoch kaum detektiert. Für die Messung wurden Lysate exponentiell-wachsender Tumorzellen angefertigt und auf einen Proteingehalt von 20 µg normiert. Die Messung der Proben erfolgte mittels Elektro-Chemilumineszenz-basierendem Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery®, MSD). Angegeben sind Mittelwerte für Phosphotyrosin-1349 oder gesamt-MET-Signal pro µg Gesamtprotein ± SEM aus einem Probenumfang von n = 3 pro Gruppe. Abbildung adaptiert aus Khan et al. (2020), Abb. 3A.

Um zu analysieren, inwieweit für die Tumorzelllinien ein Zusammenhang zwischen der Menge exprimierter Rezeptoren und einer Wachstumsinhibition im Proliferationsassay besteht, wurden die Zelllinien in Inhibitor-empfindliche und Inhibitor-resistente Linien unterteilt und die mittleren Expressionslevel beider Gruppen verglichen. Als Grenze galt dabei ein IC_{50} -Wert unterhalb der maximalen eingesetzten Konzentration des jeweiligen Inhibitors (3000 nM für Erlotinib, 1000 nM für BAY-853474). Ein signifikanter Zusammenhang bestätigte sich sowohl für EGFR als auch für MET (Abb. 3a und 4a). Deutlichere Unterschiede waren insbesondere dann sichtbar, wenn das Ausmaß der Phosphorylierung als Kriterium betrachtet wurde. So lag das Signal von pEGFR in den Erlotinib-empfindlichen Zelllinien signifikant über dem Signal Erlotinib-resistenter Linien (Abb. 3b). Ebenso zeigten BAY-853474-resistente HNSCC-Linien sehr niedrige Werte für

pMET. Im Vergleich mit den MET-abhängigen Magenkarzinomlinien waren diese im Mittel um zwei Größenordnungen niedriger (Abb. 4b).

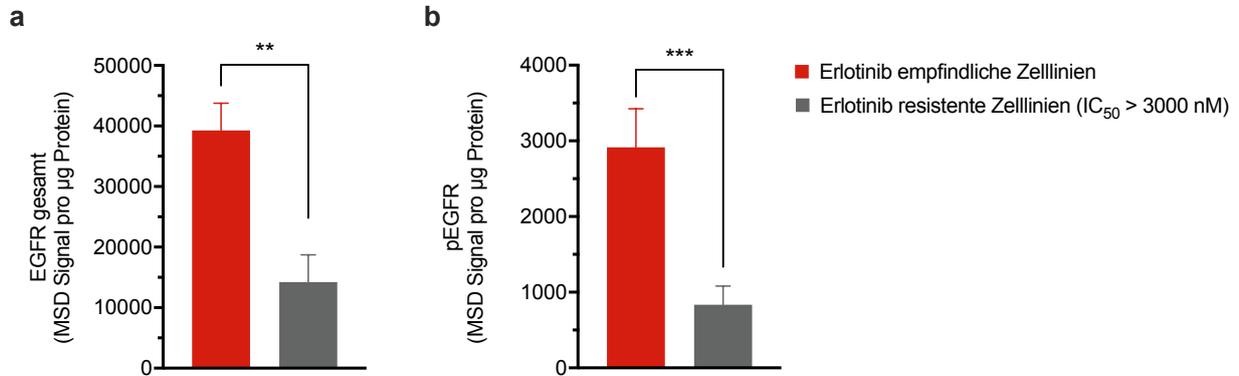


Abb. 3: Unterschiede in EGFR-Expression (a) und Phosphorylierung (b) zwischen Erlotinib-empfindlichen Linien (rot, n = 13) und Erlotinib-resistenten Linien (grau, n = 6). Die Messung der Proben erfolgte mittels Elektro-Chemilumineszenz-basiertem Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery®, MSD). Angegeben sind Gruppenmittelwerte für Phosphotyrosin-1173 oder gesamt-EGFR-Signal pro µg Protein ± SEM. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft. ** p < 0,01, *** p < 0,001. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. (2018), Abb. 3A und 3B.

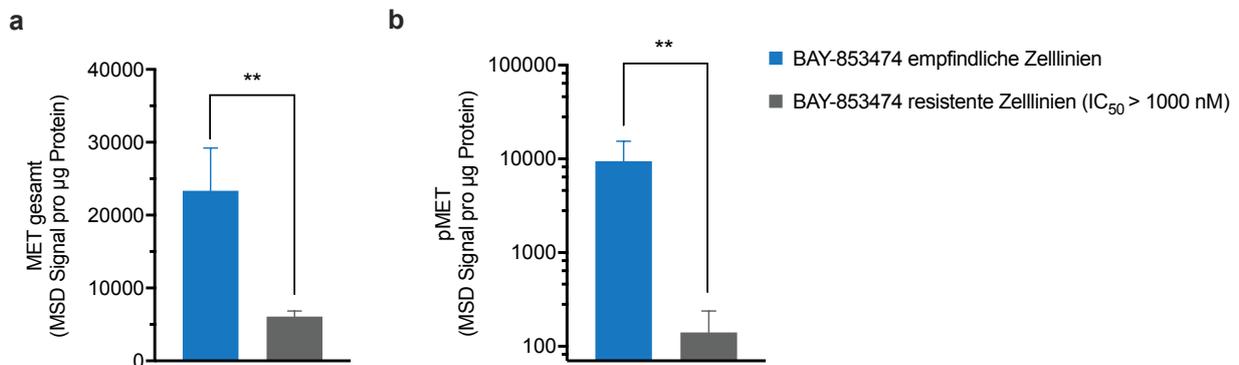


Abb. 4: Unterschiede in MET-Expression (a) und Phosphorylierung (b) zwischen BAY-853474-empfindlichen Magenkarzinom-Linien (blau, n = 3) und BAY-853474-resistenten HNSCC-Linien (grau, n = 15). Die Messung der Proben erfolgte mittels Elektro-Chemilumineszenz-basiertem Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery®, MSD). Angegeben sind Gruppenmittelwerte für Phosphotyrosin-1349 oder gesamt-MET-Signal pro µg Protein ± SEM. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft. ** p < 0,01. Abbildung adaptiert aus Khan et al. (2020), Abb. 5C und 5D.

Für die Formulierung der Erlotinib-Responderhypothese wurde eine pEGFR-Schwelle gesucht, welche eine Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber Erlotinib in Zellkultur möglichst präzise vorhersagt. Alle Zelllinien, welche im Proliferationsassay empfindlich gegenüber Erlotinib waren, zeigten pEGFR-Signale von größer 10^3 pro μg Protein (Abb. 5). Bei Signalen unterhalb dieser Größenordnung führte die Inkubation mit Erlotinib zu keiner Proliferationshemmung mehr (Khaznadar et al. 2018). Diese Arbeit legt für die zur Hemmung einer Tumorzelllinie minimal notwendige Rezeptoraktivität also ein MSD-Signal von mindestens $1,0 \times 10^3$ pro μg Protein zugrunde. Abb. 5 gibt einen Überblick über die Erlotinib-Empfindlichkeit (IC_{50} -Werte) getesteter Zelllinien subgruppiert nach dem Überschreiten oder Unterschreiten möglicher Signalschwellen einer prädiktiven Rezeptoraktivität.

Keine der 14 HNSCC-Linien wurde in ihrem Wachstum durch MET-Inhibitor BAY-853474 gehemmt (Khan et al. 2020). Im Hinblick auf die pMET-Level empfindlicher Magenkarzinomlinien, würde ein möglicher prädiktiver Schwellenwert folglich außerhalb der Größenordnung liegen, die bei HNSCC-Linien gefunden wurden.

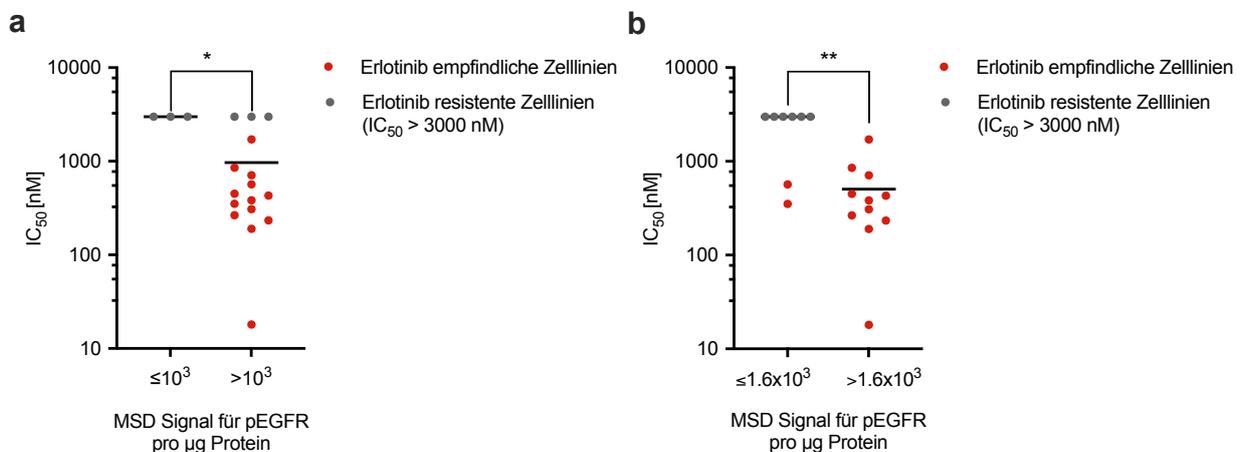


Abb. 5: Größenordnung eines prädiktiven Schwellensignals von pEGFR für eine Proliferationshemmung durch Erlotinib **a.** Zelllinien mit einem pEGFR-Signal von unter 1×10^3 wurden in Proliferationsexperimenten nicht mehr durch Erlotinib gehemmt. **b.** Alle Zelllinien mit einem pEGFR-Signal von über $1,6 \times 10^3$ wurden in Proliferationsexperimenten durch Erlotinib gehemmt. Angegeben sind die mittleren IC_{50} -Werte für jede Zelllinie, gruppiert nach einer festgelegten Signalgrenze (10^3 oder $1,6 \times 10^3$). Datenpunkte in Rot verdeutlichen Erlotinib-empfindliche Linien, Datenpunkte in Blau Linien mit IC_{50} -Werten für Erlotinib > 3000 nM. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

1.3.3 EGFR und MET in klinischen Tumorproben

Um die funktionelle Relevanz des EGFR und von MET für das HNSCC besser zu verstehen, wurden Expression und Phosphorylierung der RTKs in klinischen Proben analog zu den Zelllinien mittels IHC und Sandwich-Immunoassay untersucht (Khan et al. 2020; Khaznadar et al. 2018). Hierfür wurden aus insgesamt 63 Patienten intraoperativ jeweils Gewebeproben der Tumoren und gesunder Randbereiche entnommen, geteilt und entweder in Formalin fixiert oder zur späteren Herstellung der Lysate kryokonserviert (intraoperative Entnahme durch Dr. Martin Khan). Für klinische Angaben zu den Spendern der Proben wird auf den Material- und Methodenteil verwiesen.

Die Vergabe immunhistochemischer Scores orientierte sich an der Färbeintensität immunmarkierter Kontrollen für EGFR (Anhang 4) und MET (Anhang 5).

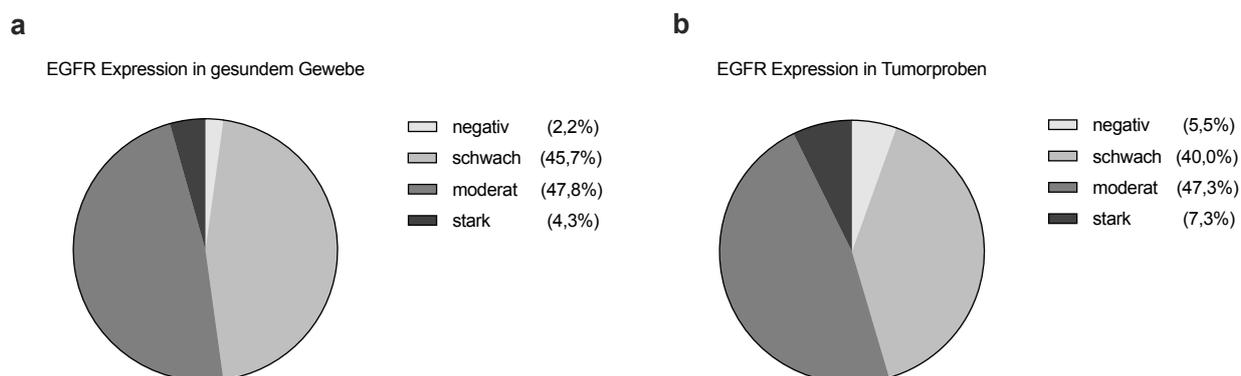


Abb. 6: Verteilung der Färbeintensitäten für EGFR im HNSCC (**b**, n = 55) und in gesundem Randgewebe (**a**, n = 46). Im Vergleich zum gesunden Umgebungsgewebe ist der EGFR in Tumorproben nicht signifikant überexprimiert. FFPE-Schnitte der Berliner Biopsate wurden unter Verwendung des primären anti-EGFR Antikörpers D38B1 (Cell Signaling Technologies®) nach IHC-Protokoll gefärbt, die Färbeintensitäten beurteilt und anhand einer vierstufigen Skala einer Gruppe zugeordnet. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. (2018), Abb. 5.

Für den EGFR zeigte die IHC in Khaznadar et al. (2018) ein vergleichbares Muster der Rezeptorexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe (Abb. 6). Auch wenn insgesamt etwas mehr Tumorproben eine starke Färbung aufwiesen (4,3 % Normalgewebe versus 7,3 % Tumor), war histologisch keine generelle Überexpression

des EGFR in Tumorproben erkennbar. Es fiel auf, dass proliferationsfähige Keratinozyten in der Basalzellschicht gesunder Epithelien den EGFR in unterschiedlichem Maße exprimierten und diese Expression zur Epitheloberfläche hin abnahm. Wurden Tumor- und jeweiliges Normalgewebe paarweise miteinander verglichen so zeigte sich, dass Tumorzellen die EGFR-Expression basaler Epithelzellen im Mittel nicht übertreffen (Abb. 7).

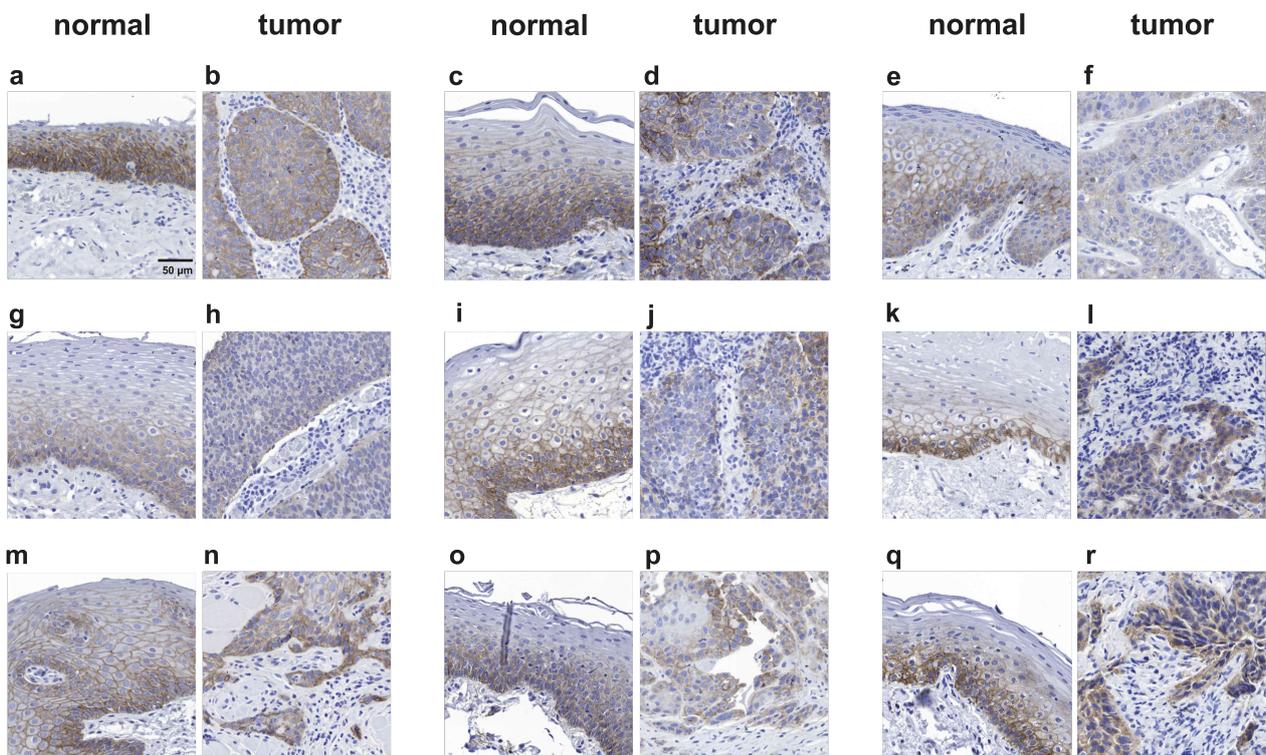


Abb. 7: EGFR-Expression in Tumor und Normalgewebe neun verschiedener Gewebepaare. Dargestellt sind jeweils repräsentative Paare von Tumor (rechtes Panel) und dazugehörigem Normalgewebe (linkes Panel) eines Patienten (a-b Patient 28, c-d Patient 41, e-f Patient 63, g-h Patient 26, i-j Patient 42, k-l Patient 43, m-n Patient 48, o-p Patient 49, q-r Patient 50). In normalen Epithelien nimmt die Färbeintensität nach basal zu. Im Vergleich zu gesunden Epithelien der Basalzellschicht ist EGFR in Tumorproben nicht überexprimiert. FFPE-Schnitte der Berliner Biopsate wurden unter Verwendung des primären anti-EGFR Antikörpers D38B1 (Cell Signaling Technologies®) nach IHC-Protokoll gefärbt. Zellkerne wurden durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin sichtbar gemacht (blau-violett). Der eingezeichnete Maßstab von 50 µm (a) gilt für a-r. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. (2018), Abb. 4.

Analog zu den Zelllinien erfolgte auch bei den klinischen Proben eine Quantifizierung von Rezeptorexpression und -phosphorylierung (Khaznadar et al. 2018). Im Mittel fielen Tumorproben im Vergleich zum gesunden Gewebe zwar durch eine leicht erhöhte Gesamtexpression auf, jedoch war die Menge an phosphoryliertem Rezeptorsignal pro μg Protein signifikant geringer (Abb. 8).

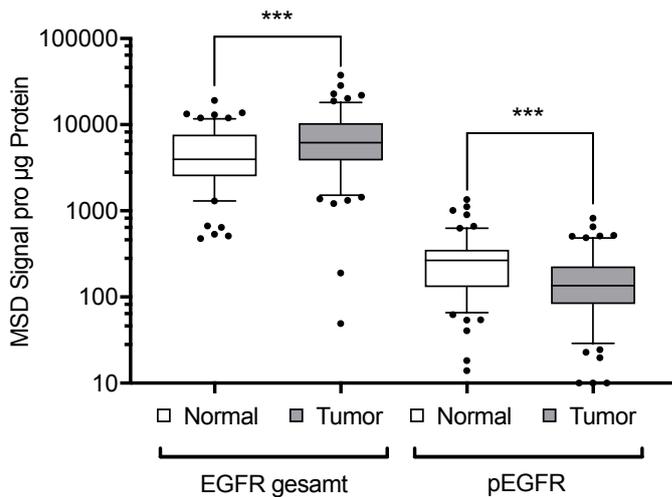


Abb. 8: EGFR-Expression und Phosphorylierung im Normal- ($n = 60$) und Tumorgewebe ($n = 63$). Im Mittel wird der EGFR im Tumorgewebe zwar stärker exprimiert, jedoch ist die Rezeptorphosphorylierung im Vergleich zum gesunden Gewebe signifikant erniedrigt. Kryokonservierte Gewebeprouben wurden lysiert und auf einen Proteingehalt von $20 \mu\text{g}$ normiert. Die Messung der Proben erfolgte mittels Elektro-Chemilumineszenz-basiertem Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery®, MSD). Angegeben sind Mittelwerte für Phosphotyrosin-1173 (pEGFR) oder gesamt-EGFR-Signal pro μg Protein. Die Ausdehnung der Boxen entspricht Interquartilsabständen. Whisker markieren 1,5-fache Interquartilsabstände. Unterschiede zwischen den Gewebepaaren wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben auf Signifikanz geprüft. *** $p < 0,001$. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. (2018), Abb. 2A und 2B.

Das maximal gemessene pEGFR-Signal unter allen Tumorproben betrug $0,82 \times 10^3$ pro μg Protein. Dieser Wert liegt unterhalb der zuvor definierten Schwelle für ein pEGFR-Mindestsignal von 1×10^3 pro μg Protein und damit außerhalb des Responderbereiches. Würde die im Zellkulturmodell entwickelte Responderhypothese auf die klinischen Proben angewandt werden, so wäre eine Erlotinib-induzierte Hemmung der Tumorzellen nicht zu erwarten.

Werden Phosphorylierungssignal und Rezeptorexpression der Proben gegeneinander aufgetragen, so können überproportionale Signale anhand des Abstandes zur Regressionsgeraden (Ausreißer) abgelesen werden. Relativ zum Expressionslevel zeigten zwei Proben einen erhöhten Wert für pEGFR (Anhang 6).

12 von 14 HNSCC-Linien wurden durch Erlotinib konzentrationsabhängig in ihrer Proliferation gehemmt und exprimierten EGFR (Median: $31,1 \times 10^3$ pro μg Protein). Im Gegensatz dazu zeigten die Tumورproben deutlich niedrigere Expressionslevel (Median: $6,2 \times 10^3$ pro μg Protein) (Abb. 9a). Die gemessenen Signale für pEGFR lagen sogar unterhalb der Signale Erlotinib-unempfindlicher HNSCC-Linien (Median für resistente Linien: $0,88 \times 10^3$ versus Median für Tumor: $0,13 \times 10^3$ pro μg Protein) (Abb. 9b). Hinsichtlich Rezeptoraktivität und EGFR-Abhängigkeit repräsentieren Zelllinien beim HNSCC nicht die klinische Situation.

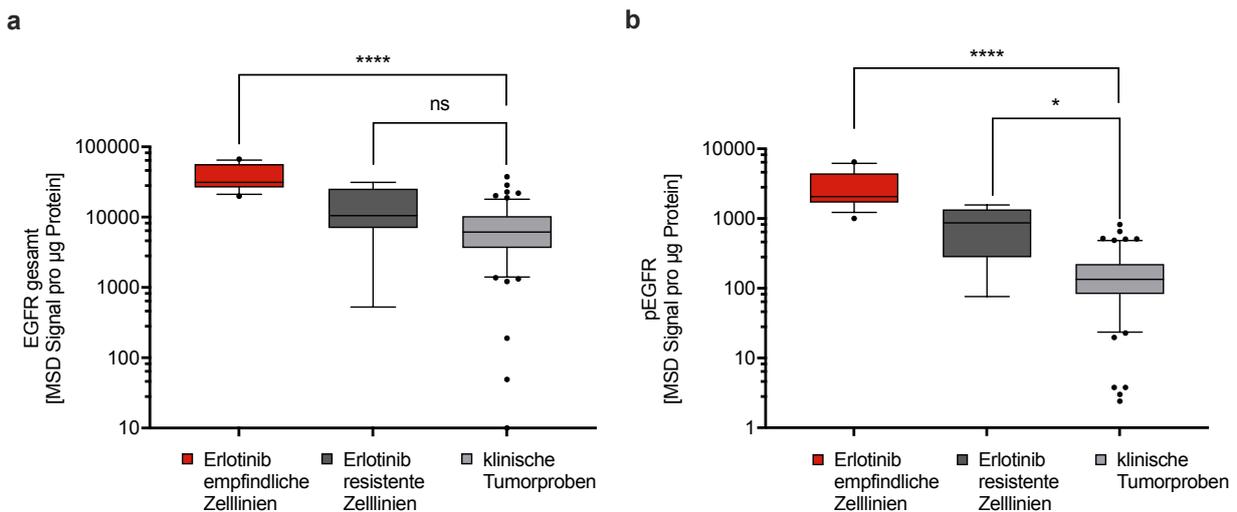


Abb. 9: Unterschiede in EGFR-Expression (**a**) und Phosphorylierung (**b**) zwischen Zelllinien und Tumoren. Im Kontrast zu Erlotinib-empfindlichen Zelllinien sind sowohl Expression als auch Phosphorylierung im Tumorgewebe deutlich erniedrigt. Zelllinien repräsentieren für die EGFR Aktivität im HNSCC nicht die klinische Situation. Gewebe und Zelllysate wurden vor Analyse auf einen Proteingehalt von $20 \mu\text{g}$ normiert. Die Messung der Proben erfolgte mittels Elektro-Chemilumineszenz-basiertem Sandwich-Immunassay (Meso Scale Discovery®, MSD). Angegeben sind Mittelwerte für Phosphotyrosin-1173 (pEGFR) oder gesamt-EGFR-Signal pro μg Protein. Die Ausdehnung der Boxen entspricht Interquartilsabständen. Whisker markieren 1,5-fache Interquartilsabstände. Gruppenunterschiede zwischen Erlotinib-empfindlichen Zelllinien ($n = 13$), Erlotinib-resistenten Zelllinien ($n = 6$) und klinischen Tumورproben ($n = 63$) wurden mittels Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis inklusive Post-hoc-Test nach Dunn

auf Signifikanz geprüft. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. (2018), Abb. 3A und 3B.

Im Kontrast zum EGFR, welcher von Basalzellen gesunder Epithelverbände auch moderat bis stark exprimiert wurde, ließen sich normale Keratinozyten für MET hingegen nur sehr schwach immunhistochemisch anfärben (Abb. 10) (Khan et al. 2020). Einige Tumorproben exprimierten MET jedoch deutlich (in 37 % der Fälle moderat und in 5 % stark). Bestätigt wurde diese Beobachtung durch Quantifizierung der Expression im Sandwich-Immunassay (Abb. 11) (Khan et al. 2020). Die Expression im Tumor lag dabei im Mittel um den Faktor drei höher als im Normalgewebe (305 ± 51 versus 98 ± 14 pro μg Protein). Auch wenn manche Tumore MET überexprimierten, waren die Rezeptoren sowohl im Tumor als auch im gesunden Gewebe nur minimal phosphoryliert und damit zum Zeitpunkt der Probengewinnung funktionell überwiegend inaktiv.

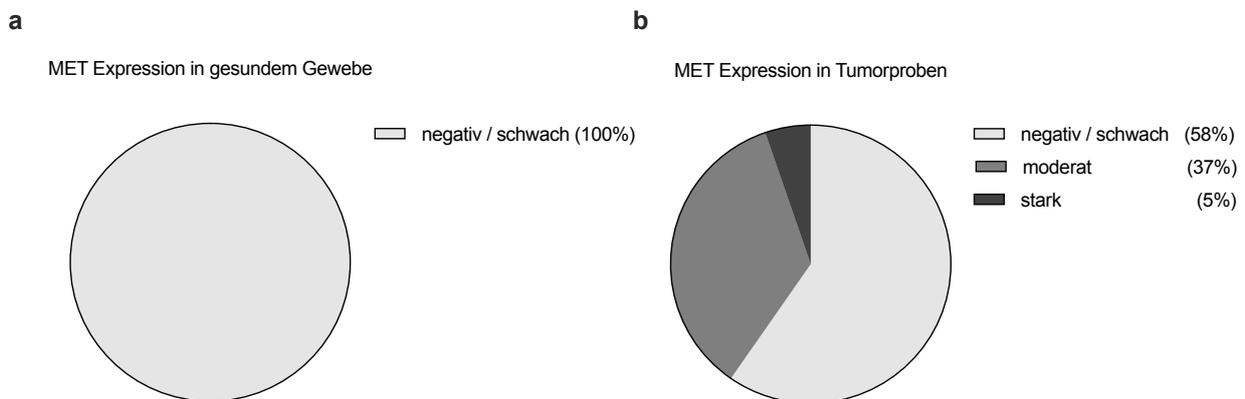


Abb. 10: Verteilung der Färbeintensitäten für MET in Tumorproben (**b**, $n = 57$) und gesundem Randgewebe (**a**, $n = 51$). Während einige Tumorproben eine moderate bis starke Expression besaßen, zeigte gesundes umliegendes Gewebe lediglich eine negative oder schwache Anfärbung in der basalen Epithelzellschicht. FFPE-Schnitte der Berliner Biopsate wurden unter Verwendung des primären anti-MET Antikörpers SP44 (Spring Bioscience™) nach IHC-Protokoll gefärbt, die Färbeintensitäten beurteilt und anhand einer dreistufigen Skala einer Gruppe zugeordnet. Abbildung adaptiert aus Khan et al. (2020), Abb. 1.

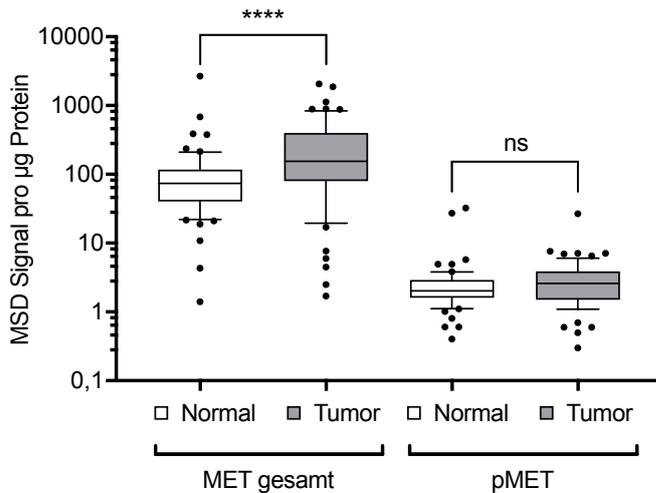


Abb. 11: MET-Expression und Phosphorylierung im Normal- (n = 60) und Tumorgewebe (n = 63). MET wird im Tumorgewebe zwar leicht überexprimiert, jedoch sind die Rezeptoren sowohl im gesunden Gewebe als auch im Tumor nur minimal phosphoryliert und damit inaktiv. Kryokonservierte Gewebeprouen wurden lysiert und auf einen Proteingehalt von 20 µg normiert. Die Messung der Proben erfolgte mittels Elektro-Chemilumineszenz-basiertem Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery®, MSD). Angegeben sind Mittelwerte für Phosphotyrosin-1349 (pMET) oder gesamt-MET-Signal pro µg Protein. Die Ausdehnung der Boxen entspricht Interquartilsabständen. Whisker markieren 1,5-fache Interquartilsabstände. Unterschiede zwischen den Gewebepaaren wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben auf Signifikanz geprüft. **** p < 0,0001. Abbildung adaptiert aus Khan et al. (2020), Abb. 5A und 5B.

Im Vergleich zu den BAY-853474-empfindlichen Magenkarzinomlinien, sprach keine der HNSCC-Linien in Proliferationsexperimenten auf den Inhibitor an (Khan et al. 2020). Die im Sandwich-Immunoassay gemessenen Signale für MET und pMET lagen weit unterhalb der Signale, welche in den BAY-853474-empfindlichen Magenkarzinomlinien gemessen wurden (Abb. 12). Tumorproben zeigten eine noch deutlich niedrigere Expression und insbesondere Phosphorylierung von MET. Aufgezeichnete Signale waren um Größenordnungen kleiner als die der MET-unabhängigen HNSCC-Linien. Absolute Werte für pMET lagen dabei nur knapp über dem Hintergrundsignal.

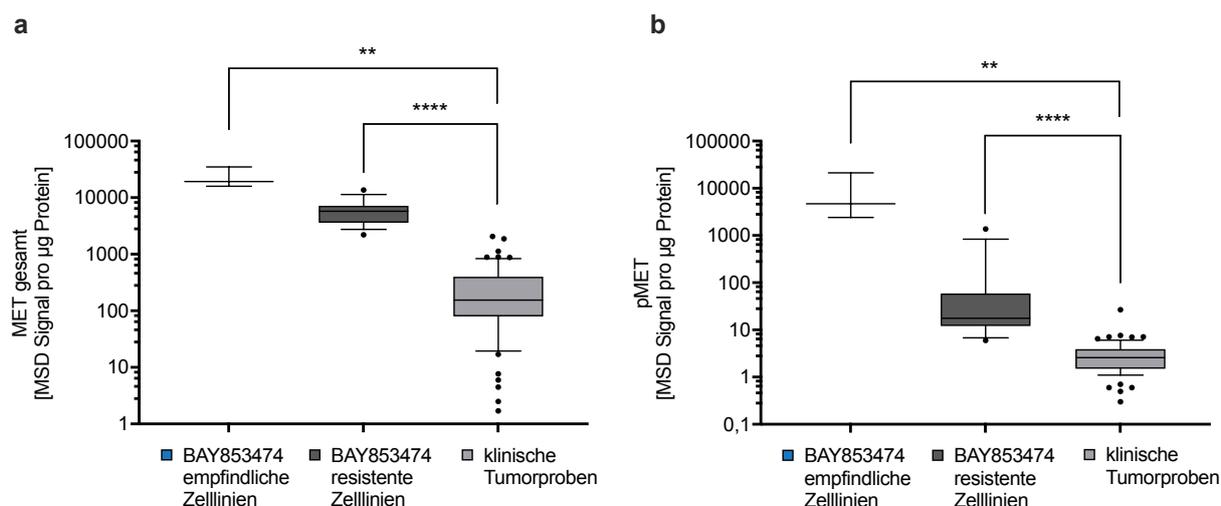


Abb. 12: Vergleich von BAY-853474-empfindlichen Magenkarzinom-, resistenten HNSCC-Zelllinien und klinischen Tumorproben hinsichtlich Expression (a) und Phosphorylierung (b) von MET. Sowohl Expression als auch Phosphorylierung von MET sind im Tumorgewebe um Größenordnungen geringer als in BAY-853474-empfindlichen oder resistenten Zelllinien. Die Level für die Rezeptorphosphorylierung liegen nur knapp oberhalb des Hintergrundsignals. Gewebe und Zellysate wurden vor Analyse auf einen Proteingehalt von 20 μg normiert. Die Messung der Proben erfolgte mittels Elektro-Chemilumineszenz-basiertem Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery®, MSD). Angegeben sind Mittelwerte für Phosphotyrosin-1349 (pMET) oder gesamt-MET-Signal pro μg Protein. Die Ausdehnung der Boxen entspricht Interquartilsabständen. Whisker markieren 1,5-fache Interquartilsabstände. Gruppenunterschiede zwischen BAY-853474-empfindlichen Zelllinien (n = 3), BAY-853474-resistenten Zelllinien (n = 14) und klinischen Tumorproben (n = 62) wurden mittels Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis inklusive Post-hoc-Test nach Dunn auf Signifikanz geprüft. ** p < 0,01, **** p < 0,0001. Abbildung adaptiert aus Khan et al. (2020), Abb. 5C und 5D.

1.3.4 Korrelation von EGFR und MET mit klinisch-pathologischen Parametern und Prognose

Das Level der Rezeptorexpression klinischer Proben wurde auf Korrelationen mit verschiedenen Parametern der Spender überprüft. Bezogen auf die gesamte Kohorte wurden für folgende Parameter keine signifikanten Korrelationen mit EGFR oder MET gefunden: Alter der Patienten, Geschlecht, Tumorlokalisierung und -stadium, Lymphknoten- oder Fernmetastasierung, Tabak- oder Alkoholkonsum. Aussagen zur Korrelation zwischen EGFR/MET-Expression und HPV-Status waren nicht abzuleiten, da nur sporadisch Angaben zum HPV-Status der Spender vorlagen. Aufgrund von noch nicht

vollständig verfügbaren Follow-up Daten der Berliner Kohorte war eine Beurteilung des prognostischen Werts der EGFR-Expression nicht möglich.

Die Verfügbarkeit von Follow-up-Daten zu den Spendern der Finnischen Biopsate ermöglichte jedoch die retrospektive Analyse der prognostischen Bedeutung von MET (Khan et al. 2020). Hierfür wurden die Färbeintensitäten der IHC mit den Daten zum 5-Jahres-Überleben korreliert. Patienten deren Tumorproben MET entweder moderat oder stark exprimierten, zeigten ein signifikant kürzeres medianes Gesamtüberleben als Patienten mit Tumorproben die MET negativ oder schwach exprimierten (35 Monate und 59 Monate, $p=0,02$, Abb. 13). Der Unterschied im erkrankungsfreien Überleben sowie die multivariate Analyse erreichten keine Signifikanz.

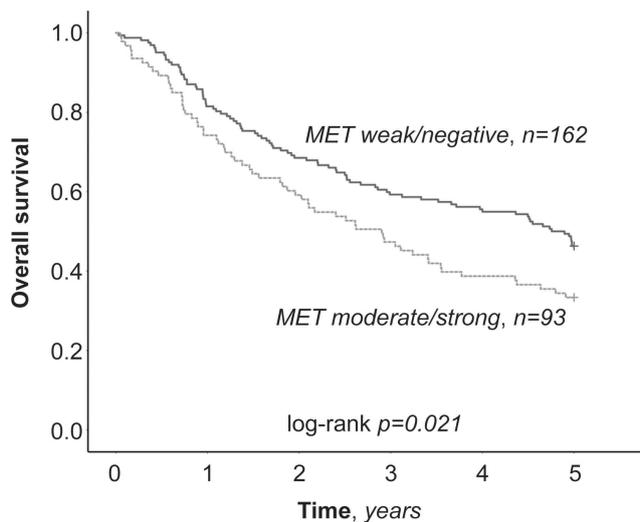


Abb. 13: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens zwischen den Subgruppen MET negativ/schwach und MET moderat/stark. MET-Expression hat einen statistisch signifikanten Einfluss auf das mediane Gesamtüberleben. Als Basis für die Anfertigung der Abbildung dienten follow-up Daten zu den Spendern der Biopsate aus Finnland ($n = 255$).

Abbildung übernommen aus Khan et al. (2020), Abb. 6b und veröffentlicht mit Genehmigung von Dr. Martin Khan und Dr. Oliver von Ahsen. Untersuchung und Datenerhebung durch Dr. Johannes Routila und Dr. Sami Ventelä.

1.4 Diskussion

1.4.1 Expression von EGFR und MET in HNSCC-Tumoren und -Zelllinien

Der EGFR ist ein Transmembranprotein aus der ErbB-Rezeptorfamilie und reguliert in Epithelien unter anderem Zellabläufe wie Proliferation, Apoptose, Adhärenz und Invasion (Normanno et al. 2006).

MET ist der Rezeptor des physiologischen Wachstumsfaktors HGF und gehört wie der EGFR zum Typ der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Im Gegensatz zum EGFR wird MET jedoch kaum von gesunden Plattenepithelien des Kopf- und Halsbereiches exprimiert (Nisa et al. 2020).

Beim HNSCC wurden sowohl für EGFR als auch für MET Überexpressionen in klinischen Proben und etablierten Tumorzelllinien beschrieben (Grandis et al. 1998; Dassonville et al. 1998; Etienne et al. 1999; Morello et al. 2001, Ozanne et al. 1986). Darüber hinaus demonstrierten Experimente im Zellkulturmodell eine Hemmbarkeit von Tumorzellen durch EGFR- und MET-Inhibitoren (Seiwert et al. 2009; Xu et al. 2011). Auf Basis solcher Beobachtungen leiteten zahlreiche Übersichtsarbeiten eine funktionelle Relevanz bei der Entstehung und Progression des HNSCC ab und sahen in EGFR und MET potenzielle therapeutische Zielstrukturen in der Indikation (Concu et al. 2018; Marquard et al. 2020; Seiwert et al. 2009; Solomon et al. 2018; Suh et al. 2014; Worden und Sacco 2016).

Diese Arbeit untersuchte und quantifizierte die Expressionslevel beider Rezeptoren in klinischen Tumorproben und etablierten Zelllinien des HNSCC. Um variierende Verhältnisse von Tumorzellen zu Tumorstroma in die Analyse einzubeziehen, wurden Experimente zur Rezeptorquantifizierung (MSD Sandwich-Immunoassay) ergänzt durch eine qualitative Analyse der Proben mittels immunohistochemischer Anfärbung für EGFR (Khaznadar et al. 2018) oder MET (Khan et al. 2020). Bei der Beurteilung klinischer Proben wurden Färbeintensität und -verteilung sowohl in Tumorzellverbänden als auch in gesunden Randbereichen paariger Patientenproben bewertet.

Die Ergebnisse in Khaznadar et al. (2018) bestätigen, dass EGFR von kultivierten Tumorzellen *in vitro* stark exprimiert wird. Jedoch konnte entgegen früheren Berichten in der Mehrheit der Tumorproben keine Überexpression gezeigt werden. Tumorproben hatten zwar signifikant erhöhte Signale für EGFR im Immunoassay, allerdings zeigte die

Auswertung der IHC, dass die Expression auf dem Level einer individuellen Tumorzelle gegenüber der Expression in der basalen Zellschicht gesunder Mukosa nicht erhöht war.

Basale Epithelien zeigten auch in nicht-neoplastischem Gewebe eine deutliche Anfärbbarkeit für EGFR (Khaznadar et al. 2018). Allerdings geht diese im Rahmen der Ausdifferenzierung zu Keratinozyten verloren und nimmt daher nach apikal graduell ab (Maiti et al. 2013; Rusch et al. 1997). Bereits im Rahmen einer mäßigen Dysplasie ließ sich die EGFR-Expression über das Stratum basale hinaus nachweisen (Sheikh et al. 2008). Für die korrekte Erfassung quantitativer Zusammenhänge der EGFR-Expression in homogenisierten Proben muss daher die Zusammensetzung des untersuchten Materials berücksichtigt werden.

In den Studien von Dasonville et al. und Etienne et al. wurde die Expression häufig auf Basis eines ^{125}I -EGF-Ligandenbindungstests mit homogenisiertem Material bestimmt. Der relative Tumorzellgehalt oder eine mögliche Gewebheterogenität wurden dabei nicht berücksichtigt.

Spätere Studien untersuchten EGFR im Tumorgewebe weitgehend auf IHC-Basis. Psyrrri et al. (2005) stellte zwar die starke Anfärbbarkeit der Tumorzellen fest, führten aber keinen Vergleich mit normaler Mukosa auf. Der Begriff Überexpression wurde oft bereits durch eine erhöhte Anzahl positiv-gefärbter Zellen definiert (Sheikh et al. 2008). Im Hinblick auf die hohe EGFR-Expression im Normalgewebe könnte dies jedoch irreführend sein und nicht beweisend für eine Abgrenzung von physiologischen Expressionsleveln. Neben dem prozentualen Anteil positiv-gefärbter Zellen sollte auch die Färbeintensität individueller Tumorzellen berücksichtigt werden.

Die vorliegende Arbeit demonstrierte, dass IHC-basierte Methoden und quantitative Verfahren (beispielsweise Sandwich-Immunassays) stets in der Zusammenschau betrachtet werden sollten. Im Vergleich zur dichotomen oder diskreten Stratifizierung bei der IHC bergen quantitative Verfahren aufgrund kontinuierlicher Parameter einen erhöhten Informationsgehalt und geben damit ein präziseres Werkzeug zur Identifizierung möglicher Biomarker ab. Hingegen ist eine Limitation von Immunassays, dass die Gültigkeit der Messwerte von der Homogenität der Tumorzellen und dem Tumor-Stroma-Verhältnis abhängen kann. Aus diesem Grund sollten quantitative Ergebnisse in Gewebeproben auch stets durch immunhistochemische Verfahren validiert werden.

Der in dieser Arbeit aufgezeigte Unterschied zwischen in-vitro und in-vivo-Expression könnte auf den starken Selektionsdruck bei der Etablierung von Zellkulturen zurückgeführt werden. Li et al. (2014) konnten zeigen, dass die Häufigkeit von Amplifikationen, insbesondere von *PIK3CA*, *HER2* und *EGFR*, in Zelllinien gegenüber Tumoren deutlich erhöht ist und erklärten dies damit, dass die Anhäufung relevanter Genamplifikationen in vitro zu einem selektiven Wachstumsvorteil der Tumorzellen führte.

Für MET konnte in beiden Probensätzen eine moderate bis starke Expression in 36-42 % der Tumoren beobachtet werden (Khan et al. 2020). Da im gesunden Randgewebe nur eine schwache oder gar keine Expression von MET zur Geltung kam, konnte die Veröffentlichung von Khan et al. (2020) die in der Literatur beschriebene Hochregulierung von MET im Tumorgewebe grundsätzlich bestätigen. Gegenüber den funktionell relevanten Positivkontrollen (Magenkarzinomlinien mit genomischer Amplifikation von *MET*) und im Kontrast zum EGFR war die Gesamtexpression in HNSCC-Zelllinien und Tumorproben jedoch deutlich schwächer.

1.4.2 Aktivität von EGFR und MET in HNSCC-Tumoren und -Zelllinien

Es sollte berücksichtigt werden, dass die Quantifizierung der Gesamtexpression die Rezeptorfunktion nicht inhärent erfasst und damit nicht notwendigerweise einen geeigneten Parameter zur Beschreibung der EGFR- oder MET-Aktivität darstellt.

Unter physiologischen Bedingungen erfordert eine Rezeptoraktivierung die Bindung des jeweiligen Liganden EGF oder HGF. Bestimmte Mutationen in *EGFR* oder *MET* können jedoch die Tertiärstruktur der Rezeptormoleküle so beeinflussen, dass diese auch ligandenunabhängig in einer aktiven Konformation stabilisiert werden. Entscheidend für die Rezeptoraktivität ist in beiden Fällen jedoch die allosterische Disinhibition der intrinsischen Tyrosinkinase, welche charakteristische Seitenketten des Rezeptors in einen phosphorylierten Zustand (pEGFR/pMET) überführt (Ferguson et al. 2008).

Um die funktionelle Relevanz des EGFR sowie von MET zu beurteilen, wurden daher in Khan et al. (2020) und Khaznadar et al. (2018) die Rezeptoraktivierung in Zell- und Gewebelysaten mittels Sandwich-Immunoassay unter Verwendung Phosphotyrosinrestspezifischer Antikörper quantifiziert. Zusätzlich wurde die Bedeutung von Rezeptorsignalen für das Wachstum und Überleben von Tumorzellen in vitro untersucht.

In Proliferationsexperimenten wurde der jeweilige Rezeptor hierfür funktionell unter Verwendung eines selektiven Inhibitors blockiert. Um zu analysieren, ob für die Tumorzelllinien ein Zusammenhang zwischen Rezeptoraktivität und einem Ansprechen auf EGFR-Inhibitor Erlotinib oder MET-Inhibitor BAY-853474 besteht, wurden die Tumorzellen anhand der jeweiligen halbmaximalen Hemmkonzentration in Inhibitor-empfindliche- und Inhibitor-resistente Linien unterteilt und die pEGFR- oder pMET-Level beider Gruppen miteinander verglichen.

Obwohl eine stärkere EGFR-Expression im homogenisierten Tumorgewebe festgestellt wurde, war die Phosphorylierung gegenüber gesundem Normalgewebe signifikant erniedrigt, was für eine geringere Rezeptoraktivität im Tumor spricht.

Im Gegensatz dazu demonstrierten Tumorzelllinien in Kultur eine deutliche EGFR-Aktivität, wobei empfindliche Linien höhere pEGFR-Signale zeigten als resistente Linien. Die Ergebnisse aus Khaznadar et al. (2018) bestätigen die grundsätzlich konzentrationsabhängige Hemmbarkeit von HNSCC-Zelllinien durch Erlotinib (Haddad et al. 2009). Mit KYSE-70 und KYSE-510 waren nur zwei der 14 Linien unempfindlich gegenüber den eingesetzten Konzentrationen von Erlotinib. Für beide Linien wurden Amplifikationen von PIK3CA (KYSE-70), c-myc und CCND1 (KYSE-510) beschrieben, welche eine funktionelle Entkopplung vom EGFR erklären könnten (Hao et al. 2012; Kozaki et al. 2006). In diesem Zusammenhang muss auch darauf hingewiesen werden, dass lediglich die Kontrollzelllinie HCC827 mit einem IC_{50} von 18 nM im Bereich der klinisch beschriebenen Serumspiegel liegt (Fiala et al. 2017). Alle getesteten HNSCC-Linien zeigten einen um mindestens Faktor 10 höheren IC_{50} -Wert, der von den klinisch erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen nicht abgedeckt werden würde. Rezeptoraktivierende Mutationen wie L858R sowie Amplifikationen im EGFR sind möglicherweise notwendig, um ein therapeutisches Fenster gegenüber dem in Normalgewebe exprimierten EGFR zu erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Responderhypothese im Zellkulturmodell formuliert, welche anhand von IC_{50} -Werten und Rezeptoraktivitäten einen Schwellenwert für pEGFR ermittelte, um Vorhersagen über das Ansprechen von Tumorzelllinien auf Erlotinib zu ermöglichen. Es wurde eine EGFR Mindestaktivität von 10^3 pEGFR-Signaleinheiten pro μg Protein identifiziert. Die Responderhypothese dieser Arbeit könnte eine Grundlage

bilden, um die Hypothese einer klinisch relevanten Mindestphosphorylierung für EGFR aufzustellen. Diese Hypothese müsste in prospektiven angelegten klinischen Studien überprüft werden. Würde ein klinisch relevanter Schwellenwert für die Rezeptoraktivität ermittelt werden, könnte dieser ein sinnvolles Einschlusskriterium zukünftiger interventioneller Studien mit EGFR-Inhibitoren darstellen.

Im Mittel war die Rezeptoraktivität im Tumor gegenüber Erlotinib-empfindlichen Zelllinien jedoch um eine Größenordnung niedriger (Khaznadar et al. 2018). Selbst Erlotinib-unempfindliche Linien zeigten signifikant höhere Phosphorylierungssignale als die Tumorproben. Bei für pEGFR unselektierten Patienten ließe sich somit möglicherweise nicht von einer ausreichend hohen Rezeptoraktivität ausgehen, welche die therapeutische und gezielte funktionelle Blockade des Rezeptors hinreichend begründen würde.

Im Unterschied zu den Zelllinien war die EGFR-Aktivität innerhalb der Tumorproben sehr heterogen verteilt (MSD-Signale variierten von 3 bis 821 pro μg Protein) (Khaznadar et al. 2018). Zwei von 63 Tumorproben besaßen eine überproportionale Rezeptoraktivität. Obwohl keine der Tumorproben die im Zellkulturmodell etablierte Aktivitätsschwelle von mindestens 10^3 Signaleinheiten pro μg Protein überschritt, spiegelte sich doch die molekulare Heterogenität des HNSCC im vorliegenden Probensatz wider. Selbst unter Berücksichtigung potenziell inhomogener Tumor-Stroma-Verhältnisse des Ausgangsgewebes liegen noch immer Größenordnungen zwischen den pEGFR-Signalen verschiedener Tumoren. Zukünftige Studien sollten daher auch zum Ziel haben, die Häufigkeit relevanter Mutationen zu untersuchen und Patienten anhand ihres genetischen und molekularen Tumorprofils aktiv zu stratifizieren.

Zelllinien spiegelten die klinische Situation beim HNSCC nicht wider. EGFR-Expression und Phosphorylierung waren überrepräsentiert (Khaznadar et al. 2018). Zudem zeigten die Tumorzellen *in vitro* eine artifizielle Abhängigkeit vom EGFR. Aus diesem Grund sollten Erkenntnisse aus dem Zellkulturmodell nur mit Vorsicht als Argumentationsgrundlage für Entscheidungsprozesse bei der klinischen Entwicklung von anti-EGFR-Therapeutika herangezogen werden.

Trotz intensiver klinischer Erprobung führte bisher keine Studie zur Zulassung eines niedermolekularen EGFR-Inhibitors für die Behandlung des HNSCC (Cohen et al. 2003;

Soulieres et al. 2003; Stewart et al. 2009; William et al. 2017). Erlotinib und Gefitinib sind hochpotente, EGFR-selektive TKIs der ersten Generation, welche für die Indikation des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) entwickelt wurden. Interessanterweise konnte beim NSCLC gezeigt werden, dass nicht die Expression des EGFR, sondern aktivierende Mutationen für ein therapeutisches Ansprechen entscheidend waren (Lynch et al. 2004). Insbesondere bei NSCLC Patienten mit aktivierender EGFR- Mutation (mit Ausnahme von T790M) konnte ein Kausalzusammenhang zwischen Rezeptorblockade und klinischem Nutzen demonstriert werden (Lynch et al. 2004; Pao et al. 2004; Yun et al. 2008). Im Gegensatz zum NSCLC treten relevante Mutationen beim HNSCC jedoch deutlich seltener auf (Leemans et al. 2018; Solomon et al. 2018). Der hohe Anteil an Tumoren mit Wildtyp-EGFR könnte ein Grund dafür sein, weshalb niedermolekulare EGFR-Inhibitoren einen klinischen Nutzen in unselektierten Patientenkohorten nicht abbilden konnten. Unter Berücksichtigung der hohen Anzahl laufender und geplanter klinischer Studien mit TKIs (Anhang 7), wäre eine kritische Einbeziehung der in dieser Arbeit dargestellten, möglicherweise grundsätzlich den Erfolg limitierenden, Zusammenhänge zu erwägen.

Im Gegensatz zu der hier hinterfragten Rolle der TKIs wurde für anti-EGFR Antikörper wie Cetuximab oder Zalatumumab die Wirkung klinisch belegt (Machiels et al. 2011; Saloura et al. 2014; Vermorken et al. 2007; Vermorken et al. 2008). Im Hinblick auf die Misserfolge bei der klinischen Erprobung selektiver TKIs beim HNSCC sowie unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Khaznadar et al. (2018), erscheint ein Wirkmechanismus monoklonaler Antikörper der allein auf einer funktionellen Rezeptorblockade des EGFR beruht als unwahrscheinlich. Möglich wäre, dass auch eine immunologische Komponente für den klinischen Nutzen von Cetuximab entscheidend ist. So beschrieben Kawaguchi et al. (2007) erstmals die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) als einen möglichen Mechanismus. Bei der ADCC markiert der Fc-Abschnitt des an das Tumorantigen (EGFR) gebundenen Antikörpers die Tumorzelle für das Immunsystem. NK-Zellen sind mit Fc γ -Rezeptoren ausgestattet, welche den Fc-Abschnitt binden und zytotoxische Effektormechanismen in den Tumorzellen einleiten können. Eine andere Studie untersuchte die Effekte eines Antikörpers (ARGX-111) in einer ADCC-aktiven und -inaktiven Form auf die Tumorgröße von HNSCC-Xenografts und demonstrierte, dass der

ADCC-Mechanismus eine deutlich gesteigerte Anti-Tumoraktivität hervorrief (Hultberg et al. 2015).

Obwohl MET gegenüber gesundem Gewebe in den Tumoren überexprimiert wurde, zeigte die Analyse der Phosphotyrosinreste in der Veröffentlichung von Khan et al. 2020, dass die durchschnittliche Aktivität von MET beim HNSCC vernachlässigbar gering ist. Die Erkenntnisse aus dem Zellkulturmodell und den klinischen Proben zeigten übereinstimmend, dass Signale für Phosphorylierung in HNSCC-Linien und -Tumoren sich um zwei bis drei Größenordnungen von den Signalen der Positivkontrollen unterschieden. Insbesondere die Tumorproben demonstrierten Signale für pMET, die so niedrig waren, dass sie sich kaum von den jeweiligen Hintergrundsignalen abhoben. Im Gegensatz zu den Hemmexperimenten des EGFR mit Erlotinib sprach auf eine MET-Inhibition mit BAY-853474 (in Konzentrationen von bis zu 1 μ M) jenseits der MET-abhängigen Magenkarzinomlinien SNU-5, MKN-45 und HS746T keine der 14 im Proliferationsassay untersuchten HNSCC-Zelllinien an.

Seiwert et al. (2009) untersuchten die Expression von MET und die Proliferationsfähigkeit von Zellkulturen unter Verwendung des MET-Inhibitors SU11274. Die Autoren der Studie leiteten eine funktionelle Relevanz von MET beim HNSCC ab und beriefen sich dabei sowohl auf die erhöhte Gesamtexpression im Tumor, welche diese Arbeit bestätigt, als auch auf die Hemmbarkeit von Tumorzellen *in vitro*, welche diese Arbeit jedoch nicht bestätigt. Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit ist eine funktionelle Relevanz der Signalaktivität von MET weder für die Zelllinien noch für die klinische Situation beim HNSCC ableitbar (Khan et al. 2020). Es ist denkbar, dass in der Studie von Seiwert et al. (2009) höhere Konzentrationen des potenten Inhibitors verwendet wurden, als für die spezifische Hemmung der intrinsischen Kinasefunktion notwendig gewesen wäre (Beizaei et al. 2018). Mit IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich tritt der beobachtete Hemmeffekt in den Proliferationsstudien von Seiwert et al. (2009) in einem Konzentrationsbereich auf, welcher off-target-Effekte hervorrufen kann und einen unspezifischen Wirkmechanismus, wie beispielsweise eine ungezielte Hemmung zellulärer Kinasen, wahrscheinlich macht.

Die geringe gemessene Aktivität von MET beim HNSCC spricht gegen das gehäufte Vorkommen aktivierender Mutationen in der Indikation. Tatsächlich belegen mehrere Studien diese Annahme und geben die Frequenz für relevante Genveränderungen

innerhalb intrazellulärer Domänen von *MET* mit 0-14 % an (Ghadjar et al. 2009; Kong et al. 2020; Morello et al. 2001; Seiwert et al. 2009). Untermauert wird dies durch eine aktuelle molekulargenetische Analyse von Tumorprofilen von 1.637 HNSCC-Patienten (Chu et al. 2019). Die Autoren der Studie fanden genetische Veränderungen von *MET* in nur 0,24 % der Proben. Bei den meisten dieser Studien erfolgte die Sequenzierung aus Gewebeproben des Primärtumors. Interessant ist, dass eine deutlich erhöhte Mutationsfrequenz in Lymphknotenmetastasen gefunden wurde und deshalb die Vermutung geäußert wurde, dass *MET* eher in den Prozess der Tumorevolution und Metastasierung des HNSCC involviert sein könnte (Di Renzo et al. 2000; Rothenberger und Stabile 2017).

Bisher wurden keine *MET*-Inhibitoren für das HNSCC zugelassen. Eine Studie mit dem *MET*-Inhibitor Foretinib demonstrierte kein klinisches Ansprechen bei unselektierten Patienten (Seiwert et al. 2013). Unter der Annahme, dass *MET* eine Resistenz gegen anti-EGFR-Therapien vermitteln könnte, erfolgte die klinische Testung einer dualen Hemmung bei Cetuximab-vorbehandelten Patienten (Alsahafi et al. 2019). Trotz vielversprechender Ergebnisse in präklinischen Modellen profitierten die Studienteilnehmer nicht von einer Kombination aus *MET*-Inhibitor und Cetuximab (Delord et al. 2020; Kochanny et al. 2020). Lediglich die Kombination des humanisierten anti-HGF-IgG1 Antikörpers Ficlatusumab mit Cetuximab zeigte eine Anti-Tumoraktivität mit einer Ansprechrate von 17 % und einem Gesamtüberleben von 8,2 Monaten bei Patienten, die unter Vorbehandlung mit Cetuximab allein einen Progress erlitten hatten (Bauman et al. 2017). Allerdings handelte es sich dabei um eine einarmige Studie der Phase I mit nur 14 Teilnehmern. Es bleibt abzuwarten, ob sich dieser klinische Vorteil in einer laufenden, randomisierten Phase-II-Studie mit 74 Teilnehmern bestätigen wird (NCT03422536, Anhang 7).

Die in dieser Arbeit gezeigte geringe funktionelle Aktivität von *MET* in den Tumorproben könnte ein Erklärungsansatz für die bisher fehlende klinische Wirksamkeit *MET*-spezifischer Inhibitoren sein (Khan et al. 2020).

1.4.3 Prognostische Rolle von *MET*

In dem in dieser Arbeit ausgewerteten Probensatz aus Finnland konnte zwar eine korrelative Tendenz beobachtet werden, jedoch wurde in multivariater Analyse kein

signifikanter, unabhängiger Einfluss der MET-Expression auf die 5-Jahres-Überlebensraten erkannt (Khan et al. 2020). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang von MET-Immunreaktivität und Gesamtüberleben wurde jedoch post-hoc zwischen den Gruppen mit moderater/starker Anfärbung für MET und negativ/schwacher Anfärbung festgestellt (35 gegenüber 59 Monate, $p = 0,02$).

Die Bedeutung von MET als Prognosemarker beim HNSCC wird auch in der Literatur kontrovers diskutiert (Vsiansky et al. 2018). So untersuchten mehrere Arbeitsgruppen retrospektiv mögliche Zusammenhänge zwischen der MET-Expression und Prognosedaten von Patienten in fortgeschrittenen Stadien. Hierfür wurden klinische Proben meist anhand immunhistochemischer MET Färbungen ausgewertet.

Einige Autoren berichteten von signifikanten Korrelationen zwischen der Rate MET-positiver Tumorzellen und dem Gesamtüberleben der Patienten (Baschnagel et al. 2017; Fiedler et al. 2017; Rosko et al. 2016). Darüber hinaus beobachteten Kim et al. 2015 ein signifikant höheres Vorkommen von Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit stark MET-positiven Tumorproben.

Andere Studien kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass MET keine Aussagen zu Prognose und klinisch-pathologischen Parametern liefert. Zum Beispiel werteten Freudlsperger et al. (2010) Proben von 211 HNSCC-Patienten aus und fanden für MET weder einen Zusammenhang zwischen Expression und TNM-Status noch Gesamt- oder erkrankungsfreiem Überleben. Eine noch größere Analyse von 335 Patientenproben durch Cho et al. (2016) kam zu dem Ergebnis, dass innerhalb der Subgruppe R0-resezierter Patienten ein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von MET und dem Gesamtüberleben besteht. Auf die gesamte Kohorte bezogen zeigte sich jedoch nur ein nicht signifikanter Trend.

Grundsätzlich stellt sich die Frage nach möglichen Ursachen für die kontroverse Studienlage.

Viele Arbeiten, welche einen Zusammenhang belegen konnten, verwendeten Stichprobenumfänge von teilweise deutlich unter 100 Proben (Fiedler et al. 2018; Kim et al. 2015; Rosko et al. 2016).

Eine Hürde für Metaanalysen ist die mangelnde Vergleichbarkeit zwischen den Studien, die auf inhomogene Auswertverfahren zurückführbar ist. Fast jede Studie legte die

Kriterien zur Bewertung der IHC Färbungen selbst fest. So wird von den meisten Autoren lediglich die Rate positiv-gefärbter Tumorzellen bestimmt ohne jeglichen Bezug zur Färbeintensität. Für Fiedler et al. (2018) galt ein Präparat als MET-überexprimierend, wenn mehr als 80 % der Zellen für MET positiv waren. Für Freudlsperger et al. (2010) wurde der cut-off schon bei 50 % gesetzt. Damit fehlt eine klare einheitliche Vorgabe, welche die Einordnung der Ergebnisse eines Präparates anhand strikter Kriterien systematisch vereinheitlicht. Es kommt hinzu, dass Analysen überwiegend post-hoc durchgeführt wurden.

Eine potenzielle Fehlerquelle kann auch die unspezifische Anfärbung durch nicht optimal validierte Antikörper darstellen. Eine retrospektive Analyse von Patienten mit R/M HNSCC untersuchte beispielsweise die prognostische Aussagekraft der Rezeptorphosphorylierung und assoziierte höhere pMET-Signalaktivität mit einer schlechteren Prognose (Madoz-Gúrpide et al. 2015). Allerdings wurde in dieser Arbeit ein phospho-MET Antikörperklon (3D7, pY1234/1235) verwendet, welcher auf Basis eigener Untersuchungen mit der Aktivitätsschleife des EGFR kreuzreagiert und daher von geringerer Spezifität ist.

Die Aussagekraft einzelner Übersichtsarbeiten wird durch die Heterogenität zwischen den Tumoren und Patienten abgeschwächt. So mangelt es an einer adäquaten Aufschlüsselung beobachteter Effekte nach Tumorlokalisierung und Patienteneigenschaften wie Herkunft, ethnischer Zugehörigkeit, *MET*-Mutations- oder HPV-Status. Mögliche Aussagen könnten zudem durch eine nicht repräsentative Patientenkohorte verzerrt werden. Diese Arbeit oder auch die von Routila et al. (2021) verwendete Populations-validiertes Material einer Patientenkohorte aus Finnland. Bei beiden Analysen wurde in multivariaten Verfahren nur ein nicht signifikanter Trend zwischen MET-Expression und dem Gesamtüberleben beobachtet.

Die Verwendung von homogenem TMA-Material wie in der vorliegenden Arbeit birgt den Vorteil, dass eine Vergleichbarkeit zwischen den Proben gewährleistet ist. So ist das Risiko eines technisch bedingten Fehlers durch identische experimentelle Bedingungen für alle Proben drastisch reduziert. Dennoch hängt die Qualität eines TMA von der Repräsentativität des ausgewählten Gewebezyinders ab. Damit ist eine TMA-basierte Analyse anfällig für eine Inhomogenität des Ursprungsgewebes. Die Auswertung der Proben erfolgte in der vorliegenden Arbeit zwar unabhängig durch mehrere Personen,

allerdings nicht durch einen Facharzt für Pathologie, was als mögliche Einschränkung in der Arbeit von Khan et al. (2020) angemerkt werden muss.

Obwohl die Mehrzahl der Studien zumindest eine Tendenz zwischen MET-Expression und histopathologischen oder klinischen Parametern erkannten, bleibt die tatsächliche prognostische Relevanz nach wie vor ungewiss.

Zukünftige, prospektive Beobachtungsstudien sollten in einer repräsentativen Kohorte neben Genomanalysen auch die Expression und Aktivität von MET im Tumor zum Diagnosezeitpunkt erheben und Patienten entsprechend diesen Kriterien mehreren Armen zuweisen. Hierbei könnte die mittels IHC durchgeführte qualitative Analyse von Tumorgewebe durch eine Quantifizierung von MET/pMET (beispielsweise via Immunassays) ergänzt werden. Von großer Bedeutung ist eine vereinheitlichte Skala, welche verschiedene Parameter zur Bewertung der MET-Ausprägung einbezieht und anhand klar definierter Kriterien voneinander abgrenzt.

Die in dieser Arbeit untersuchte prognostische Aussagekraft von MET basiert auf der Auswertung von Follow-up-Daten. Da diese für die Proben aus der Berliner Kohorte nicht erhoben wurden, beschränkte sich die Beurteilung auf MET.

1.4.4 Abschließende Bewertung der Fragestellungen

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der klinischen Implikation von EGFR und MET für das HNSCC und formulierte Fragestellungen zur Bedeutung der Rezeptoren als therapeutische Zielstrukturen (Fragestellung A) sowie als Biomarker mit prädiktiver (Fragestellung B) oder prognostischer (Fragestellung C) Relevanz.

Die enttäuschenden Ergebnisse klinischer Studien mit EGFR- und MET-Inhibitoren werden durch die Erkenntnisse dieser Arbeit plausibel erklärt.

Fragestellung A:

EGFR war gegenüber gesundem, anliegendem Randgewebe im Tumor auf Einzelzellniveau nicht überexprimiert und zeigte eine signifikant geringe Rezeptoraktivität. Keine der gemessenen Tumorproben demonstrierte gemäß der Responderhypothese eine ausreichend hohe EGFR-Phosphorylierung, um die Rolle eines Tumortreibers zu rechtfertigen. Darüber hinaus waren Expression und Phosphorylierung in Tumorzelllinien

artifizial überhöht und repräsentierten in Bezug auf die Implikation des EGFR nicht die klinische Situation.

Obwohl MET in Tumoren häufig überexprimiert wird, spielt der Rezeptor funktionell bei der überwiegenden Zahl der HNSCC-Patienten keine tumortreibende Rolle. Im Gegensatz zum EGFR entwickelten typische Zelllinien keine artifizielle Abhängigkeit von MET und zeigten so weder ein relevantes Maß an Phosphorylierung noch ein spezifisches Ansprechen auf MET-Inhibitoren.

EGFR und MET sind keine generellen Tumortreiber beim HNSCC und die funktionelle Blockierung der Kinasefunktion stellt keine vielversprechende Strategie für eine Standardtherapie dar.

Fragestellung B:

Der im Zellkulturmodell ermittelte Schwellenwert für pEGFR, welcher eine Erlotinib-Empfindlichkeit der Tumorzelllinien vorhersagte, wurde im Tumorgewebe nicht überschritten. Dennoch lässt sich aufgrund der beobachteten Heterogenität der pEGFR-Level verschiedener Tumorproben davon ausgehen, dass teilnehmerreiche Studien einzelne Patienten mit deutlicher Rezeptorfunktion identifizieren könnten, welche möglicherweise von einer anti-EGFR-Therapie profitieren würden.

Für MET lässt sich auf Basis der Ergebnisse und Recherchen dieser Arbeit keine klare Aussage zur prädiktiven Rolle ableiten. Das Aufstellen einer Responderhypothese ist aufgrund der nur marginal ausgeprägten Rezeptoraktivität der Tumorproben und Zellkulturmodelle nicht zulässig. Jedoch kann anhand der beobachteten Diskrepanz zwischen MET und pMET eine Patientenselektion, welche lediglich auf dem Level der Rezeptorexpression basiert, nicht befürwortet werden.

Die weitere klinische Erprobung von EGFR- oder MET-selektiven Inhibitoren ist für unselektierte Patientengruppen mit HNSCC nicht gerechtfertigt und sollte auf jene Patienten mit funktionell-abhängigen Tumoren beschränkt werden. Auch wenn das Kriterium der Expression keinen geeigneten Biomarker darstellt, lässt sich ein prädiktiver Zusammenhang zwischen Rezeptorfunktion und klinischer Wirksamkeit der jeweiligen Inhibitoren in *EGFR/MET*-mutierten Tumoren ohne klinischen Gegenbeweis zumindest nicht ausschließen.

Fragestellung C:

Die Level der EGFR- und MET-Expression korrelierten nicht mit klinisch-pathologischen Parametern wie Patientenalter, Geschlecht, Tumorlokalisierung und -stadium, Lymphknoten- oder Fernmetastasierung, kumulativem Tabak- oder Alkoholkonsum. Allerdings war MET mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Patienten, deren Tumorproben eine moderate oder starke MET-Expression im IHC-Assay aufwiesen, zeigten eine signifikante Verringerung im medianen Gesamtüberleben gegenüber Patienten mit niedriger Immunreaktivität. Möglicherweise könnte MET ein nützlicher Parameter sein, um Patienten in Hochrisikokonstellation zu identifizieren.

1.5 Zusammenfassung

Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome (HNSCC) gelten als die sechsthäufigste Krebsform und sind für 5 % aller weltweiten Todesfälle durch Tumorerkrankungen verantwortlich. Der epidermal growth factor receptor (EGFR) und die mesenchymal-epithelial transition kinase (MET) sind Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit Tyrosinkinasefunktion und können die maligne Transformation von Epithelien fördern. Beim HNSCC wurden EGFR und MET aufgrund hoher Expressionswerte zu attraktiven Zielstrukturen. Trotz vielversprechender präklinischer Ergebnisse erzielten niedermolekulare Kinaseinhibitoren dieser Rezeptoren nur eine geringe Wirksamkeit in klinischen Studien.

Die vorliegende Arbeit hinterfragt die Bedeutungen von EGFR und MET als therapeutische Zielstrukturen und prädiktive Biomarker in HNSCC. Hierfür wurden Expression und Aktivität der Rezeptoren in einem Panel von 14 Tumorzelllinien und 63 schockgefrorenen Probenpaaren aus Tumor- und gesundem Randgewebe immunhistochemisch untersucht und in Immunassays unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper quantifiziert. Das Ausmaß der EGFR/MET-Abhängigkeit von HNSCC-Zelllinien wurde in Proliferationsexperimenten überprüft.

Experimente im Zellkulturmodell zeigten, dass die Expression nicht ausschlaggebend für ein Ansprechen auf selektive Inhibitoren ist. Lediglich Zelllinien, in denen EGFR oder MET hochaktiv sind, reagierten auch empfindlich auf EGFR- oder MET-Inhibitoren. Darüber hinaus waren Expression und Phosphorylierung in etablierten Zelllinien artifiziell erhöht und repräsentierten hinsichtlich der Rezeptoraktivität der Tumorproben nicht die klinische Situation. Patienten mit starker Immunreaktivität für MET demonstrierten ein verkürztes Gesamtüberleben.

Obwohl EGFR und MET im Tumorgewebe exprimiert werden, sind die beiden Rezeptoren aufgrund geringer Aktivität für das HNSCC funktionell nicht relevant und in der Regel keine Tumortreiber. Die weitere klinische Erprobung EGFR-gerichteter Kinaseinhibitoren sollte auf jene Patienten beschränkt werden, die eine deutliche Rezeptoraktivität im Tumor aufweisen. Zukünftige Studien sollten daher die Häufigkeit aktivierender Genmutationen feststellen und Patienten mit der Diagnose eines HNSCC anhand ihres genetischen und molekularen Tumorprofils prospektiv stratifizieren. Die Expression von MET könnte jedoch prognostisch wertvoll sein, um Patienten in Hochrisikokonstellation zu identifizieren.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis* 2019; 10: 540.

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New Engl J Medicine* 2010; 363: 24–35.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695–1709.

Arnold L, Enders J, Thomas SM. Activated HGF-c-Met Axis in Head and Neck Cancer. *Cancers* 2017; 9: 169.

Baschnagel AM, Tonlaar N, Eskandari M, Kumar T, Williams L, Hanna A, et al. Combined CD44, c-MET, and EGFR expression in p16-positive and p16-negative head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2017; 46: 208–213.

Bauman JE, Duvvuri U, Ferris RL, Ohr J, Gooding WE, Kim S, et al. Phase I study of the anti-HGF monoclonal antibody (mAb), ficlatuzumab, and cetuximab in cetuximab-resistant, recurrent/metastatic (R/M) head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Clin Oncol* 2017; 35: 6038–6038.

Beizaei K, Gleißner L, Hoffer K, Bußmann L, Vu AT, Steinmeister L, et al. Receptor tyrosine kinase MET as potential target of multi-kinase inhibitor and radiosensitizer sorafenib in HNSCC. *Head Neck* 2019; 41: 208–215.

Blanchard P, Landais C, Petit C, Zhang Q, Grégoire V, Tobias J, et al. 9500 Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 100 randomized trials and 19,248 patients, on behalf of MACH-NC group. *Ann Oncol* 2016; 27: vi328.

Blaschke M, Blumberg J, Wegner U, Nischwitz M, Ramadori G, Cameron S. Measurements of 5-FU Plasma Concentrations in Patients with Gastrointestinal Cancer: 5-FU Levels Reflect the 5-FU Dose Applied. *J Cancer Ther* 2012; 2012: 28–36.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 3282–3287.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New Engl J Medicine* 2006; 354: 567–578.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca Cancer J Clin* 2018; 68: 394–424.

Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, Castro G de, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019; 394: 1915–1928.

Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer I* 2016; 108: djv403.

Cho YA, Kim EK, Heo SJ, Cho BC, Kim HR, Chung JM, et al. Alteration status and prognostic value of MET in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer* 2016; 7: 2197–2206.

Chow LQM. Head and Neck Cancer. *New Engl J Med* 2020; 382: 60–72.

Chu LP, Franck D, Parachoniak CA, Gregg JP, Moore MG, Farwell DG, et al. MET Genomic Alterations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC): Rapid

Response to Crizotinib in a Patient with HNSCC with a Novel MET R1004G Mutation. *Oncol* 2019; 24: 1305–1308.

Cohen EEW, Rosen F, Stadler WM, Recant W, Stenson K, Huo D, et al. Phase II Trial of ZD1839 in Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1980–1987.

Cohen EEW, Soulières D, Tourneau CL, Dinis J, Licitra L, Ahn M-J, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019; 393: 156–167.

Concu R, Cordeiro MNDS. Looking for New Inhibitors for the Epidermal Growth Factor Receptor. *Curr Top Med Chem* 2018; 18: 219–232.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *New Engl J Medicine* 2004; 351: 337–345.

Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1873–1878.

Delord J-P, Argilés G, Fayette J, Wirth L, Kasper S, Siena S, et al. A phase 1b study of the MET inhibitor capmatinib combined with cetuximab in patients with MET-positive colorectal cancer who had progressed following anti-EGFR monoclonal antibody treatment. *Invest New Drug* 2020; 38: 1774–1783.

Etienne MC, Pivot X, Formento JL, Bensadoun RJ, Formento P, Dassonville O, et al. A multifactorial approach including tumoural epidermal growth factor receptor, p53, thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase to predict treatment outcome in head and neck cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Brit J Cancer* 1999; 79: 1864–1869.

Fang M, Huang W, Mo D, Zhao W, Huang R. Association of Five Snps in Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 and Cancer Susceptibility: Evidence from 67 Studies. *Cell Physiol Biochem* 2018; 47: 414–427.

Ferguson KM. Structure-Based View of Epidermal Growth Factor Receptor Regulation. *Annu Rev Biophys* 2008; 37: 353–373.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; 144: 1941–1953.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: E359–E386.

Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New Engl J Medicine* 2016; 375: 1856–1867.

Fiala O, Hosek P, Pesek M, Finek J, Racek J, Stehlik P, et al. Serum Concentration of Erlotinib and its Correlation with Outcome and Toxicity in Patients with Advanced-stage NSCLC. *Anticancer Res* 2017; 37: 6469–76.

Fiedler M, Weber F, Hautmann MG, Haubner F, Reichert TE, Klingelhöffer C, et al. Biological predictors of radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Oral Invest* 2018; 22: 189–200.

Freudlsperger C, Alexander D, Reinert S, Hoffmann J. Prognostic value of c-Met expression in oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med* 2009; 1: 69–72.

Ghadjar P, Blank-Liss W, Simcock M, Hegyi I, Beer KT, Moch H, et al. MET Y1253D-activating point mutation and development of distant metastasis in advanced head and neck cancers. *Clin Exp Metastas* 2009; 26: 809–815.

Goetsch L, Caussanel V, Corvaia N. Biological significance and targeting of c-Met tyrosine kinase receptor in cancer . *Front Biosci* 2013; 18: 454.

Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3579–3584.

Grandis JR, Zeng Q, Drenning SD, Tweardy DJ. Normalization of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol* 1998; 13: 375–378.

Guha N, Boffetta P, Filho VW, Neto JE, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral Health and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck and Esophagus: Results of Two Multicentric Case-Control Studies. *Am J Epidemiol* 2007; 166: 1159–1173.

Haddad Y, Choi W, McConkey DJ. Delta-Crystallin Enhancer Binding Factor 1 Controls the Epithelial to Mesenchymal Transition Phenotype and Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Lines. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 532–542.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.

Hao J-J, Shi Z-Z, Zhao Z-X, Zhang Y, Gong T, Li C-X, et al. Characterization of genetic rearrangements in esophageal squamous carcinoma cell lines by a combination of M-FISH and array-CGH: further confirmation of some split genomic regions in primary tumors. *Bmc Cancer* 2012; 12: 367.

Harrington K, Temam S, Mehanna H, D’Cruz A, Jain M, D’Onofrio I, et al. Postoperative Adjuvant Lapatinib and Concurrent Chemoradiotherapy Followed by Maintenance Lapatinib Monotherapy in High-Risk Patients With Resected Squamous Cell Carcinoma

of the Head and Neck: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4202–4209.

Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A, et al. TRIBUTE: A Phase III Trial of Erlotinib Hydrochloride (OSI-774) Combined With Carboplatin and Paclitaxel Chemotherapy in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5892–5899.

Hidalgo M, Siu LL, Nemunaitis J, Rizzo J, Hammond LA, Takimoto C, et al. Phase I and Pharmacologic Study of OSI-774, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Malignancies. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3267–3279.

Hsu J-M, Chen C-T, Chou C-K, Kuo H-P, Li L-Y, Lin C-Y, et al. Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 174–181.

Hultberg A, Morello V, Huyghe L, Jonge ND, Blanchetot C, Hanssens V, et al. Depleting MET-Expressing Tumor Cells by ADCC Provides a Therapeutic Advantage over Inhibiting HGF/MET Signaling. *Cancer Res* 2015; 75: 3373–3383.

Ikeda K, Terashima M, Kawamura H, Takiyama I, Koeda K, Takagane A, et al. Pharmacokinetics of Cisplatin in Combined Cisplatin and 5-Fluorouracil Therapy: A Comparative Study of Three Different Schedules of Cisplatin Administration. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28: 168–75.

Jacobi N, Seeboeck R, Hofmann E, Eger A. ErbB Family Signalling: A Paradigm for Oncogene Addiction and Personalized Oncology. *Cancers* 2017; 9: 33.

Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metast Rev* 2017; 36: 411–423.

Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020; 6: 92.

Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2007; 120: 781–787.

Khan M, Khaznadar S, Routila J, Ventelä S, Schmid E, Gebhart B, et al. Hepatocyte Growth Factor Receptor overexpression predicts reduced survival but its targeting is not effective in unselected HNSCC patients. *Head Neck* 2020; 42 (4): 625–635.

Khaznadar S, Khan M, Schmid E, Gebhart S, Becker E, Krahn T, et al. EGFR overexpression is not common in patients with head and neck cancer. Cell lines are not representative for the clinical situation in this indication. *Oncotarget* 2018; 9 (48): 28965–28975.

Kim JH, Kim BJ, Kim HS. Clinicopathological impacts of high c-Met expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis and review. *Oncotarget* 2015; 5: 113120–113128.

Klanrit P, Taebunpakul P, Flinterman MB, Odell EW, Riaz MA, Melino G, et al. PML involvement in the p73-mediated E1A-induced suppression of EGFR and induction of apoptosis in head and neck cancers. *Oncogene* 2009; 28: 3499–3512.

Knebel FH, Bettoni F, Shimada AK, Cruz M, Alessi JV, Negrão MV, et al. Sequential liquid biopsies reveal dynamic alterations of EGFR driver mutations and indicate EGFR amplification as a new mechanism of resistance to osimertinib in NSCLC. *Lung Cancer* 2017; 108: 238–241.

Kochanny SE, Worden FP, Adkins DR, Lim DW, Bauman JE, Wagner SA, et al. A randomized phase 2 network trial of tivantinib plus cetuximab versus cetuximab in patients with recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2020; 126: 2146–2152.

Kong LR, Salleh NABM, Ong RW, Tan TZ, Syn NL, Goh RM, et al. A common MET polymorphism harnesses HER2 signaling to drive aggressive squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 2020; 11: 1556.

Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, et al. PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2006; 97: 1351–1358.

Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, Gabriel SB, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015; 517: 576–582.

Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 9–22.

Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2018; 18: 269–282.

Li H, Ngan H-L, Liu Y, Chan HHY, Poon PHY, Yeung CK, et al. Comprehensive Exome Analysis of Immunocompetent Metastatic Head and Neck Cancer Models Reveals Patient Relevant Landscapes. *Cancers* 2020; 12: 2935.

Li H, Wawrose JS, Gooding WE, Garraway LA, Lui VWY, Peyser ND, et al. Genomic Analysis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines and Human Tumors: A Rational Approach to Preclinical Model Selection. *Mol Cancer Res* 2014; 12: 571–582.

Linardou H, Dahabreh IJ, Bafaloukos D, Kosmidis P, Murray S. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 352–366.

Liu D, Zhong M, Zhan D, Zhang Y, Liu S. Roles of the HGF/Met signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Focus on tumor immunity. *Oncol Rep* 2020; 44: 2337–2344.

Lui VWY, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, et al. Frequent Mutation of the PI3K Pathway in Head and Neck Cancer Defines Predictive Biomarkers. *Cancer Discov* 2013; 3: 761–769.

Lv P-C, Yang Y-S, Wang Z-C. Recent Progress in the Development of Small Molecule c-Met Inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2019; 19: 1276–1288.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New Engl J Medicine* 2004; 350: 2129–2139.

Machiels J-P, Leemans CR, Golusinski W, Grau C, Licitra L, Gregoire V, et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2020; 31: 1462–1475.

Machiels J-P, Subramanian S, Ruzsa A, Repassy G, Lifirenko I, Flygare A, et al. Zalutumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2011; 12: 333–343.

Madoz-Gúrpide J, Zazo S, Chamizo C, Casado V, Caramés C, Gavín E, et al. Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *J Transl Med* 2015; 13: 282.

Mahal BA, Catalano PJ, Haddad RI, Hanna GJ, Kass JI, Schoenfeld JD, et al. Incidence and Demographic Burden of HPV-Associated Oropharyngeal Head and Neck Cancers in the United States. *Cancer Epidemiology Prev Biomarkers* 2019; 28: 1660–1667.

Maiti GP, Mondal P, Mukherjee N, Ghosh A, Ghosh S, Dey S, et al. Overexpression of EGFR in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Inactivation of SH3GL2 and CDC25A Genes. *Plos One* 2013; 8: e63440.

Marquard FE, Jücker M. PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer. *Biochem Pharmacol* 2020; 172: 113729.

Martins RG, Parvathaneni U, Bauman JE, Sharma AK, Raez LE, Papagikos MA, et al. Cisplatin and Radiotherapy With or Without Erlotinib in Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Randomized Phase II Trial. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1415–1421.

Matsumoto K, Umitsu M, Silva DMD, Roy A, Bottaro DP. Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery. *Cancer Sci* 2017; 108: 296–307.

Miranda O, Farooqui M, Siegfried JM. Status of Agents Targeting the HGF/c-Met Axis in Lung Cancer. *Cancers* 2018; 10: 280.

Morello S, Olivero M, Aimetti M, Bernardi M, Berrone S, Renzo MFD, et al. MET receptor is overexpressed but not mutated in oral squamous cell carcinomas. *J Cell Physiol* 2001; 189: 285–290.

Nisa L, Francica P, Giger R, Medo M, Elicin O, Friese-Hamim M, et al. Targeting the MET Receptor Tyrosine Kinase as a Strategy for Radiosensitization in Locoregionally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2020; 19: 614–626.

Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 1998; 10: 1563–72.

Normanno N, Luca AD, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; 366: 2–16.

O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2002; 38: 627–640.

Oijen MGCT van, Gilsing MMA, Rijksen G, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers. *Oral Oncol* 1998; 34: 297–303.

Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B. Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *J Pathology* 1986; 149: 9–14.

Page CL, Koumakpayi IH, Lessard L, Saad F, Mes-Masson A. Independent role of phosphoinositol-3-kinase (PI3K) and casein kinase II (CK-2) in EGFR and Her-2-mediated constitutive NF-kappaB activation in prostate cancer cells. *Prostate* 2005; 65: 306–315.

Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12: 175–180.

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *P Natl Acad Sci Usa* 2004; 101: 13306–13311.

Pfister DG, Spencer S, Brizel DM, Burtneess B, Busse PM, Caudell JJ, et al. Head and Neck Cancers, Version 2.2014. *J Natl Compr Canc Ne* 2014; 12: 1454–1487.

Pignon J-P, Maître A le, Maillard E, Bourhis J, Group on behalf of the M-NC. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009; 92: 4–14.

Porcheri C, Meisel CT, Mitsiadis T. Multifactorial Contribution of Notch Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 1520.

Psyrrri A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R, et al. Quantitative Determination of Nuclear and Cytoplasmic Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Cancer by Using Automated Quantitative Analysis. *Am Assoc Cancer Res* 2005; 11: 5856–5862.

Pulte D, Brenner H. Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *Oncol* 2010; 15: 994–1001.

Renzo MFD, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, et al. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* 2000; 19: 1547–1555.

Rosko AJ, Birkeland AC, Wilson KF, Muenz DG, Bellile E, Bradford CR, et al. Tumor Biomarkers in Spindle Cell Variant Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Otolaryngology Head Neck Surg* 2016; 155: 106–112.

Rothenberger NJ, Stabile LP. Hepatocyte Growth Factor/c-Met Signaling in Head and Neck Cancer and Implications for Treatment. *Cancers* 2017; 9: 39.

Routila J, Leivo I, Minn H, Westermarck J, Ventelä S. Evaluation of prognostic biomarkers in a population-validated Finnish HNSCC patient cohort. *Eur Arch Oto-rhino-l* 2021: 1–11.

Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res Official J Am Assoc Cancer Res* 1997; 3: 515–522.

Safi D, Hejleh TA, Furqan M. Narrative review: mesenchymal-epithelial transition inhibitors—meeting their target. *Transl Lung Cancer Res* 2020; 10: 462–474.

Saloura V, Cohen EEW, Licitra L, Billan S, Dinis J, Lisby S, et al. An open-label single-arm, phase II trial of zalutumumab, a human monoclonal anti-EGFR antibody, in patients

with platinum-refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemoth Pharm* 2014; 73: 1227–1239.

Seiwert T, Sarantopoulos J, Kallender H, McCallum S, Keer HN, Blumenschein G. Phase II trial of single-agent foretinib (GSK1363089) in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invest New Drug* 2013; 31: 417–424.

Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, Janamanchi V, Nallasura V, Dinali ME, et al. The MET Receptor Tyrosine Kinase Is a Potential Novel Therapeutic Target for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 3021–3031.

She Q-B, Solit DB, Ye Q, O'Reilly KE, Lobo J, Rosen N. The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell* 2005; 8: 287–297.

Sheikh A, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, et al. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 1589–1594.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6: 963–968.

Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol* 2018; 52: 228–240.

Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL. Multicenter Phase II Study of Erlotinib, an Oral Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Cancer of the Head and Neck. *J Clin Oncol* 2003; 22: 77–85.

Stein AP, Saha S, Kraninger JL, Swick AD, Yu M, Lambert PF, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer. *Cancer J* 2015a; 21: 138–146.

Stewart JSW, Cohen EEW, Licitra L, Herpen CMLV, Khorprasert C, Soulieres D, et al. Phase III Study of Gefitinib Compared With Intravenous Methotrexate for Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1864–1871.

Suh Y, Amelio I, Urbano TG, Tavassoli M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1018–e1018.

Tepper SR, Zuo Z, Khattri A, Heß J, Seiwert TY. Growth factor expression mediates resistance to EGFR inhibitors in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2016; 56: 62–70.

Tran HT, Zinner RG, Blumenschein GR, Oh YW, Papadimitrakopoulou VA, Kim ES, et al. Pharmacokinetic study of the phase III, randomized, double-blind, multicenter trial (TRIBUTE) of paclitaxel and carboplatin combined with erlotinib or placebo in patients with advanced Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Invest New Drug* 2011; 29: 499–505.

Tsang CM, Lui VWY, Bruce JP, Pugh TJ, Lo KW. Translational Genomics of Nasopharyngeal Cancer. *Semin Cancer Biol* 2019; 61: 84–100.

Velleuer E, Dietrich R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatrics* 2014; 1: 9.

Vermorcken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New Engl J Medicine* 2008; 359: 1116–1127.

Vermorcken JB, Trigo J, Hitt R, Koralewski P, Diaz-Rubio E, Rolland F, et al. Open-Label, Uncontrolled, Multicenter Phase II Study to Evaluate the Efficacy and Toxicity of Cetuximab As a Single Agent in Patients With Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Who Failed to Respond to Platinum-Based Therapy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2171–2177.

Vsiansky V, Gumulec J, Raudenska M, Masarik M. Prognostic role of c-Met in head and neck squamous cell cancer tissues: a meta-analysis. *Sci Rep-uk* 2018; 8: 10370.

Wang H, Wang Z, Zhang G, Zhang M, Zhang X, Li H, et al. Driver genes as predictive indicators of brain metastasis in patients with advanced NSCLC: EGFR, ALK, and RET gene mutations. *Cancer Med-us* 2020; 9: 487–495.

William WN, Feng L, Kies MS, Ahmed S, Blumenschein GR, Glisson BS, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II trial of first-line platinum/docetaxel with or without erlotinib (E) in patients (pts) with recurrent and/or metastatic (R/M) head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs). *J Clin Oncol* 2017; 35: 6017–6017.

Worden F, Sacco AG. Molecularly targeted therapy for the treatment of head and neck cancer: a review of the ErbB family inhibitors. *Oncotargets Ther* 2016; Volume 9: 1927–1943.

Xu H, Stabile LP, Gubish CT, Gooding WE, Grandis JR, Siegfried JM. Dual Blockade of EGFR and c-Met Abrogates Redundant Signaling and Proliferation in Head and Neck Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 4425–4438.

Yun C-H, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong K-K, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc National Acad Sci* 2008; 105: 2070–2075.

Zhang L, Poh CF, Williams M, Laronde DM, Berean K, Gardner PJ, et al. Loss of Heterozygosity (LOH) Profiles—Validated Risk Predictors for Progression to Oral Cancer. *Cancer Prev Res* 2012; 5: 1081–1089

2. Veröffentlichung 1

EGFR overexpression is not common in patients with head and neck cancer. Cell lines are not representative for the clinical situation in this indication

Sami Sebastian Khaznadar^{1,4,*}, Martin Khan^{2,3,*}, Elke Schmid¹, Sebastian Gebhart², Eva-Tessina Becker², Thomas Krahn¹ and Oliver von Ahsen¹

¹Biomarker Research, Bayer AG, 13353 Berlin, Germany

²Charite, Berlin, 13353 Berlin, Germany

³Present address: Klinikum Dahme-Spreewald GmbH, 15711 Königs-Wusterhausen, Germany

⁴Present address: University Bonn, 53113 Bonn, Germany

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Oliver von Ahsen, **email:** oliver.vonahsen@bayer.com

Keywords: HNSCC; Erlotinib; IHC; MSD; tyrosine kinase inhibitor

Received: December 15, 2017

Accepted: May 31, 2018

Published: June 22, 2018

Copyright: Khaznadar et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Background: Based on expression data, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) emerged as therapeutic target in Head and Neck Cancer but clinical efficacy of EGFR inhibitors was very limited. We reinvestigated the EGFR expression and activation status necessary for response in cell lines and compared that to clinical samples.

Methods: Clinical samples of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC, n=63), mostly from late stage (IV) and poorly or undifferentiated character and cultured cell lines (n=14) were tested by immunohistochemistry (IHC) (n=55) and sandwich immunoassays (n=63) for expression and phosphorylation of EGFR (Tyrosine-1173). Response of 14 different HNSCC cell lines to Erlotinib was tested in proliferation assays.

Results: Most HNSCC cell lines respond to Erlotinib. EGFR is phosphorylated in these cell lines. Resistant cell lines display very low level EGFR expression and phosphorylation. EGFR activity in clinical samples is significantly below that observed in cell lines. In clinical samples, EGFR is not overexpressed on the single cellular level. We show similar levels of EGFR expression in growing keratinocytes and tumor cells.

Conclusions: Cell lines are not representative of the clinical situation in HNSCC. Larger studies should investigate whether patient subgroups with activating EGFR mutations or overexpression can be identified.

INTRODUCTION

Squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract, usually summarized as head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), represent the sixth most common cancer in the world [1]. Survival rates have not been improved during the last decades, many patients develop recurrence and metastatic disease leading to 5

year survival rates below 50%. Conventional treatment strategies including surgery, radiation and chemotherapy are effective in only 50% of the patients and are associated with significant toxicities, highlighting the need for additional treatments [2]. Based on its broad expression in up to 90% of the HNSCC cases, epidermal growth factor receptor emerged as potential target for targeted therapies [3]. The relevance of EGFR was supported by

its prognostic value predicting time to relapse and overall survival [4]. The first approved targeted treatment for HNSCC is the anti-EGFR antibody Cetuximab which showed clinical efficacy in combination with cisplatin [5] and radiotherapy [6]. However, no predictive value for Cetuximab use could be derived from data on EGFR copy number, protein expression or mutation [7, 8]. This is in line with the broad expression of EGFR and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) as mode of action.

In addition to Cetuximab, the EGFR TKIs Erlotinib and Gefitinib were tested for their efficacy in clinical trials. However, the clinical experiences with EGFR TKIs in HNSCC were disappointing: A single arm study on Gefitinib monotherapy in recurrent or metastatic HNSCC observed a response rate of 10.6% [9], a multicenter phase 2 study of Erlotinib monotherapy obtained an objective response rate of 4.3% and a disease stabilization for 4 months in 38% of the patients but lacked a clear conclusion due to the lack of a control arm [10]. Addition of Erlotinib to radio-chemotherapy did not increase the CRR or PFS [11]. Addition of Gefitinib in a single arm phase 2 study did not improve the outcome of radio-chemotherapy compared to a historical control group [12].

Several groups have described factors which may cause resistance to EGFR inhibition and found Cyclin D1 overexpression [13], ErbB2, ErbB3 signaling [14] and EMT [15, 16] associated with resistance but the question how precisely the cell culture models match the clinical situation was not addressed.

Therefore, we re-evaluated EGFR as target in HNSCC in different cell lines and compared the properties of HNSCC cell lines with fresh tumor biopsies in order to validate the use of cell lines as representative of the clinical situation.

Usually, expression of therapeutic targets in tumor samples is done by immunohistochemistry. We extended the usual investigation of target expression with testing EGFR expression and also its phosphorylation by MSD immunoassays. Due to the use of two independent antibodies, the specificity of these assays is very high and also the dynamic range much wider compared to immunohistochemistry.

Tyrosine-1173 is one of the tyrosine residues in the cytoplasmic tail of EGFR which are phosphorylated in response to receptor activation. Upon activation of EGFR, several tyrosines become phosphorylated with same kinetics eg. nicely shown by Hsu and colleagues [17]. To our knowledge there is no differential regulation of different phosphorylation sites in the cytoplasmic tails of RTKs. Together with phosphotyrosine-992 and -1148, phosphotyrosine-1173 provides the docking site for the adaptor proteins SHC and Grb2 which mediate the recruitment and activation of ras downstream of EGFR activation [18, 19].

Therefore, the analysis of EGFR phosphorylation is especially useful to test for the functional relevance of the protein.

RESULTS

Erlotinib sensitivity of HNSCC cell lines

We first tested the response to Erlotinib in cell culture. We used 14 HNSCC cell lines and two control cell lines, KPL-4 as negative control without EGFR expression and HCC-827, a NSCLC cell line with an activating mutation in the EGFR gene. Table 1 shows that most of the cell lines responded well to Erlotinib with IC50 values in the submicromolar range. In order to minimize the risk of non-specific effects Erlotinib was used in a maximum concentration of 3 μ M. For the investigation of specific effects this concentration should be sufficient since the K_i of Erlotinib at EGFR is 17.5 nM [20]. Only two of the HNSCC cell lines did not show a clear response at 3 μ M Erlotinib. According to the expectation, KPL4 cells did not respond to Erlotinib while HCC-827 showed 95% efficacy with high potency. Overall, 12 of 14 HNSCC lines responded to Erlotinib treatment supporting the use of EGFR inhibitors in HNSCC. We also tested the possible impact of EGF concentration in the cell culture medium. Addition of 1 ng/ml EGF to the medium did not change the response. The EGF concentration in regular medium is therefore not limiting the cell growth.

Expression and phosphorylation status of EGFR in cell lines

We then characterized the cell lines for expression and activity levels of EGFR (Figure 1).

Upon activation of EGFR, several tyrosine residues in the cytoplasmic tail become phosphorylated with same kinetics [17]. These phosphotyrosines provide the docking site for the adaptor proteins which mediate the activation of the ras-raf-MEK-ERK pathway. This is the major signaling activity of EGFR and therefore a good readout for EGFR activity. For this reason, we used the MSD duplex assay for total and phosphotyrosine-1173 EGFR.

All cell lines tested expressed EGFR with the exception of the negative control KPL-4. Expression and phosphorylation correlated well for the HNSCC cell lines, only the NSCLC control HCC-827 formed an outlier with higher phosphorylation due to the activating mutation (see also Supplementary Figure 1). The non-responder cell line KYSE-510 had the lowest EGFR expression among the HNSCC cells tested. The analysis of tyrosine-1173 phosphorylation gave a similar picture. However, the second non-responder cell line, KYSE-70 did not stand out in expression or phosphorylation. Based on these data, we conclude that most HNSCC cell lines express activated

Table 1: HNSCC cell lines respond to Erlotinib

Cell line	IC50 (nM)	Efficacy (%)
Esophagus Tumor KYSE-30	854	80
Esophagus Tumor KYSE-70	>3000	30
Esophagus Tumor KYSE-150	190	76
Esophagus Tumor KYSE-140	384	80
Esophagus Tumor KYSE-510	>3000	30
Tongue Tumor SCC-4	265	47
Tongue Tumor SCC-9	352	95
Tongue Tumor SCC-15	450	100
Tongue Tumor SCC-25	234	99
Tongue Tumor CAL 27	309	88
Tongue Tumor CAL 33	712	85
Tongue Tumor HSC-3	1710	68
Pharynx Tumor Metastasis Detroit 562	431	67
Pharynx Tumor FaDu	568	68
Lung Tumor HCC827	18	95
Breast Tumor Metastasis KPL-4	>3000	32

In a three day proliferation assay, the majority of the tested cell lines responded to Erlotinib but with variable sensitivity and efficacy. The EGFR-negative control cell line KPL-4 and two HNSCC lines responded weakly to Erlotinib. The EGFR mutated NSCLC cell line HCC827 showed highest sensitivity to EGFR inhibition.

EGFR levels driving EGFR dependent cell growth but certain cell lines may have features that weaken the dependence on EGFR. For example, KYSE-70 carries a PIK3CA amplification [21] and KYSE-510 amplifications in c-myc, hst-1 and cyclin D1 [22].

The high specificity of MSD assays for phosphorylation of receptor tyrosine-kinases is exemplified in Supplementary Figure 5. High levels of phosphorylation are observed as a result of RTK amplification and overexpression in few cases which are indication specific like Her2 in breast and gastric cancer, MET in gastric cancer and EGFR in lung and gastric cancer.

Expression and phosphorylation status of EGFR in clinical HNSCC samples

We next tested whether the expression and activity level of EGFR in clinical samples of HNSCC is in the range that we observed in the HNSCC cell lines. Samples were obtained during curative surgery for primary HNSCC tumors. Tumors were typically poorly differentiated or undifferentiated, still localized but already with progression to local lymph nodes. The available patient data are summarized in Table 2. For comparison, healthy normal adjacent tissue was also prepared from the surgical

safety margin. Figure 2A shows the expression levels of EGFR in tumor and normal tissue. We detected a small but statistically significant overexpression of EGFR in the tumor sample. However, the absolute levels hardly reached the levels observed in HNSCC cell lines. Figure 2B displays the EGFR phosphorylation levels detected in clinical samples of HNSCC. Surprisingly, the activity level was lower in the tumor samples compared to healthy adjacent tissue samples and the absolute counts were low. When expressed as phospho to total ratio, the lower activity level in tumor samples compared to normal adjacent tissue was even more significant (Figure 2C). Neither EGFR expression nor phosphorylation was correlated with tumor differentiation or stage of disease.

Comparison of EGFR status between cell lines and clinical samples

In Figure 3 we compare the levels of EGFR expression and phosphorylation between responder and non-responder cell lines and the clinical samples. Non-responders comprise KYSE-70, KYSE-510 and KPL-4 as well as three additional MET-dependent gastric cancer cell lines which did not respond to Erlotinib (SNU-1, MKN-45, U-87MG) in order to gain significant numbers for the analysis. Expression levels in clinical samples

Table 2: Demographics of the clinical sample donors (the complete clinical data set was available for n=51 of the 63 enrolled patients)

Variable		Number	(%)
Age (median)		66	
Gender	Male	39	76.5
	Female	12	23.5
Tumor Localization	Oral cavity	7	13.7
	Oropharynx	21	41.2
	Hypopharynx	6	11.8
	Larynx	15	29.4
	Other	2	3.9
Tumor Stage	I	6	11.8
	II	1	2.0
	III	6	11.8
	IVa	26	51.0
	IVb	5	9.8
	IVc	7	13.7
Differentiation	Well differentiated	1	2.0
	Moderately differentiated	3	5.9
	Poorly differentiated	35	68.6
	Undifferentiated	12	23.5

were significantly lower than those observed in responder cell lines, they were in the range of non-responding cell lines (Figure 3A). Therefore it seems that most of the established HNSCC cell lines are not representative for the clinical situation. Figure 3B shows that the situation

is worse for the tyrosine-1173 phosphorylation: the levels observed in clinical samples were even lower compared to the non-responder cell lines. These findings suggest that these cell lines are not representative for the clinical situation in HNSCC.

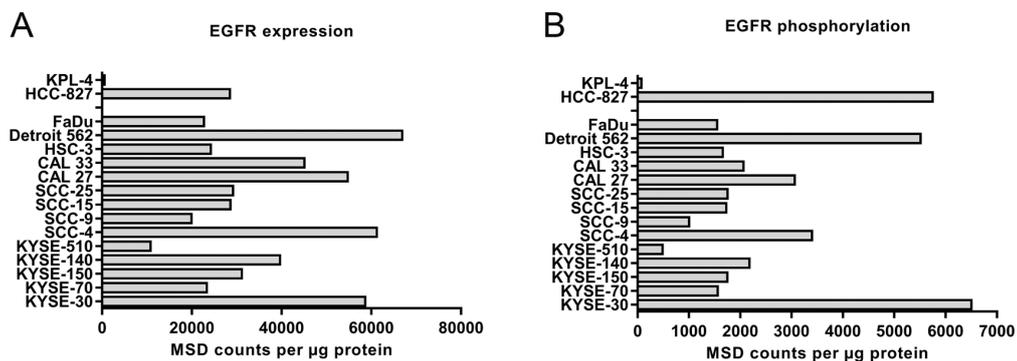


Figure 1: Expression (A) and phosphorylation (B) of EGFR in 14 different HNSCC cell lines and two controls (KPL-4 and HCC-827). EGFR expression in lysates of exponentially growing cells containing 20 µg protein was tested by sandwich-immunoassay, mesoscale discovery (MSD). The signaling activity of EGFR was tested by determination of the phosphotyrosine-1173 in the activation-loop of the kinase also by MSD assay. Expression and phosphorylation levels correlate with Pearson $r=0.74$ (see also Supplementary Figure 1).

Comparison of EGFR expression in tumor and normal tissue by IHC

As overexpression of EGFR in clinical tumor samples has previously been described, we then investigated EGFR in HNSCC using immunohistochemistry in order to assess the spatial distribution. We first established a staining protocol and controlled the specificity by using formalin-fixed cell pellets of Detroit-562 (highest EGFR expression in MSD), KYSE-510 (lowest EGFR expression) and KPL-4 showing strong, moderate and negative staining (Supplementary Figure 2) proving that the assay is specific and sensitive in the right range of expression levels.

We next stained the formalin fixed HNSCC samples. A broad range of protein expression was detected. The vast majority of clinical samples expressed low to moderate levels of EGFR highly enriched in the plasma membrane. The expression was restricted to the tumor cells and not present in stroma (Supplementary Figure 3).

For comparison we also stained the normal adjacent tissue. EGFR was expressed in most of the samples in weak to moderate intensity on the plasma membrane. The expression was restricted to the epithelial layer, most dominant in the basal cell layer and weakening towards the epithelial surface (Supplementary Figure 4).

We then compared the EGFR expression in matched pairs of tumor and normal adjacent tissue samples. No trend to increased expression in tumor cells could be detected. Figure 4 shows representative examples of comparisons between normal adjacent (A, C, E) and tumor (B, D, F) tissue of the same donors. Low to moderate expression was detected in the basal to suprabasal layers of the regular epithelium, weakening towards the surface. The underlining connective tissue was negative for EGFR. In the tumor samples weak to moderate signals were detected which were restricted to the tumor cells whereas the surrounding stroma was negative for EGFR expression.

We then analyzed the complete distribution of staining intensities observed in normal adjacent and tumor

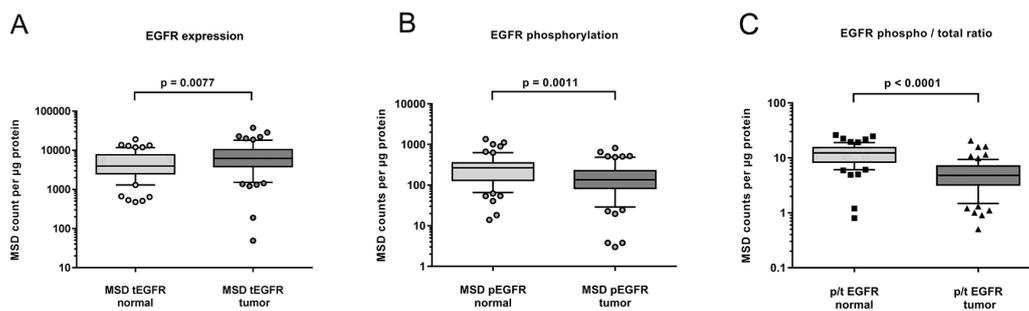


Figure 2: Expression (A) and phosphorylation (B) of EGFR in fresh frozen samples of HNSCC tumor (n=63) and adjacent normal tissue (n=60). A small but significant increase in EGFR expression was found in tumor samples (A). EGFR phosphorylation however was lower in tumor compared to normal adjacent tissue (B). Shown as phospho- to total ratio, the lack of EGFR activity in HNSCC tumors becomes more evident (C).

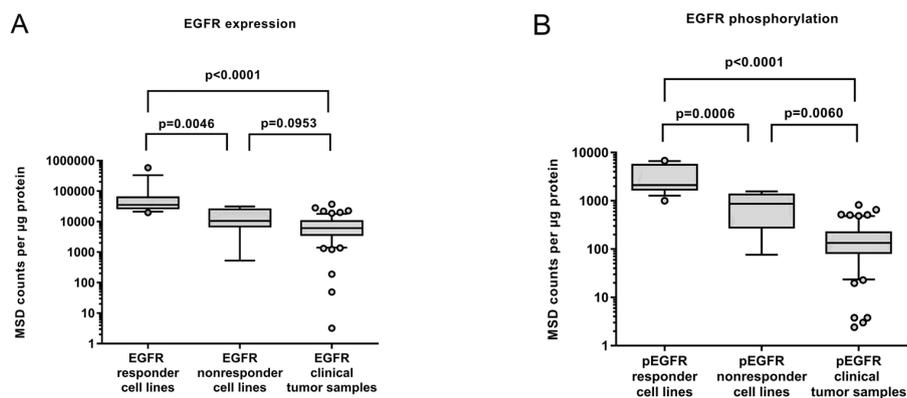


Figure 3: (A) Expression and (B) phosphorylation of EGFR in cell lines (N=14) classified by their Erlotinib response in comparison to the levels found in HNSCC tumor samples (n=63). It becomes evident that the responding cell lines are not representative for the clinical situation. (Nonresponder cell lines comprise KYSE-70, KYSE-510 and KPL-4 as well as 3 additional MET-dependent cell lines which did not respond to Erlotinib (SNU-1, MKN-45, U-87 MG) in order to gain significant numbers.

samples (Figure 5). Low to moderate expression levels were dominant. No statistically significant difference was found between tumor and normal adjacent tissue samples.

DISCUSSION

We showed that EGFR is not overexpressed in most clinical HNSCC samples and established cell lines do therefore not represent the general clinical situation. Probably, EGFR-high expressing cells were selected

during the establishment of the cell cultures from primary tumors or have evolved in this direction over many years in the cell culture.

Many reviews stress the prognostic value of EGFR expression to support its role as relevant oncogene but only 60% of the studies show association between EGFR expression and outcome whereas 40% do not [1]. Although most reviews claim that EGFR is overexpressed in HNSCC, specific data supporting this are quite limited. The earliest reports often cited are studies that only

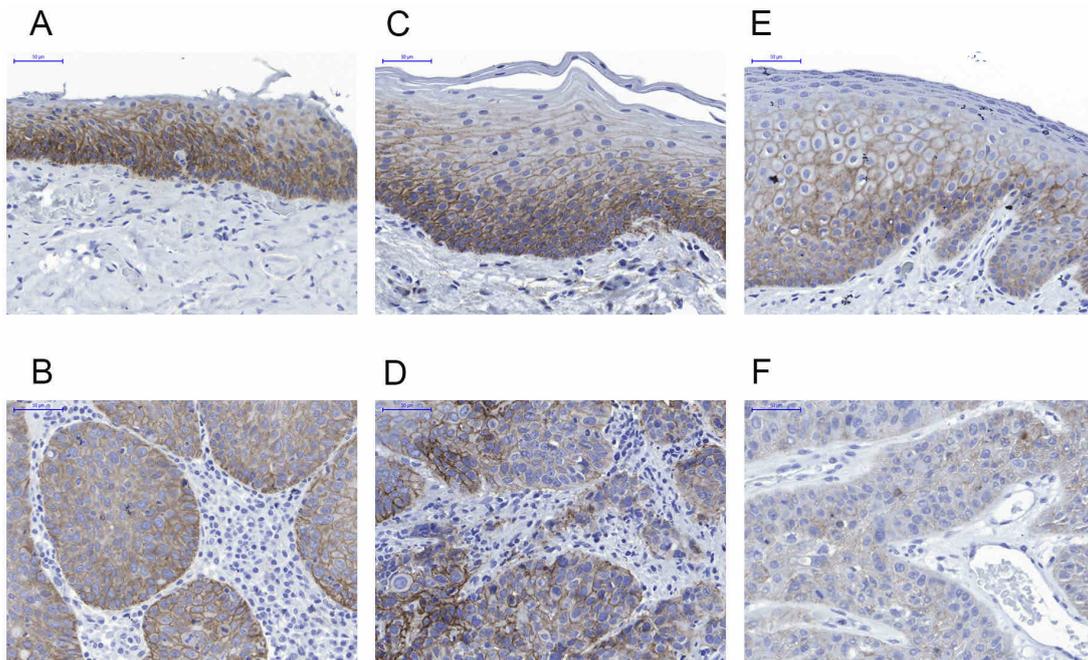


Figure 4: Representative immunohistochemistry results for EGFR expression in normal adjacent tissue (upper row, **A, C, E**) compared to the respective HNSCC lesions in matched samples (lower row **B, D, F**). **A** and **B** case 28; **C** and **D** case 41; **E** and **F** case 63. EGFR is not overexpressed in tumors compared to the basal layer of normal epithelium.

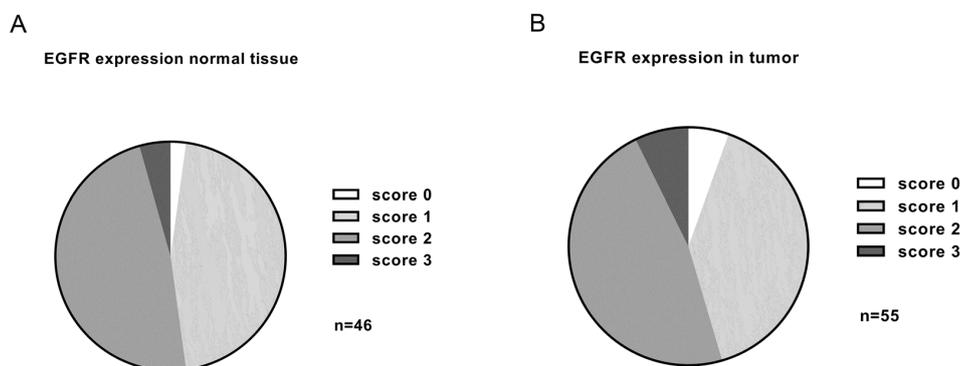


Figure 5: Summary of EGFR expression levels detected in adjacent normal tissue (n=46) (**A**) and HNSCC (n=55) (**B**) by immunohistochemistry. The vast majority of samples had low to moderate EGFR expression. No significant overexpression was found in tumor samples compared to normal tissue (p=0.375).

tested expression on the RNA level. In addition, the RNA expression was not compared to normal adjacent tissue but to a small number of control tissues from patients undergoing surgery for different reasons [23]. Ozanne and Richards described the amplification of EGFR in HNSCC cell lines compared to normal keratinocytes by southern blotting. This was also done for a few patient samples in comparison to normal mucosa showing higher EGFR signals in the HNSCC biopsies [24]. However, no control for adjacent sequences or centromeres was included, so that simple polyploidy cannot be ruled out as a reason. The same group reported increased binding (factor 5) of an iodinated anti-EGFR antibody to cryosections of HNSCC compared to adenocarcinomas and normal mucosa [25]. However, the resolution of this was limited and the normal mucosa showed similarly strong signals with the control antibody raising concerns about the specificity of the approach. Also the original study describing the prognostic value of EGFR levels used the I-125-EGF binding assay in membrane preparations of frozen biopsies without controlling the tumor to stroma ratio [4].

Later studies using immunohistochemistry usually assessed the association of EGFR expression with disease progression. Higher expression by AQUA scores was associated with recurrence and overall survival [26], but no comparison to expression in normal mucosa was described. Sheikh et al. found an association between EGFR expression, nodal status and worse differentiation but time to progression and overall survival did not reach significance [27]. Overexpression was described in this paper but was based on percentage of positive cells not on the intensity of expression. Sheikh et al. also clearly described expression of EGFR in the basal layer of normal epithelium and its extension into the stratum spinosum in hyperplasia. The situation is similar for NSCLC for which the EGFR inhibitors were first developed. The overexpression referred only to the number of positive cells which was higher in tumor as the expression in normal tissue was confined to the basal layer of the bronchioalveolar epithelium. The intense staining of the non-neoplastic epithelium was specifically shown in this paper [28]. EGFR inhibitors were developed based on the prognostic value of EGFR expression and years of clinical studies were required until it was discovered that not the expression of EGFR but activating mutations were predictive for response in NSCLC [29].

We confirm that EGFR expression is maintained in growing keratinocytes and HNSCC cells but lost with differentiation in the normal epithelium. Therefore, the often described overexpression only originated from a larger number of EGFR positive growing cells in tumors and cannot be traced back to an overexpression on the individual cell level. The larger number of EGFR positive cells explains the findings on the level of RNA expression in tumor lysates especially if the stroma content is low in higher grade tumors with worse prognosis.

For the downstream signaling and its effect on cell proliferation and survival the activation of EGFR is much more relevant than the expression level. When we tested the EGFR activation in clinical samples by measuring the phosphorylation of tyrosine-1173 it became clear that in contrast to the expression levels, EGFR phosphorylation was even significantly lower in tumor versus normal adjacent tissue. Strikingly, when compared to established HNSCC cell lines, the EGFR phosphorylation was an order of magnitude lower.

In cell lines, we found EGFR commonly expressed and activated and the majority of cell lines responded to submicromolar concentrations of Erlotinib supporting its potential use in HNSCC. Only two of fourteen HNSCC cell lines did not respond to Erlotinib and these may be driven by other oncogenes as KYSE-70 has a PIK3CA amplification [21] and KYSE-510 bears c-myc, hst-1 and cyclin D1 amplifications [22]. Our finding that most HNSCC cell lines respond to Erlotinib in cell culture confirms earlier findings by Haddad et al., who also showed response in 27 different HNSCC lines. Although there were differences in sensitivity, all cell lines reacted at least in the micromolar concentration range. [16]. The sensitivity was influenced by the epithelial phenotype, resistance caused by EMT as shown by Frederick et al. [15].

Our comparison of cell lines with clinical samples revealed that EGFR expression and activity is more common in cultured cells. A similar finding has been published for phosphotyrosine levels in NSCLC [30] where phosphopeptides from EGFR, MET and EPHA2 were dramatically overrepresented in cell culture samples. Although cell line panels are commonly used to identify predictive biomarkers which would be the famous Achilles heel of cancer [31], it still has to be verified whether the collection of cell lines represents the clinical situation.

The predictive value of cell lines for the clinical situation has been analyzed for several indications [32]. While similarities in expression patterns were reported for breast cancer [33, 34], a greater number of high level amplifications were found in cell lines [35]. A similar finding was reported in ovarian cancer [36]. In HNSCC more mutations were unique to cell lines or tumors than common. Also, the number of amplifications especially in the relevant EGFR, ERBB2 and PIK3CA genes was much higher in cell lines [37].

Therefore, it is important to verify the clinical situation if predictive biomarkers are established based on the properties of cultured cell lines. The prediction of clinical response rates based on response rates obtained in cell line panels is of limited value if the cell lines do not represent the average target expression in the respective human specimen. In addition to the potential differences in responsiveness between cell lines and tumors, the exposures reached in clinical studies may also be the issue. Cell culture conditions differ from the

clinical situation, therefore the exposure levels have to be carefully compared. The clinical MTD of EGFR TKIs is limited by skin toxicity reflecting the EGFR expression in the growing keratinocytes. Higher grade skin rash is correlated with response showing that systemic exposure levels are limiting the efficacy at the common dosing regimen. The steady state concentration of 150mg daily Erlotinib was around 2 μ M [10, 38]. Taking into account that the free fraction of Erlotinib in plasma is only 7%, the active concentration is only reaching approximately 200 nM. Only one cell line in our HNSCC panel would have demonstrated growth inhibition at this concentration. Only the control cell line HCC-827 with an activating EGFR mutation has an IC50 value which would predict a clear response to these drug levels. This situation can be compared to NSCLC. Only a few cell lines were found to be highly sensitive to Gefitinib (with submicromolar IC50s) and the sensitivity correlated with activating mutations and high copy number gains in the EGFR gene. Also, the phosphorylation levels were high in the responder cell lines [39]. The correlation between Erlotinib and Gefitinib sensitivity is excellent as described by Gandhi and colleagues who also showed in a large preclinical study comprising 77 NSCLC lines that all sensitive cell lines (IC50 below 1 μ M) had activating mutations or copy number gains but no secondary resistance mutations like T790M or PTEN loss. In that study, six of seven sensitive lines had IC50 values of 200 nM or lower [40]. The biochemical reason for this is the increased affinity for Erlotinib while ATP binding is weakened in the L858R or exon 19 deletions which give the competitive inhibitor a 6 to 130fold advantage relative to the wild-type EGFR [20]. Therefore EGFR mutated cell lines are much more sensitive in proliferation assays [41].

In conclusion, EGFR expression levels alone are not predictive for response to clinically tolerable Erlotinib, concentrations. Only cell lines or tumors with activating mutations seem to be sensitive enough to react to TKI concentrations reached in the clinics.

Therefore, larger studies are required to investigate whether activating mutations or genomic amplifications can be detected in HNSCC patients. The identification of these changes would justify the treatment of biomarker-positive patients with EGFR inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Collection of human samples

Sample collection was done in agreement with the declaration of Helsinki 1964. The study was approved by the local ethical committee (EA2/045/10) and respective patient informed consents were obtained before start of the research activities. 63 cases of head and neck cancers of different stages excised during primary surgery were used for this analysis. Samples of tumor and adjacent

normal tissue were split and freshly frozen for analysis in sandwich-immunoassays or formalin fixed and paraffin embedded for later use in immunohistochemistry. In some cases no normal adjacent tissue could be obtained or very small samples were lost during processing, therefore numbers of successfully analyzed samples are indicated in the figure legends. Complete clinical data on localization, stage and differentiation of the tumor were available for 51 of the 63 patient samples.

Tissue culture

All 14 HNSCC and 2 control cell lines were obtained from ATCC or DSMZ and grown in RPMI1640 (Biochrom F1215), Iscove Basal Medium (Biochrom F0465) or DMEM (Gibco 4166-029) supplemented with 10% FCS and 2mM Glutamine according to the instructions of ATCC and DSMZ. Cell were tested and found free of Mycoplasma contamination. Details are described in Supplementary Table 1. No cell line was used above passage 10.

For generation of cell lysates, cells were grown to 70% confluence, washed twice with PBS and directly lysed for 30min on ice using 1mL MSD lysis buffer supplemented with phosphatase inhibitor cocktail (Sigma P0044 and P-5726) and protease inhibitor cocktail (Pierce Biotechnology 87785). Cell lysates were aliquoted, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for sandwich-immunoassays.

FFPE pellets were prepared by pelleting the washed cells followed by fixation in 10% neutral buffered formalin for 8 - 18 hours at room temperature. The pellets were stored in 70% ethanol until paraffination using a vacuum infiltrator (Leica ASP200S).

Immunohistochemistry

Standard procedures were used for immunohistochemistry. In brief, antigen retrieval was performed in pH9 target retrieval solution (Dako S2367) for 17min in a steam cooking device. Endogenous peroxidase activity was blocked with Peroxidase Blocking Solution (Dako S2023) for 15 minutes at room temperature. EGFR receptors were stained using the primary rabbit anti-EGFR antibody clone D38B1 (Cell Signaling Technologies) in 1:900 dilutions in antibody diluent (Dako S2022) for 2h followed by application of the DAKO Envision system (anti-rabbit; Dako K4011) for 1h and addition of the DAB chromophore for 10min. Incubation with antibodies occurred in a humid chamber at room temperature at all times.

MSD-Immunoassay

EGFR protein expression and phosphorylation of Tyrosine-1173 were analysed by electro-chemiluminescence based sandwich-immunoassays (Mesoscale Discovery, Rockville USA) in lysates made from fresh frozen tumor

material or exponentially growing cell cultures according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed in MSD lysis buffer with protease inhibitor and phosphatase inhibitors (described above). Protein concentration was determined by BCA (Pierce #23227, Rockford USA). 20 µg of protein content were used per well and results were presented as MSD counts per µg used.

Proliferation assay

For proliferation assays, cells were seeded at 2000 cells per well in 96 well plates and pre-incubated for 24h in cell culture media. After addition of Erlotinib in different concentrations ranging from 0.15 nM to 3 µM or DMSO control, cells were continuously incubated for 72h before testing viability using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. The maximum concentration of 3 µM was selected because some of the HNSCC cell lines were very sensitive to DMSO and did not tolerate more than 0.1% DMSO final concentration. IC50 and efficacy values were fitted by 4 parameter fit using GraFit Data Analysis Software.

Statistics

All analyses were performed using GraphPad Prism (La Jolla, CA). For sample sets with Gaussian distribution (IHC scores of clinical samples), the differences between groups were analyzed using student's two-tailed *t*-test paired *t*-test. For sample sets including non-Gaussian distributions (most EGFR expression and phosphorylation data in frozen samples), the Mann-Whitney *U* test was used.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the participating patients who made this work possible. We thank Monika Klotz for expert technical assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

The study was fully financed by the Bayer AG.

REFERENCES

1. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2982>.
2. Boeckx C, Baay M, Wouters A, Specenier P, Vermorken JB, Peeters M, Lardon F. Anti-epidermal growth factor receptor therapy in head and neck squamous cell carcinoma: focus on potential molecular mechanisms of drug resistance. *Oncologist*. 2013; 18:850–64. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0013>.
3. Sacco AG, Worden FP. Molecularly targeted therapy for the treatment of head and neck cancer: a review of the ErbB family inhibitors. *Onco Targets Ther*. 2016; 9:1927–43.
4. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, Demard F, Milano G. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol*. 1993; 11:1873–78. <https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.10.1873>.
5. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckí A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008; 359:1116–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802656>.
6. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006; 354:567–78. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa053422>.
7. Vermorken JB, Peyrade F, Krauss J, Mesia R, Remenar E, Gauler TC, Keilholz U, Delord JP, Schafhausen P, Erfan J, Brümmendorf TH, Iglesias L, Bethe U, et al. Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Ann Oncol*. 2014; 25:682–88. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu003>.
8. Licitra L, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Hitt R, Erfan J, Rottey S, Kaweckí A, Zabolotnyy D, Benasso M, Störkel S, Senger S, Stroh C, Vermorken JB. Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study. *Ann Oncol*. 2011; 22:1078–87. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq588>.
9. Cohen EE, Rosen F, Stadler WM, Recant W, Stenson K, Huo D, Vokes EE. Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2003; 21:1980–87. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.10.051>.
10. Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2004; 22:77–85. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.06.075>.
11. Martins RG, Parvathaneni U, Bauman JE, Sharma AK, Raez LE, Papagikos MA, Yunus F, Kurland BF, Eaton KD, Liao JJ, Mendez E, Futran N, Wang DX, et al. Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol*. 2013; 31:1415–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3299>.

12. Rodriguez CP, Adelstein DJ, Rybicki LA, Saxton JP, Lorenz RR, Wood BG, Scharpf J, Ives DI. Single-arm phase II study of multiagent concurrent chemoradiotherapy and gefitinib in locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2012; 34:1517–23. <https://doi.org/10.1002/hed.21971>.
13. Kalish LH, Kwong RA, Cole IE, Gallagher RM, Sutherland RL, Musgrove EA. Deregulated cyclin D1 expression is associated with decreased efficacy of the selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:7764–74. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0012>.
14. Erjala K, Sundvall M, Junttila TT, Zhang N, Savisalo M, Mali P, Kulmala J, Pulkkinen J, Grenman R, Elenius K. Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:4103–11. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2404>.
15. Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, Zheng D, Chan D, Bunn PA Jr, Raben D. Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6:1683–91. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0138>.
16. Haddad Y, Choi W, McConkey DJ. Delta-crystallin enhancer binding factor 1 controls the epithelial to mesenchymal transition phenotype and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:532–42. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1733>.
17. Hsu JM, Chen CT, Chou CK, Kuo HP, Li LY, Lin CY, Lee HJ, Wang YN, Liu M, Liao HW, Shi B, Lai CC, Bedford MT, et al. Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation. *Nat Cell Biol*. 2011; 13:174–81. <https://doi.org/10.1038/ncb2158>.
18. Okabayashi Y, Kido Y, Okutani T, Sugimoto Y, Sakaguchi K, Kasuga M. Tyrosines 1148 and 1173 of activated human epidermal growth factor receptors are binding sites of Shc in intact cells. *J Biol Chem*. 1994; 269:18674–78.
19. Batzer AG, Rotin D, Ureña JM, Skolnik EY, Schlessinger J. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*. 1994; 14:5192–201. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.8.5192>.
20. Carey KD, Garton AJ, Romero MS, Kahler J, Thomson S, Ross S, Park F, Haley JD, Gibson N, Sliwkowski MX. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res*. 2006; 66:8163–71. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0453>.
21. Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J. PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2006; 97:1351–58. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00343.x>.
22. Kanda Y, Nishiyama Y, Shimada Y, Imamura M, Nomura H, Hiai H, Fukumoto M. Analysis of gene amplification and overexpression in human esophageal-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 1994; 58:291–97. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910580224>.
23. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 1993; 53:3579–84.
24. Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B. Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *J Pathol*. 1986; 149:9–14. <https://doi.org/10.1002/path.1711490104>.
25. Hendler FJ, Ozanne BW. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest*. 1984; 74:647–51. <https://doi.org/10.1172/JCI111463>.
26. Psyrri A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R, Rimm D, Burtness BA. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:5856–62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0420>.
27. Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, Beder LB, Demircan K, Fujii M, Yamanaka N, Shimizu K, Grenman R, Nagai N. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008; 99:1589–94. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00861.x>.
28. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res*. 1997; 3:515–22.
29. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004; 350:2129–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>.
30. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y, Hu Y, Tan Z, Stokes M, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 2007; 131:1190–203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.025>.
31. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science*. 2002; 297:63–64. <https://doi.org/10.1126/science.1073096>.

32. Goodspeed A, Heiser LM, Gray JW, Costello JC. Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. *Mol Cancer Res.* 2016; 14:3–13. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0189>.
33. Ross DT, Perou CM. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Dis Markers.* 2001; 17:99–109. <https://doi.org/10.1155/2001/850531>.
34. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 2000; 24:227–35. <https://doi.org/10.1038/73432>.
35. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006; 10:515–27. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>.
36. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun.* 2013; 4:2126. <https://doi.org/10.1038/ncomms3126>.
37. Li H, Wawrose JS, Gooding WE, Garraway LA, Lui VW, Peyser ND, Grandis JR. Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection. *Mol Cancer Res.* 2014; 12:571–82. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0396>.
38. Tran HT, Zinner RG, Blumenschein GR Jr, Oh YW, Papadimitrakopoulou VA, Kim ES, Lu C, Malik M, Lum BL, Herbst RS. Pharmacokinetic study of the phase III, randomized, double-blind, multicenter trial (TRIBUTE) of paclitaxel and carboplatin combined with erlotinib or placebo in patients with advanced Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Invest New Drugs.* 2011; 29:499–505. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9380-z>.
39. Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bemis L, Coldren C, Barón A, Zeng C, Franklin WA, Hirsch FR, Gazdar A, Minna J, Bunn PA Jr. Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:7117–25. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0760>.
40. Gandhi J, Zhang J, Xie Y, Soh J, Shigematsu H, Zhang W, Yamamoto H, Peyton M, Girard L, Lockwood WW, Lam WL, Varella-Garcia M, Minna JD, Gazdar AF. Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. *PLoS One.* 2009; 4:e4576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004576>.
41. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:13306–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405220101>.

3. Veröffentlichung 2

Received: 2 April 2019 | Revised: 24 October 2019 | Accepted: 3 December 2019

DOI: 10.1002/hed.26049

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Hepatocyte Growth Factor Receptor overexpression predicts reduced survival but its targeting is not effective in unselected HNSCC patients

Martin Khan MD¹ | Sami S. Khaznadar² | Johannes Routila MD^{3,4} |
Sami Ventelä MD^{3,4} | Elke Schmid² | Bastian Gebhart¹ | Eva T. Becker MD¹ |
Helge G. Roider PhD² | Merja Perala PhD⁵ | Arndt A. Schmitz PhD² |
Thomas Krahn PhD² | Oliver von Ahsen PhD² 

¹Charité, Berlin, Augustenburger Platz 1, Berlin, Germany

²Bayer AG, Research & Development, Pharmaceuticals, Berlin, Germany

³Centre for Biotechnology, University of Turku and Åbo Akademi University, Turku, Finland

⁴Department for Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery, Turku University Hospital, Turku, Finland

⁵Auria Biobank, Kiinamyllynkatu 8, Turku, Finland

Correspondence

Oliver von Ahsen, Biomarker Research, Bayer AG, Müllerstr. 178, 13353 Berlin, Germany.

Email: oliver.vonahsen@bayer.com

Present address

Martin Khan MD, Klinikum Dahme-Spreewald GmbH, Köpenicker Str. 29, 15711 Königs Wusterhausen, Germany
Sami S. Khaznadar, University of Bonn, Regina-Pacis-Weg 3, 53113 Bonn, Germany

Section Editor: James Rocco

Abstract

Background: MET has emerged as target in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). However, clinical data on MET inhibition in HNSCC are limited.

Methods: HNSCC biopsies and cell lines were tested for MET activity. The response of cell lines to BAY-853474 was tested in proliferation assays. The prognostic value of MET expression was also analyzed.

Results: HNSCC cell lines do not respond to MET inhibition. MET-dependent gastric cancer cell lines have much higher levels of MET expression and phosphorylation than HNSCC cell lines. Clinical samples of HNSCC contain much less MET than responsive models.

Conclusions: No clinical response to MET inhibitors in monotherapy may be expected in unselected cases of HNSCC. Only selected patients with MET amplifications should be treated with MET inhibitors. Patients with increased MET immunoreactivity have shorter overall survival. MET might be useful as marker for the detection of patients with more aggressive types of HNSCC.

KEYWORDS

HNSCC, immunohistochemistry, MET, MSD, tyrosine kinase inhibitor

1 | INTRODUCTION

Squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract, usually categorized as head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), currently represent the sixth most common cancer in the world.¹ The 5-year survival rate of patients

diagnosed with HNSCC remains below 50%, with no improvement in survival rates over the last decades. Conventional treatment strategies, including surgery, radiation, and chemotherapy, are effective in only 50% of HNSCC patients and are associated with significant toxicities, highlighting the need for additional treatment options.²

In many cancers, such as non-small cell lung cancer (NSCLC) and breast cancer, there are several approved

Martin Khan and Sami S. Khaznadar contributed equally to this study.

targeted therapy options that are absent for the treatment of HNSCC. Previously, cetuximab was the only approved targeted therapy for HNSCC, albeit with very limited efficacy.^{3,4} Recently, pembrolizumab and nivolumab were approved with 18% and 13% overall response rate,^{5,6} demonstrating the further need for new therapies for HNSCC.

MET has emerged as a promising target in cancer therapy due to its amplification and overexpression in gastric cancer and NSCLC.⁷ MET expression in HNSCC has also been associated with a worse prognosis in the majority of studies.⁸ The MET protein is a prototypical representative of the receptor tyrosine kinase family. Hepatocyte growth factor (HGF) has been identified as the only ligand of MET.⁹ HGF binding leads to MET dimerization, autophosphorylation, and activation of downstream signaling pathways like the PI3K and MAPK pathways.¹⁰ In adult healthy tissues, MET and HGF are expressed only at low levels; in contrast, analyses of cancer samples have revealed cases of aberrant expression, amplifications, and point mutations in MET. Activating mutations have been identified in familiar and sporadic renal papillary carcinomas, and gene amplifications in gastric and lung cancers.¹¹ While an autocrine activation loop driven by HGF secretion was first described in glioblastoma models,^{12,13} HGF expression has also been found in cancer-associated fibroblast cultures.¹⁴ In addition, overexpression of HGF was detected in clinical samples¹⁵ and associated with metastasis and prognosis.^{16,17} Overexpression of MET and its ligand HGF have been reported in HNSCC as well,¹⁸ but initial clinical trials with MET inhibitors in HNSCC patients have been disappointing.¹⁹ Therefore, we elected to reinvestigate the relevance of MET as a potential therapeutic target in HNSCC using the selective MET inhibitor BAY-853474²⁰ and reevaluate the prognostic value of MET expression.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Collection of human samples at Charité, Berlin

Sample collection was undertaken in agreement with the declaration of Helsinki 1964. The study was approved by the local ethics committee (EA2/045/10) and respective patient-informed consents were obtained before the start of research activities. Sixty-three cases of head and neck cancers of different stages excised during primary surgery were used for analyses. Samples of tumor and adjacent normal tissue were split and freshly frozen for analysis in sandwich

immunoassays or formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) for later use in immunohistochemistry. In some cases, no normal adjacent tissue could be obtained or very small samples were lost during processing: The number of successfully analyzed samples is indicated in the respective figure legends. Complete clinical data on localization, stage, and differentiation of the tumor were available for 51 of the 63 patients. Clinicopathological variables of the 51 patients are summarized in Table 1.

2.2 | Patient tissue microarray from Auria Biobank, Finland

A population-based tissue microarray (TMA) of patient FFPE samples was assembled from the pathology archives of Auria Biobank, Turku, Finland, a joint institution of VSSHP (Hospital Districts of Southwest Finland, Satakunta, and Vaasa) and Turku University. Altogether, samples from 255 patients were included in the TMA, 200 of which had primary HNSCC tumor samples available. Tissue spots of 1 mm diameter were used for TMA construction. Clinicopathological variables of the patients are summarized in Table 2.

TABLE 1 Clinicopathological variables of the Berlin HNSCC study

Variable	Value	Number	Percent
Age (median)		66	
Gender	Male	39	76.5
	Female	12	23.5
Tumor localization	Oral cavity	7	13.7
	Oropharynx	21	41.2
	Hypopharynx	6	11.8
	Larynx	15	29.4
	Other	2	3.9
Tumor stage	I	6	11.8
	II	1	2.0
	III	6	11.8
	IVa	26	51.0
	IVb	5	9.8
	IVc	7	13.7
Differentiation	Well differentiated	1	2.0
	Moderately differentiated	3	5.9
	Poorly differentiated	35	68.6
	Undifferentiated	12	23.5

TABLE 2 Basic clinicopathological variables of the sample set from Finland

Variable	Value	Number	Percent
Age (median)		62	
Gender	Male	165	64.7
	Female	90	35.3
Tumor site	Oral cavity	128	50.2
	Oropharynx	51	20.0
	Larynx	43	16.9
	Hypopharynx	15	5.9
	Other	18	7.1
HPV status (p16)	Positive	43	16.9
	Negative	212	83.1
Tumor stage	I	58	22.7
	II	48	18.8
	III	46	18.0
	IV	103	40.4
Living at 5 years	Yes	106	41.6
	No	149	58.4
Nodal metastasis at diagnosis	Absent	148	58.0
	Present	107	42.0

The usage of human tissue samples was approved by the Finnish National Authority for Medicolegal Affairs (Dnro 8005/06.01.03.01/2014 and Dnro 889/04/047/08), the Regional Ethics Committee of the University of Turku (Dnro 146/2007) and the Auria Biobank Scientific Steering Committee (Decision AB15-6487).

2.3 | Tumor samples from Individumed, Germany

Additional tumor samples for control purposes from gastric, colorectal, breast, lung, and prostate cancer patients were obtained from Individumed GmbH (Hamburg, Germany) with informed consent and with approval of the local authorities.

2.4 | Tissue culture

Twelve HNSCC and four gastric cancer control cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) or Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) and grown in RPMI 1640 (Biochrom F1215), Iscove basal medium (Biochrom F0465) or DMEM (Gibco 4166-029) supplemented with 10% FCS and 2 mM glutamine according to the

recommendations of ATCC and DSMZ. The cell lines were tested and found free of mycoplasma contamination. No cell line was used above passage 10.

For the generation of cell lysates, cells were grown to 70% confluence, washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and directly lysed for 30 minutes on ice using 1 mL MSD lysis buffer supplemented with phosphatase inhibitor cocktail (Sigma P0044 and P-5726) and protease inhibitor cocktail (Pierce Biotechnology 87785). Cell lysates were aliquoted, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for sandwich immunoassays.

FFPE pellets were prepared by pelleting the washed cells, followed by fixation in 10% neutral buffered formalin for 8 to 18 hours at room temperature. The pellets were stored in 70% ethanol until paraffination using a vacuum infiltrator (Leica ASP200S).

2.5 | Immunohistochemical stainings and analysis

Standard procedures were used for immunohistochemistry. In brief, antigen retrieval was performed in pH 9 target retrieval solution (Dako S2367, [all Dako reagents now provided by Agilent, Santa Clara, California]) for 17 minutes in a steam cooking device. Endogenous peroxidase activity was blocked with peroxidase-blocking solution (Dako S202386) for 15 minutes at room temperature. MET protein was stained using the primary rabbit anti-MET antibody clone SP44 (Spring Bioscience) in 1:100 dilution in antibody diluent (Dako S2022) for 2 hours, followed by application of the DAKO EnVision system (anti-rabbit; Dako K4011) for 1 hour and addition of the DAB chromophore for 10 minutes. Incubation with antibodies was undertaken in a humid chamber at room temperature. The first sample set (Berlin cohort) was analyzed as individual $3\ \mu\text{m}$ FFPE sections of surgical biopsies. The second larger cohort (Finnish samples) was analyzed by staining TMA sections: FFPE blocks were cut into $6\ \mu\text{m}$ sections and, after the representativeness of the TMA was analyzed using hematoxylin-eosin staining; MET immunostainings were carried out as described earlier. Two patients had no tumor tissue available in tissue sections. MET immunoreactivity was scored by two independent observers (JR and SV) according to a three-tier system (0: negative or weak, 1: moderate, 2: strong) and differences were discussed until consensus was reached. When the staining result was different between cores, the highest score was used for final analysis. For Kaplan-Meier analysis, negative and weak samples were grouped together and also moderate and high expressers.

2.6 | Meso Scale Discovery (MSD) immunoassays

MET protein expression and phosphorylation of the intracellular adaptor protein docking site (tyrosine-1349) were analyzed by electrochemiluminescence-based sandwich immunoassays (Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland) in lysates made from fresh frozen tumor material or exponentially growing cell cultures according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed in MSD lysis buffer with protease inhibitor and phosphatase inhibitor cocktails. Protein concentration was determined using the Bradford assay. The protein content used was 20 μg per well, and the results are presented as MSD counts per μg protein used.

2.7 | Proliferation assays

Therapeutic relevance was tested in proliferation assays with a panel of 12 HNSCC cell lines using the MET inhibitor BAY-853474 (Bayer AG, Berlin, Germany) in comparison with fluorouracil and cisplatin representing

the standard-of-care chemotherapy. Four different cell lines of gastric cancer origin were used for controls for MET dependence. For proliferation assays, cells were seeded at 2000 cells per well in 96-well plates and pre-incubated for 24 hours in cell culture media. BAY-853474 was applied at different concentrations, ranging from 0.1 nM to 1 μM , compared to dimethyl sulfoxide control. The cisplatin/fluorouracil combination was used in the standard 1:3 ratio, with the fluorouracil range from 100 nM to 1 mM and cisplatin from 30 nM to 300 μM . IC₅₀ values refer to the cisplatin concentration. Cells were continuously incubated for 72 hours before testing for viability using the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Germany). IC₅₀ and efficacy values were analyzed by four-parameter fit using GraFit Data Analysis Software.

2.8 | Statistical analysis

Patient data and staining results were examined using SPSS 24 software (SPSS, IBM). Survival was analyzed using the Kaplan-Meier method and significance was tested according

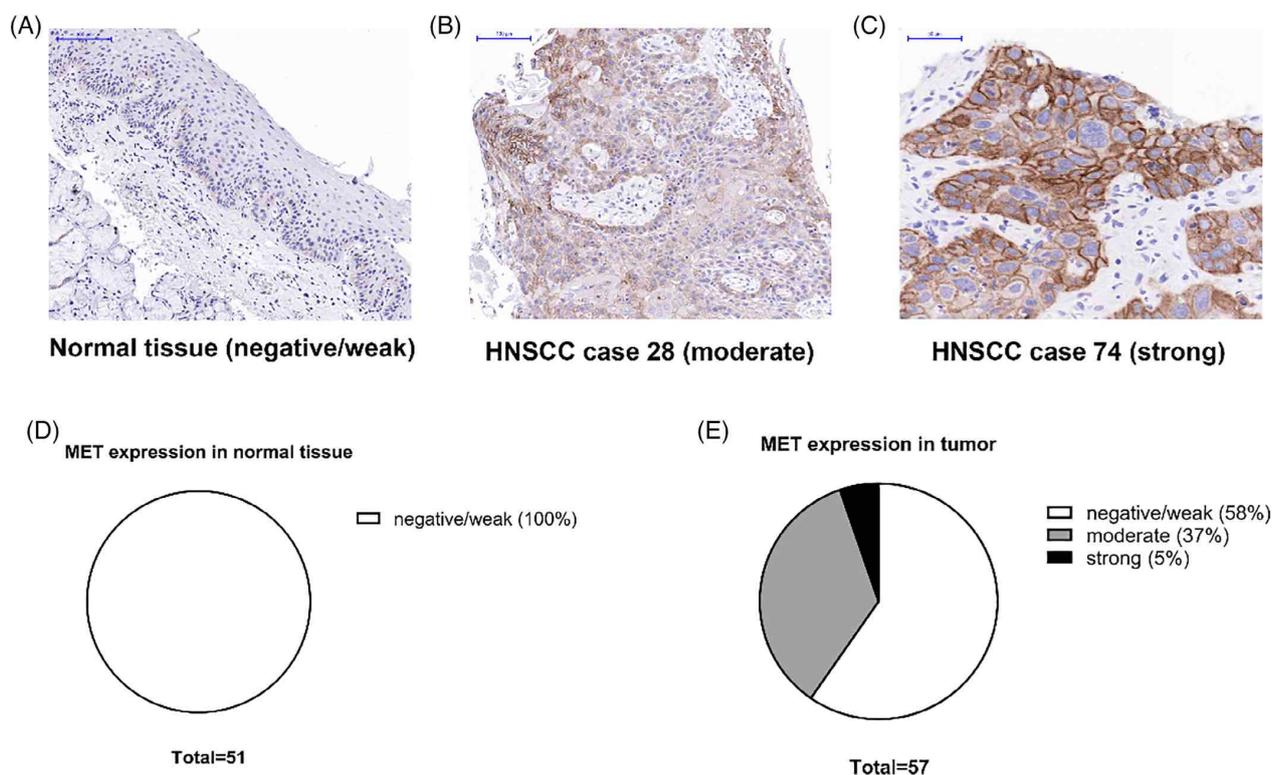


FIGURE 1 A, Representative images after MET immunohistochemical staining in healthy epithelium and in different HNSCC samples. Normal tissue showed negative or only weak MET expression in the basal layer of the epithelium. Moderate or high MET expression was identified several cases of in HNSCC. B, Summary of MET expression levels detected in HNSCC (n = 57) and in normal epithelium (n = 51) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

to the log-rank method. For multivariate analysis, the Cox proportional hazards method was used. Throughout, a P value $<.05$ was deemed statistically significant.

3 | RESULTS

MET expression in HNSCC and normal adjacent tissue from the Berlin cohort was studied by immunohistochemistry of FFPE samples. While MET was only weakly detectable in the basal layers of normal epithelium, many cases of moderate and even strong MET expression could be detected in tumor samples (Figure 1A). Comparison of 57 HNSCC samples with the 51 available normal adjacent samples

clearly revealed that MET is overexpressed in HNSCC (Figure 1B).

To test the relevance of MET expression for the growth of HNSCC cells, the activity of BAY-853474 — a highly potent and specific MET inhibitor²⁰ — was determined in a panel of HNSCC cell lines. As a positive control of sensitivity of HNSCC cell lines, the combination of cisplatin/fluorouracil, the clinically used standard chemotherapy for HNSCC, was used. All 12 HNSCC cell lines (and four gastric cancer cell lines) responded to micromolar concentrations of cisplatin/fluorouracil, as expected (Figure 2A). In contrast, none of the 12 HNSCC cell lines was sensitive to MET inhibition regardless of MET expression levels or MET

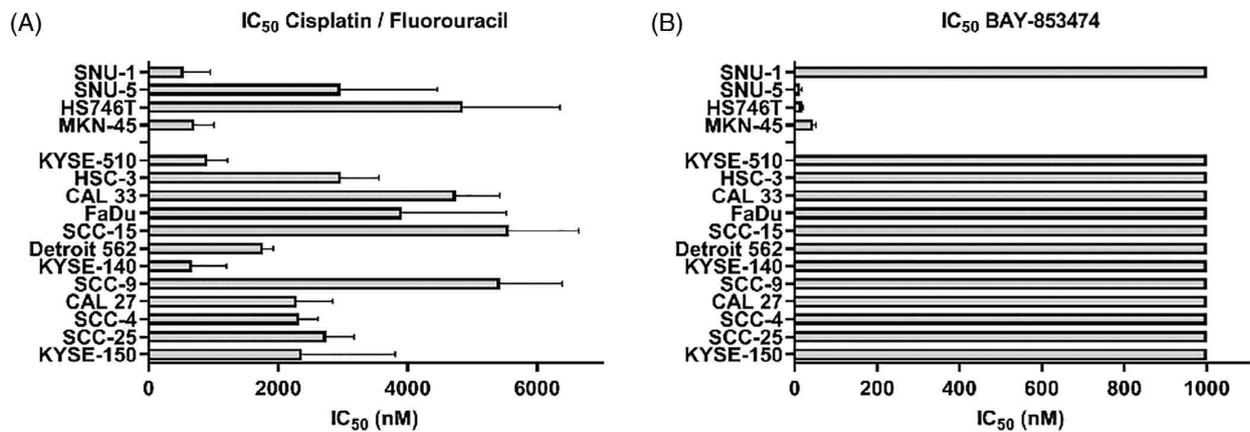


FIGURE 2 A, Response of HNSCC and gastric cancer cell lines to cisplatin/fluorouracil treatment was in the expected range (fluorouracil concentration indicated on the x-axis), with all cell lines sensitive to this treatment. B, Response of HNSCC and gastric cancer cell lines to BAY-853474. Gastric cancer cell lines were highly sensitive while none of the HNSCC cell lines responded to MET inhibition

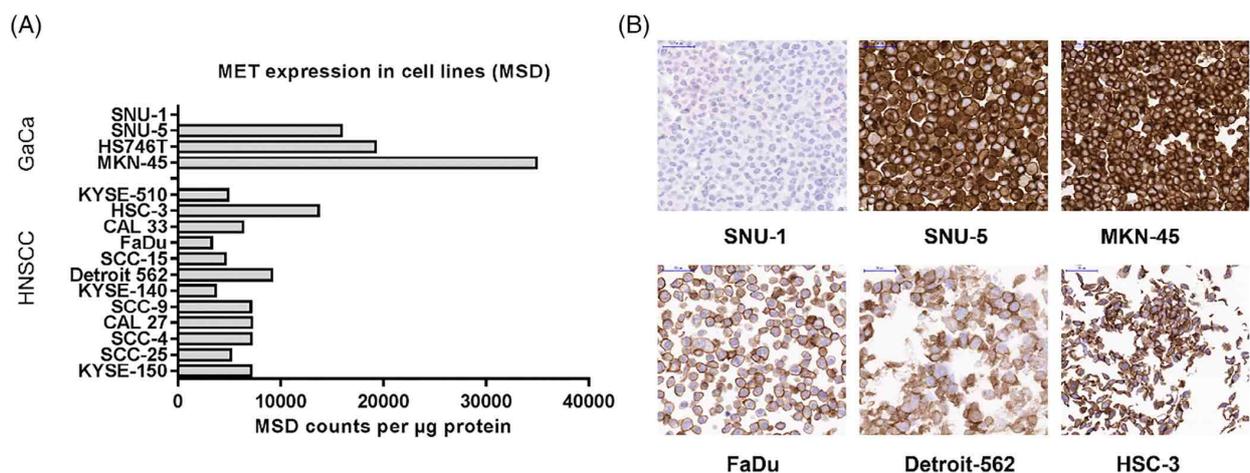


FIGURE 3 A, HNSCC cell lines express MET, as shown by MSD. The levels reach approximately one third of those detected in gastric cancer cell lines with MET amplifications. B, Representative images after MET immunohistochemical staining showing well-detectable expression of MET in HNSCC cell lines [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

phosphorylation (Figure 2B). As a positive control of the MET inhibitor, gastric cancer cell lines with known sensitivity toward MET inhibition were used. In contrast to the gastric cancer control cell lines with genomic amplification of MET (SNU-5, HS746T, and MKN-45) that had low nanomolar IC_{50} values, MET-negative SNU-1 cells did not respond to MET inhibition up to 1 μ M (Figure 2B). The cell lines used are frequently used as models for MET sensitivity, these are also sensitive to MET inhibition *in vivo*. Also in xenografts, only models with very high MET expression and phosphorylation (HS746T, MKN45, NCI-H1993, U87MG) react to inhibition whereas low expressers (DU145, MDA-MB-231, HCT116) show no response²⁰ (and data not shown).

To understand the differences between responding and nonresponding cell lines, MET expression in the cell line panel was tested. A quantitative sandwich immunoassay (MSD) for MET expression revealed that the expression levels in HNSCC cells were roughly one third of that measured in MET-dependent gastric cancer cell lines (Figure 3A). For comparison, we also used immunohistochemistry to evaluate MET expression levels. MET expression was detected in HNSCC cells but it became evident that MET-dependent gastric cancer cell lines such as

SNU-5 and MKN-45 express much higher MET protein levels than MET-independent cell lines (Figure 3B).

For comparison with an indication in which genomic MET amplifications and MET-dependent tumor cell growth have been described,²¹ we tested MET expression and activity in a number of human gastric cancer samples (samples obtained from Individumed, Hamburg, Germany). In line with published data on the prevalence of MET amplification in gastric cancer, we found two of 20 cases with extremely high MET expression using immunohistochemistry for FFPE samples (Figure 4A) and using MSD for fresh frozen samples (Figure 4B). Sandwich immunoassays such as MSD can also be used to specifically detect phosphorylation of target proteins. MET tyrosine-1349 is phosphorylated during receptor activation and serves as docking site for cytoplasmic adaptor proteins like Gab1 and Grb2 for signal transduction.²² Therefore, we investigated tyrosine-1349 phosphorylation using the pY-1349 MSD assay. High levels of tyrosine-1349 phosphorylation were also found, indicating activation of the MET pathway in these gastric cancer samples (Figure 4B). MET amplification and high phosphorylation levels resulting are unique for gastric cancer. We also tested 20 samples each of breast cancer,

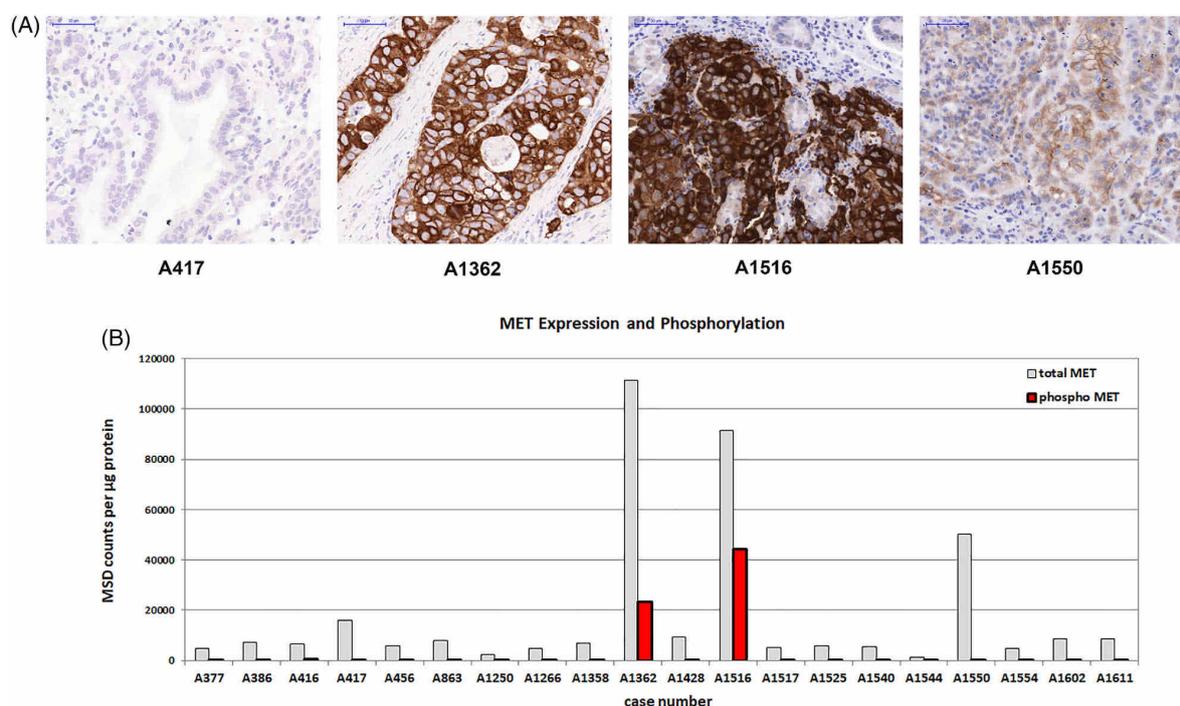


FIGURE 4 A, Representative images after MET immunohistochemical staining of gastric cancer samples ($n = 20$). B, Quantitative analysis (MSD) of MET expression in matched frozen samples ($n = 20$) from the same patients confirmed the MET-positive cases. Two high expressers were also positive for phosphotyrosine-1349 in MET, indicating active signaling [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

colorectal cancer, prostate cancer and NSCLC (samples also obtained from Individumed, Hamburg, Germany) but could not identify a single case of high MET phosphorylation in these samples, albeit many colorectal and some NSCLC samples displayed significant MET expression (Figure S1).

The relevance of MET expression and activity in HNSCC was evaluated by testing fresh frozen samples for MET expression and tyrosine-1349 phosphorylation. The quantitative assay (MSD) confirmed a significant overexpression of MET in HNSCC samples (Figure 5A); however, the extent of overexpression was not high enough to drive receptor activation. Tyrosine-1349 phosphorylation was low in normal adjacent and in tumor samples with

only a nonsignificant increase found in the latter (Figure 5B).

We also compared the properties of the HNSCC cell lines to those of fresh frozen tumor biopsies from 50 patients. Relative to the group of MET-dependent gastric cancer cell lines, MET expression in HNSCC cell lines was lower; the expression level in fresh clinical HNSCC samples was dramatically lower than that of responder cell lines (Figure 5C). We also investigated the MET phosphorylation as readout of pathway activity. Strikingly, Tyrosine-1349 phosphorylation in HNSCC cell lines was two orders of magnitude below that of the group of responder cell lines from gastric cancer. The phosphorylation level in clinical HNSCC samples was

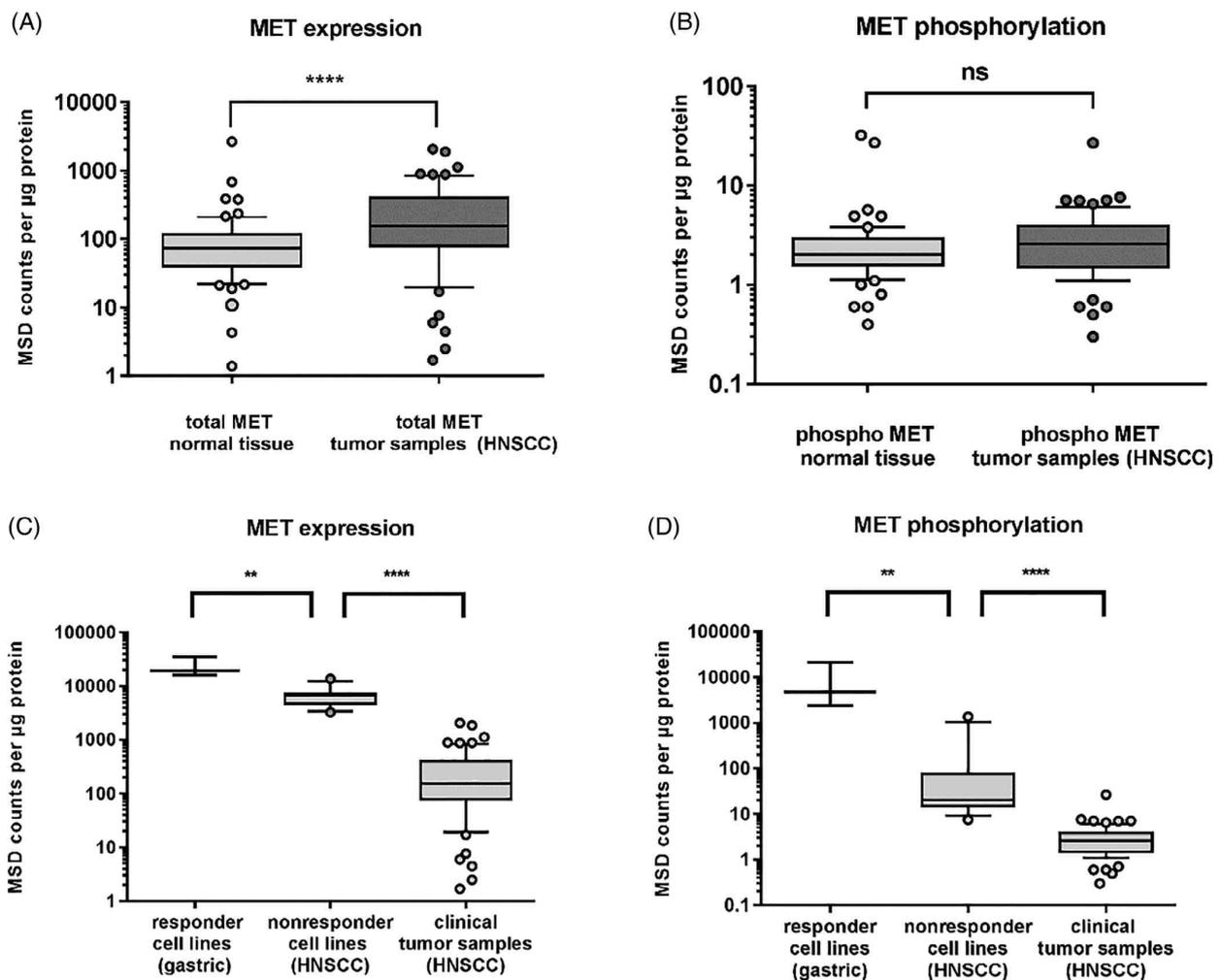


FIGURE 5 A, Overexpression of MET in HNSCC samples, as shown by MSD. B, There is no increase in MET phosphorylation in HNSCC samples ($n = 62$) compared to normal adjacent tissue ($n = 60$). C, MET expression in clinical tumor samples is far below that found in HNSCC cell lines ($n = 12$) where it is already significantly lower than MET-sensitive gastric cancer cell lines ($n = 3$). D, MET phosphorylation levels indicated that the signaling activity of HNSCC cell lines and clinical samples is far below that found in MET-sensitive gastric cancer cell lines (also compared to the gastric cancer clinical samples (Figure 4)

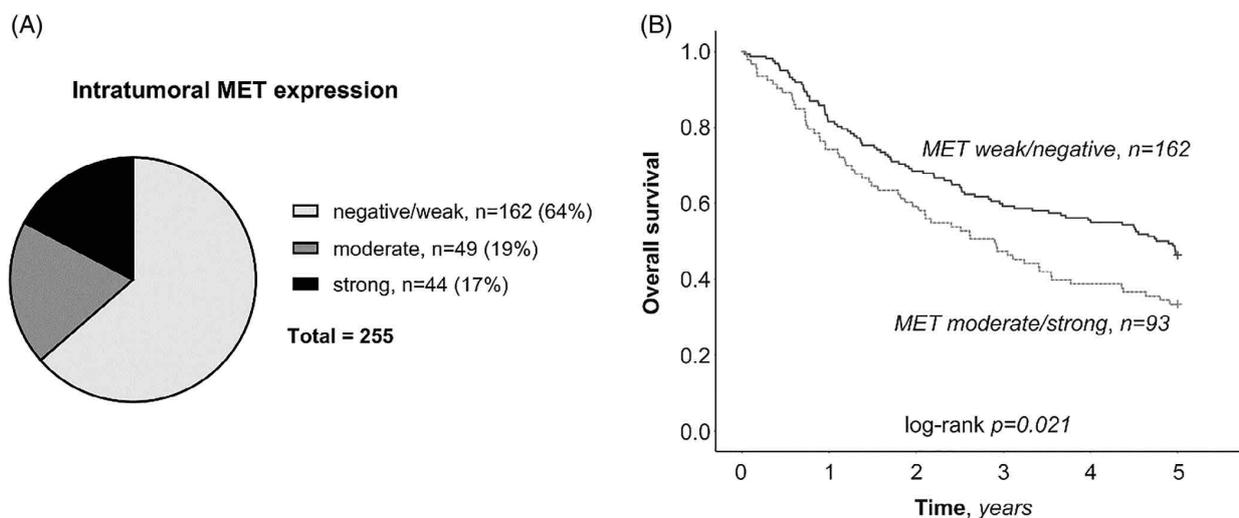


FIGURE 6 A, MET expression levels in the finish patient cohort. B, MET overexpression has a statistically significant impact on patient 5-year overall survival

even three orders of magnitude below that of responder cell lines (Figure 5D). We are aware that cell lines and tumor samples are difficult to compare and the MET concentration in tumor samples is to a certain degree diluted by stroma cells, infiltrating immune cells, and extracellular matrix. However, this dilution factor would not be larger than factor 2 because HNSCC has a relatively high tumor cell content but not a very high stroma content (in contrast to eg, pancreatic cancer). In this analysis, it became evident that clinical HNSCC samples had strikingly lower MET expression and phosphorylation, even compared to the HNSCC cell lines. Based on these findings, a clinical response to MET inhibitors cannot be expected in unselected patients. The analysis of publicly available RNAseq data on MET expression and gene amplification supported our findings and showed that if existing, functionally relevant amplifications must be very rare. Among 528 cases, not a single amplification with resulting high mRNA expression was identified. In contrast, such cases could be found in gastric, lung, and even in a single case of breast cancer (Figure S3).

To assess a possible prognostic role of MET expression in HNSCC, a larger cohort of 255 patients (Table 2), for which follow-up data were available and studied. MET immunostaining was scored as negative or weak in samples corresponding to 162 patients, moderate in 49 patients and strong in 44 patients. There was no significant correlation of MET expression with clinical characteristics such as patient age, tumor site, clinical stage, nodal or distant metastasis, or tobacco and alcohol consumption or human papilloma virus (HPV) status. MET

positivity was somewhat more frequent in patients with higher T class (T1-2 49/155 patients vs T3-4 90/249 patients), but this did not reach significance ($P = 0.06$). The second clinical cohort tested also contained cases of MET overexpression (Figure 6A). It appears that MET expression may give a growth advantage to tumor cells although it is clearly not fulfilling the criteria for an oncogenic driver in this indication. The significant overexpression of MET in HNSCC tumor tissue and the very strong overexpression in cell lines compared to clinical samples suggests that MET expression may have a selective advantage for the tumor cells.

There was a significantly worse overall survival in patients with moderate or strong positive MET immunoreactivity, as assessed by the Kaplan-Meier method (median survival 35 vs 59 months, $P = 0.02$, Figure 6B). The difference in disease-free survival or time to locoregional failure in MET weak compared to MET moderate or strong positive patients did not reach significance. In a multivariate analysis, the prognostic effect of MET immunoreactivity did not reach significance. Furthermore, in a multivariate analysis, the prognostic effect of MET immunoreactivity did not reach significance. The prognostic impact of MET overexpression was especially evident in the 148 nodal negative patients (weak 91 and 57 positive patients, $P = 0.04$) and the 155 patients with T class 1-2 (weak 106 and 49 positive patients, $P = 0.06$). Regarding HPV status, in p16 positive patients, MET expression had a strong prognostic value (30 vs 13 patients, $P = 0.01$) regardless of primary tumor site. Interestingly, overall, in MET positive patients, p16 immunoreactivity had no prognostic role.

4 | DISCUSSION

MET overexpression in HNSCC has been outlined in many publications and the prognostic value of MET expression has led to the conclusion that MET is a promising target for therapy for HNSCC.²³ While our study has confirmed well-detectable expression levels of MET in HNSCC cell lines and in clinical samples, we cannot confirm the therapeutic relevance of MET inhibition in this indication. Seiwert et al²³ have claimed that MET inhibition causes decreased cell viability in HNSCC; however, this was only observed at micromolar concentration, by far exceeding the concentration necessary for inhibition of MET phosphorylation and downstream signaling in different cell lines, indicating nonspecific effects as mechanism of action. Moreover, the potent and selective ALK/MET inhibitor crizotinib (approved for treatment of ALK-positive NSCLC) did not advance to clinical testing for efficacy in HNSCC. Literature on MET inhibitors in HNSCC models is scarce. Knowles et al claimed a relevance of MET signaling in HNSCC¹⁴; however, the study only tested three cell lines, resulting in IC₅₀ values of 4 μ M, even though MET signaling is already completely blocked with 25 nM crizotinib. Baschnagel et al demonstrated a lack of crizotinib activity in several HNSCC models²⁴; thus, although MET phosphorylation was blocked by crizotinib, the downstream signaling as tested by AKT and MAPK phosphorylation was not affected. Therefore, other drivers of cell growth are suspected of being active in these models. Another recent study also showed only marginal activity of Crizotinib in HNSCC cell lines.²⁵ From these data, we conclude that MET signaling is not the relevant driver of cell growth in HNSCC and any observed effects with compound treatments are off-target effects as a result of high concentrations of MET inhibitors.

The most convincing data on crizotinib activity in HNSCC actually comes from a study by Sun et al²⁶ where striking effects on metastasis and survival were observed after intracardiac injection of cancer stem cells. These findings are in line with the described function of MET in motility and metastasis.¹⁰ We conclude that rather than targeting the bulk tumor mass, MET inhibitors should be used in an adjuvant manner postsurgery.

For this study, we used BAY-853474 as MET inhibitor, this is a highly selective and potent MET inhibitor as described previously.²⁰ BAY-853474 is active not only toward gastric cancer cell lines as shown here but also toward the NSCLC cell line NCI-H1993 with a genomic amplification of MET and even an autocrine HGF-secreting glioblastoma cell line (U87MG). The inhibitor has 1 nM potency in the biochemical kinase assay and displays IC₅₀ values ranging from 3 nM in NCI-H1993

(the most sensitive cell line) and 100 nM in U87MG (the least sensitive responsive cell line). Among 200 other kinases in a commercial specificity panel only Rsk2 was inhibited but with a potency of only 906 nM.

A recent study revealed overexpression of MET protein with no genomic amplifications and only a modest copy number gain in HNSCC patients.²⁷ In this larger study of 335 cases, not a single genomic amplification was identified. Sixty-seven of 335 (16.9%) of the cases harbored a modest copy number gain, whereas none harbored amplification. This shows in line with our findings that MET amplification and oncogenic addiction are extremely rare if existing. The bioinformatic analysis of RNAseq vs copy number data from the cBio portal also confirmed the lack of strong overexpressers in a data set of 528 HNSCC cases. However, a trend to prognostic relevance was identified and significant correlation between increased MET expression and overall survival was seen only in a subset of HNSCC patients with complete resection.²⁷ A worse prognosis was also found by Xu,²⁸ Ozawa,²⁹ and Li,³⁰ and their coworkers. Madoz-Gurpide et al also confirmed the overexpression of MET and its significance for prognostic values, as well as describing an increase in MET phosphorylation³¹; however, the anti-phospho antibody used in this study (clone 3D7, pY1234/35) cross-reacts with the very similar activation loop of EGFR (von Ahsen unpublished).

The prognostic role of MET in HNSCC has been studied previously and was recently subjected to meta-analysis.^{8,32} MET immunoreactivity was associated with worse overall survival in HNSCC patients in most investigations. In our patient material, however, the effect of MET immunoreactivity on 5-year overall survival was slight and did not reach significance in a multivariate analysis. HPV positivity (p16 overexpression) is linked to much more favorable prognosis in HNSCC, especially in oropharyngeal squamous cell carcinomas. However, recent publications where de-escalation strategy have been used in p16 positive HNSCC patient treatment, have been disappointing. Our finding that HNSCC patients having MET overexpression, lost their p16 survival benefit, is very intriguing and might offer one mechanistic explanation for the poor de-escalation results when only p16 staining is used in HNSCC patient treatment stratification. In contrast to several other studies, we have used a homogeneous population-based TMA material, adding to the credibility of our results. Various cutoffs for high MET expression have been used in different studies. In our survival analysis, patients with samples having either moderate or strong MET immunostaining intensity had worse overall survival than patients whose samples displayed negative or weak staining intensity, suggesting

that a relatively low cutoff may be sufficient in identifying MET positivity.

5 | CONCLUSION

We have shown that MET expression in HNSCC cell lines is not comparable to clinical specimens. Moreover, because of the low molecular activity of the MET pathway in HNSCC tumors, it is unlikely that MET inhibition would result in tumor shrinkage. Our data strongly suggest that MET is not a valid tumor target in nonselected HNSCC patients. Nevertheless, based on previous studies and our immunohistochemical analyses, there may exist certain subpopulations of HNSCC patients that may benefit from MET detection, either in the treatment of cancer stem cells and metastasis or in the selection of an appropriate cancer treatment modality. Future clinical studies should therefore address the adjuvant use of MET inhibitors that may prolong the time to relapse and increase overall survival by targeting minimal residual disease or small metastases of HNSCC. Also, the possible clinical use of MET in the identification of patients with more aggressive types of HNSCC should be further investigated.

CONFLICT OF INTEREST

TK, ES, HGR, AAS, and OvA are full-time employees and/or stockowners of Bayer AG.

ORCID

Oliver von Ahsen  <https://orcid.org/0000-0003-1906-9078>

REFERENCES

1. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.
2. Boeckx C, Baay M, Wouters A, et al. Anti-epidermal growth factor receptor therapy in head and neck squamous cell carcinoma: focus on potential molecular mechanisms of drug resistance. *Oncologist*. 2013;18(7):850-864.
3. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006;354(6):567-578.
4. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(11):1116-1127.
5. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1856-1867.
6. Chow LQM, Haddad R, Gupta S, et al. Antitumor activity of Pembrolizumab in biomarker-unselected patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: results from the phase Ib KEYNOTE-012 expansion cohort. *J Clin Oncol*. 2016;34(32):3838-3845.
7. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011;3(1 Suppl):S7-s19.
8. Vsiansky V, Gumulec J. Prognostic role of c-Met in head and neck squamous cell cancer tissues: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1):10370.
9. Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2207-2214.
10. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis: motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(12):915-925.
11. Goetsch L, Caussanel V, Corvaia N. Biological significance and targeting of c-met tyrosine kinase receptor in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18:454-473.
12. Moriyama T, Kataoka H, Tsubouchi H, Koono M. Concomitant expression of hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator and c-met genes in human glioma cells in vitro. *FEBS Lett*. 1995;372(1):78-82.
13. Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, et al. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res*. 1997;57(23):5391-5398.
14. Knowles LM, Stabile LP, Egloff AM, et al. HGF and c-met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(11):3740-3750.
15. Marshall DD, Kornberg LJ. Overexpression of scatter factor and its receptor (c-met) in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 1998;108(9):1413-1417.
16. Kim CH, Moon SK, Bae JH, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2006;126(1):88-94.
17. Chen YS, Wang JT, Chang YF, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-met protein is significantly associated with the progression of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(4):209-217.
18. Morello S, Olivero M, Aimetti M, et al. MET receptor is overexpressed but not mutated in oral squamous cell carcinomas. *J Cell Physiol*. 2001;189(3):285-290.
19. Arnold L, Enders J, Thomas SM. Activated HGF-c-Met axis in head and neck cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(12), 169.
20. Klotz M, Schmid E, Steiner-Hahn K, et al. Preclinical evaluation of biomarkers for response monitoring to the MET inhibitor BAY-853474. *Biomarkers*. 2012;17(4):325-335.
21. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(6):504-516.
22. Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W. Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2 and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol*. 2000;149(7):1419-1432.
23. Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, et al. The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2009;69(7):3021-3031.
24. Baschnagel AM, Galoforo S, Thibodeau BJ, et al. Crizotinib fails to enhance the effect of radiation in head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Anticancer Res*. 2015;35(11):5973-5982.

25. Beizaei K, Gleissner L, Hoffer K, et al. Receptor tyrosine kinase MET as potential target of multi-kinase inhibitor and radiosensitizer Sorafenib in HNSCC. *Head Neck*. 2019;41(1):208-215.
26. Sun S, Liu S, Duan SZ, et al. Targeting the c-Met/FZD8 signaling axis eliminates patient-derived cancer stem-like cells in head and neck squamous carcinomas. *Cancer Res*. 2014;74(24):7546-7559.
27. Cho YA, Kim EK, Heo SJ, et al. Alteration status and prognostic value of MET in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer*. 2016;7(15):2197-2206.
28. Xu Y, Peng Z, Li Z, et al. Expression and clinical significance of c-Met in advanced esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2015;15:6.
29. Ozawa Y, Nakamura Y, Fujishima F, et al. C-Met in esophageal squamous cell carcinoma: an independent prognostic factor and potential therapeutic target. *BMC Cancer*. 2015;15:451.
30. Li Y, Li W, He Q, et al. Prognostic value of MET protein overexpression and gene amplification in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(15):13309-13319.
31. Madoz-Gurpide J, Zazo S, Chamizo C, et al. Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *J Transl Med*. 2015;13:282.
32. Kim JH, Kim BJ, Kim HS. Clinicopathological impacts of high c-met expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis and review. *Oncotarget*. 2017;8(68):113120-113128.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Khan M, Khaznadar SS, Routila J, et al. Hepatocyte Growth Factor Receptor overexpression predicts reduced survival but its targeting is not effective in unselected HNSCC patients. *Head & Neck*. 2020;42:625–635. <https://doi.org/10.1002/hed.26049>

4. Danksagung

Diese Arbeit möchte ich all denjenigen widmen, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützten und motivierten.

Zunächst möchte ich allen Patientinnen und Patienten danken, welche der Weiterverwendung entnommener Gewebeproben für medizinische Forschungszwecke zustimmten und damit Teile dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichten. Ebenfalls gilt mein Dank meinem Co-Autor, Dr. Martin Khan, für die Überlassung der Proben.

Außerordentlicher Dank gebührt meinen Mentoren, Herrn Prof. Dr. Volker Schmitz und Dr. Oliver von Ahsen, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, an Forschung und Entwicklung teilhaben zu dürfen. Mit ihrer tiefgreifenden Expertise und Erfahrung unterstützten sie mich in Theorie und Praxis und begeisterten mich für die onkologische Fachdisziplin. Ebenfalls gebührt mein Dank der Bayer AG, welche die Durchführung der Projekte finanziell und strukturell ermöglichte sowie dem gesamten Team der Abteilung für Biomarkerforschung am Standort Berlin unter der Leitung von Dr. Thomas Krahn, welches eine Arbeitsatmosphäre schuf, in der ich mich stets willkommen und wertgeschätzt fühlte.

Besonderer Dank gilt Elke Schmid, welche mich einarbeitete und mir aufgrund ihrer tiefgreifenden Erfahrung bei technischen Herausforderungen im Labor stets zur Seite stand.

Ebenfalls danken möchte ich der Universität Bonn, welche mir früh zur Faszination für Wissenschaft und Forschung verhalf und mir die notwendigen Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens vermittelte.

Dr. Johannes Routila und Dr. Sami Ventelä von der Universität Turku danke ich für die Bereitstellung, Färbung und Mikroskopie der Proben aus Finnland, welche für prognostische Studien zur Bedeutung der MET-Expression essenziell waren.

Meiner gesamten Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mich während meiner bisherigen akademischen Laufbahn stets unterstützten und mir in jeder noch so herausfordernden Situation mit Rat und Tat zur Seite standen.

5. Publikationen

Khaznadar S, Khan M, Schmid E, Gebhart S, Becker E, Krahn T, et al. EGFR overexpression is not common in patients with head and neck cancer. Cell lines are not representative for the clinical situation in this indication. *Oncotarget* 2018; 9 (48) 28965–28975. DOI: 10.18632/oncotarget.25656

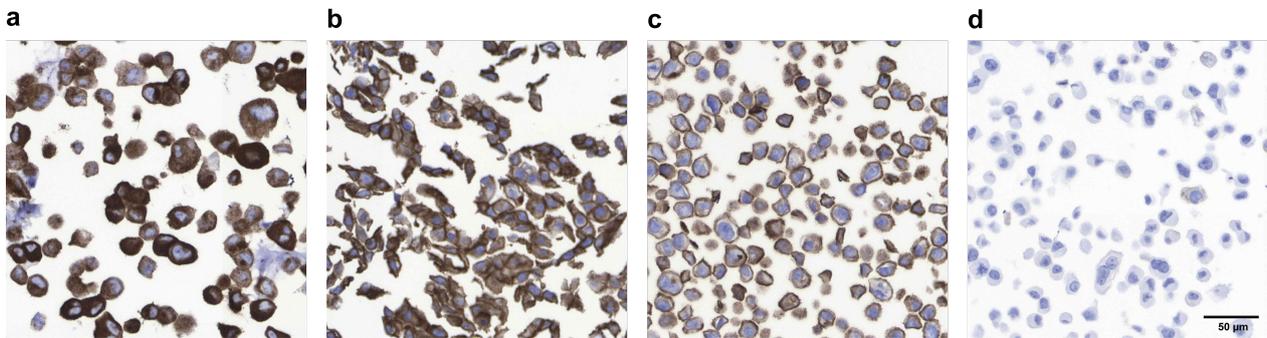
Khan M, Khaznadar S, Routila J, Ventelä S, Schmid E, Gebhart B, et al. Hepatocyte Growth Factor Receptor overexpression predicts reduced survival but its targeting is not effective in unselected HNSCC patients. *Head Neck* 2020; 42 (4): 625–635. DOI: 10.1002/hed.26049

Carmona-Rivera C, Khaznadar S, Shwin K, Irizarry-Caro J, Liu Y, Yu J, Jacobson K, Ombrello A, Stone D, Tsai W, Gadina M, Kastner D, Aksentijevich I, Kaplan M, Grayson P. Deficiency of adenosine deaminase 2 triggers adenosine-mediated NET formation and TNF production in patients with DADA2. *Blood* 2019; 134 (4): 395-406. DOI: 10.1182/blood.2018892752

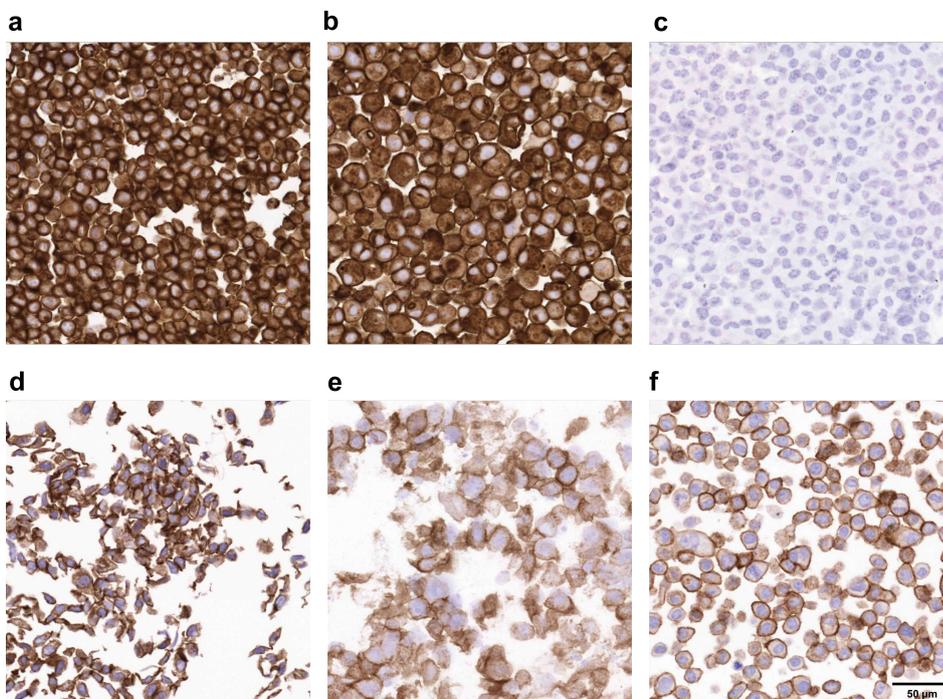
Yu J, Mannes P, Ciancetta A, Gizewski E, Lieberman D, Khaznadar S, Auchampach J, Gao Z, Jacobson K. Structure Activity Relationship of 2-Arylkynyl-adenine Derivatives as Human A3 Adenosine Receptor Antagonists. *MedChemComm* 2018; 9: 1920-1932. DOI: 10.1039/C8MD00317C

Irizarry-Caro J, Carmona-Rivera C, Schwartz D, Khaznadar S, Kaplan M, Grayson P. Drugs implicated in systemic autoimmunity modulate neutrophil extracellular trap formation. *Arthritis Rheumatol* 2018; 70(3): 468-474. DOI: 10.1002/art.40372

Anhang

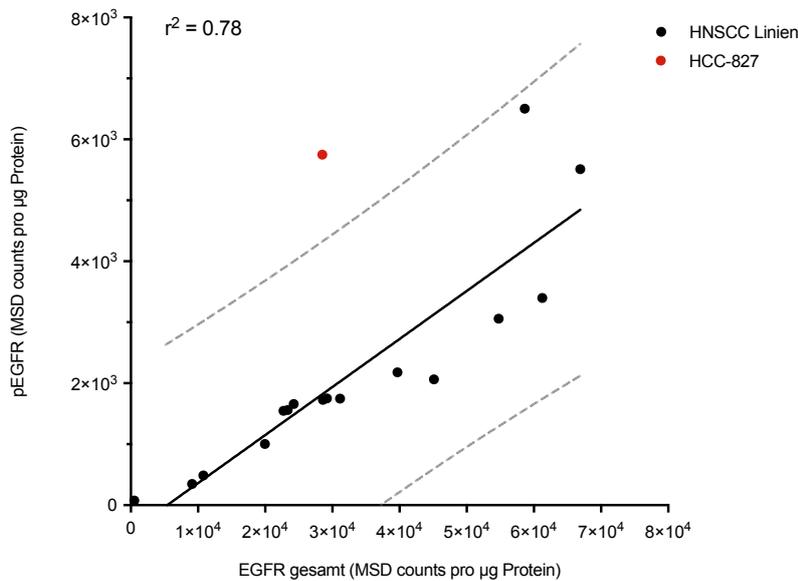


Anhang 1: Immunhistochemische EGFR-Färbung ausgewählter Tumorzelllinien. Der dynamische Bereich zwischen maximaler Expression in der Positivkontrolle HCC-827 (a) und dem Färbesignal der Negativkontrolle KPL-4 (d) ermöglicht eine kontinuierliche Beurteilbarkeit des gesamten Spektrums beobachteter Expressionswerte. Neben den Kontrollzellen sind auch HNSCC-Linien sehr hoher (b, Detroit-562) und geringerer (c, KYSE-510) Färbeintensität abgebildet. Der Primärantikörper (anti-EGFR) D38B1 (Cell Signaling Technologies®) wurde für 2 h in einer Verdünnung von 1:900 aufgetragen. Zellkerne wurden durch Anfärbung mit Hämatoxylin sichtbar gemacht (blau-violett). Der eingezeichnete Maßstab von 50 µm (d) gilt für a-d. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. 2018, Supplement 2.

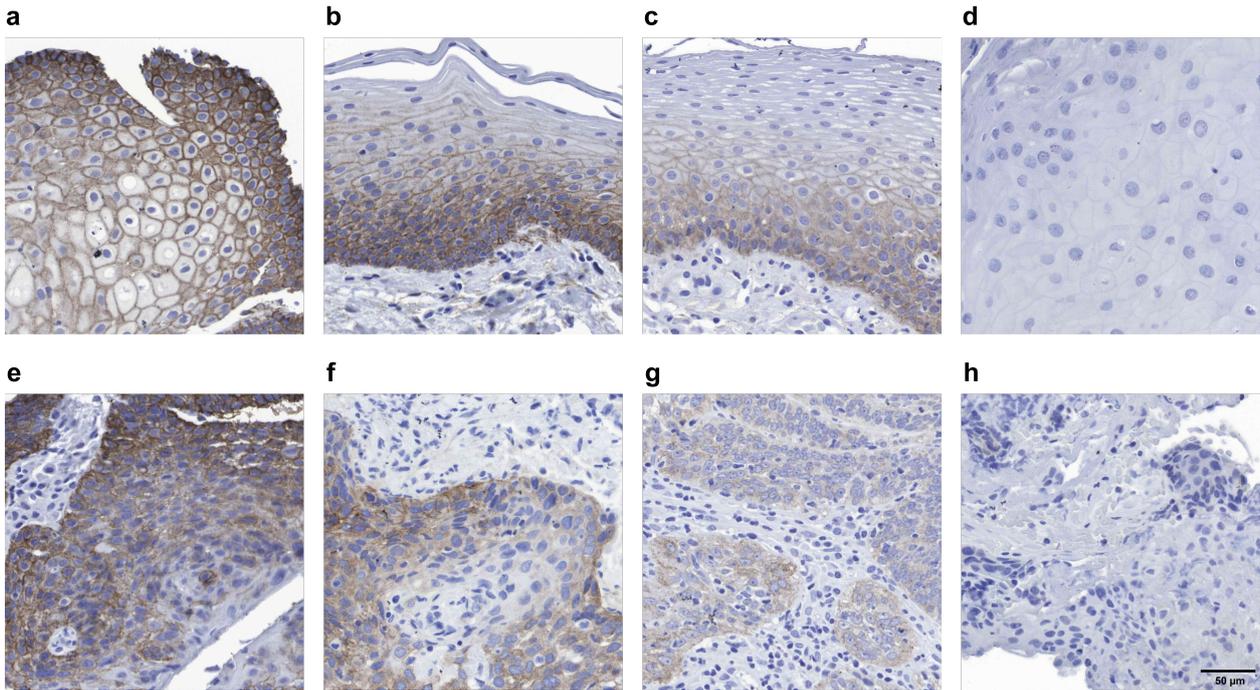


Anhang 2: Immunhistochemische MET-Färbung ausgewählter Tumorzelllinien. Der dynamische Bereich zwischen Expressionen der Positivkontrollen MKN-45 (a) SNU-5 (b)

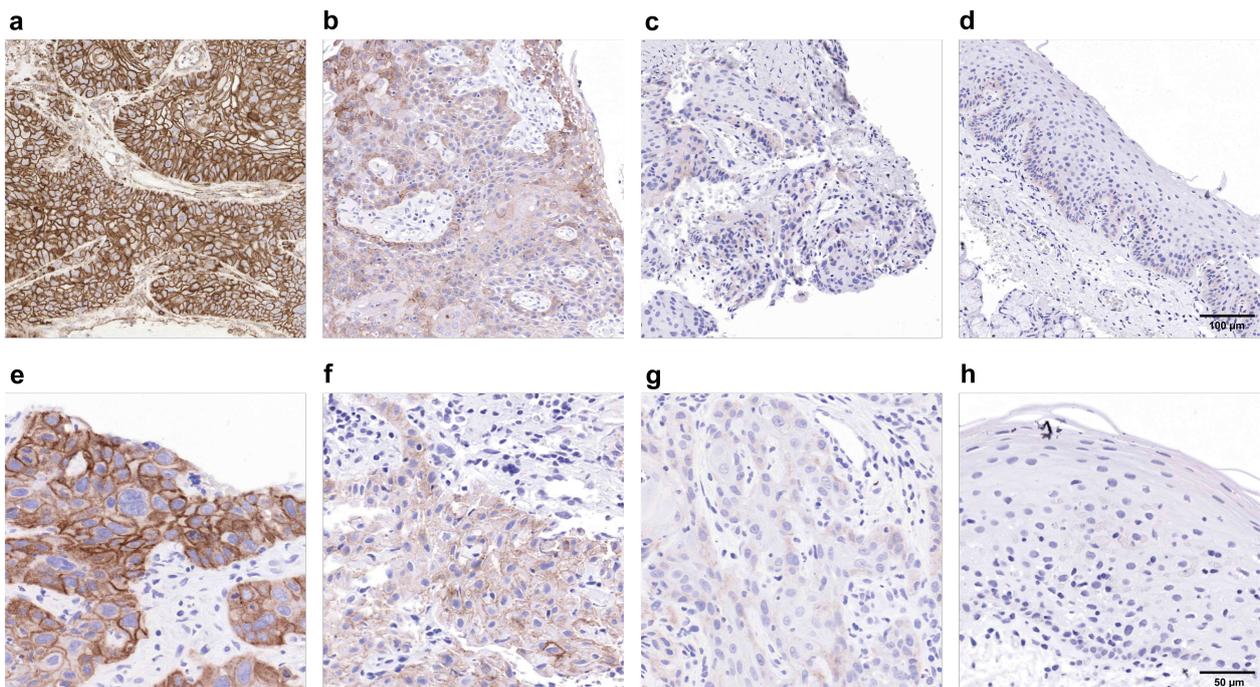
und dem Färbesignal der Negativkontrolle SNU-1 (c) ermöglicht eine graduelle Beurteilbarkeit des gesamten Spektrums beobachteter Expressionswerte. Neben den Kontrollzellen sind auch HNSCC-Linien höherer (d, HSC-3) und geringerer (e, Detroit-562 und f, FaDu) Färbintensität abgebildet. Der Primärantikörper (anti-MET) SP44 (Spring Bioscience™) wurde für 2 h in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen. Zellkerne wurden durch Anfärbung mit Hämatoxylin sichtbar gemacht (blau-violett). Der eingezeichnete Maßstab von 50 µm (f) gilt für a-f. Abbildung adaptiert aus Khan et al. 2020, Supplement 1.



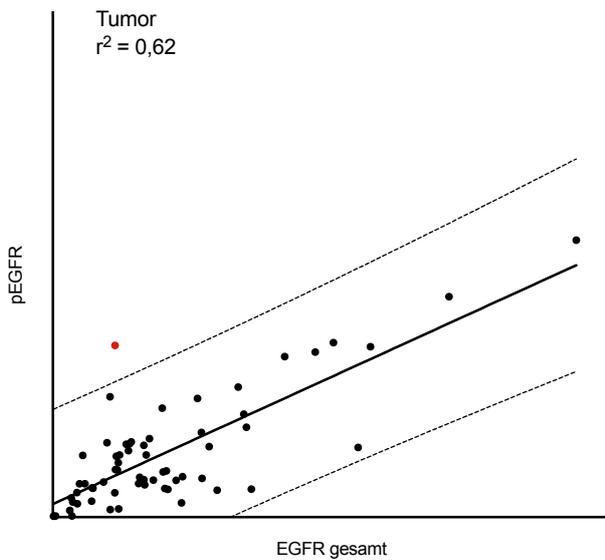
Anhang 3: Dargestellt ist der lineare positive Zusammenhang zwischen EGFR-Expression und Phosphorylierung in HNSCC-Zelllinien und HCC-827 (schwarze Gerade, Korrelationskoeffizient r nach Pearson 0,74). Gestrichelte Geraden stellen die 99 % Vorhersage-Intervalle dar. Deutlich außerhalb des Intervalls liegt die NSCLC Linie HCC-827 (roter Punkt), welche eine aktivierende Mutation im *EGFR*-Gen trägt und eine überproportionale Phosphorylierung zeigt. Das Bestimmtheitsmaß r^2 der Regression beträgt 0,78. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. 2018, Supplement 1.



Anhang 4: Immunohistochemische Anfärbung des EGFR im Normalgewebe (**a-d**) und im Tumor (**e-h**). Dargestellt sind repräsentative Beispiele von anti-EGFR Antikörper D38B1-markiertem Gewebe verschiedener HNSCC-Patienten. Unterschieden wurden eine starke (a und e), moderate (b und f), schwache (c und g) und negative (d und h) Färbung. Zellkerne wurden durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin sichtbar gemacht (blau-violett). Der eingezeichnete Maßstab von 50 µm (h) gilt für a-h. Abbildung adaptiert aus Khaznadar et al. 2018, Supplement 3 und Supplement 4.



Anhang 5: Immunhistochemische Anfärbung von MET in Tumor (**a-c** und **e-g**) und im Normalgewebe (**d** und **h**). Repräsentative Färbeintensitäten von anti-MET Antikörper SP44-markiertem Gewebe acht verschiedener HNSCC-Patienten. Während im Normalgewebe MET kaum exprimiert wird (**d** und **h**), kann in Tumoren eine schwach/negative (**c** und **g**), moderate (**b** und **f**) und starke (**a** und **e**) Expression beobachtet werden. Zellkerne wurden durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin sichtbar gemacht (blau-violett). Für **a-d** gilt der eingezeichnete Maßstab von 100 μm (**d**) und für **e-h** der Maßstab von 50 μm (**h**).



Anhang 6: Dargestellt ist der lineare positive Zusammenhang zwischen EGFR-Expression und Phosphorylierung klinischer Tumorproben (schwarze Gerade, Korrelationskoeffizient r nach Pearson 0,79). Gestrichelte Geraden stellen die 99 % Vorhersage-Intervalle dar. Ein Messpunkt (in rot) liegt außerhalb dieses Intervalls und signalisiert eine überproportionale Phosphorylierung (Tumorprobe 40). Ein weiterer Messpunkt liegt außerhalb der 95 % Vorhersage-Intervalle (Tumorprobe 35, nicht gezeigt). Bei Untersuchung des Normalgewebes lagen beide Datenpunkte unauffällig und in nur geringem Abstand zur Regressionsgeraden. Das Bestimmtheitsmaß r^2 der Regression beträgt 0,62.

Anhang 7: Übersicht über anti-ErbB/MET-Therapeutika in aktueller klinischer Entwicklung für das HNSCC.

Zielstruktur(en)	Substanz(en)	Co-Therapie / Therapie-rahmen	NCT, clinicaltrials.gov (Bezeichnung)	Phase	Studiengruppe / Therapielinie	Biomarker als Kriterium für Einschluss
------------------	--------------	-------------------------------	---------------------------------------	-------	-------------------------------	--

selektive EGFR oder MET-Kinaseinhibitoren

EGFR	Erlotinib	CT	NCT01927744	II	LA, neoadjuvant vor Resektion	—
niedermolekulare Multikinaseinhibitoren der ErbB-Familie oder MET						
EGFR, HER2, HER4	Afatinib		NCT01427478	III	LA, Erhaltungstherapie nach Resektion und RCT	—
	Afatinib		NCT02465060 (MATCH)	II	R/M, vorbehandelt	akt. <i>EGFR</i> Mutation
	Afatinib		NCT03088059 (UPSTREAM)	II	R/M, vorbehandelt	<i>EGFR</i> , <i>HER2</i> Mutation oder Amplifikation
	Afatinib		NCT01415674 (PREDICTOR)	II	LA, neoadjuvant vor Resektion	
	Poziotinib		NCT03292250 (TRIUMPH)	II	R/M, vorbehandelt	<i>EGFR</i> , <i>HER2</i> akt. Mutation, Fusion oder Amplifikation
	Poziotinib		NCT02216916	II	R/M, vorbehandelt	—
EGFR, HER2	Lapatinib	RCT	NCT01711658 (TRYHARD)	II	LA, Erstlinientherapie	—
monoklonale Antikörper						
EGFR	Cetuximab	RT	NCT00956007	III	LA, reseziert	—
	Nimotuzumab	RCT	NCT00957086	III	LA, reseziert	—
	SCT200	CT	NCT03874741	II	R/M, Erstlinientherapie	—
	SCT200		NCT03713372	II	R/M, vorbehandelt	—
Kombinationstherapien mit Cetuximab: duale Kinaseinhibition						
HER2, EGFR	Afatinib	Cetuximab	NCT02979977	II	R/M, vorbehandelt	—
HER3, EGFR	CDX-3379	Cetuximab	NCT03254927	II	R/M, vorbehandelt	—
HGF, EGFR	Ficlatuzumab	Cetuximab	NCT03422536	II	R/M, vorbehandelt	—
CDK4/6, EGFR	Palbociclib	Cetuximab, RT	NCT03389477	II	LA, Erstlinientherapie	—
	Palbociclib	Cetuximab, RT	NCT03024489	I, II	LA, Erstlinientherapie	Verlust von <i>CDKN2A</i>
PI3K, EGFR	Copanlisib	Cetuximab	NCT02822482	I, II	R/M, vorbehandelt	<i>PTEN</i> Verlust, <i>PIK3CA</i> Mutation oder Amplifikation
	Alpelisib	Cetuximab, RT	NCT02282371	I	LA, Erstlinientherapie	—

Anti-EGFR oder anti-MET-Therapeutika in Verbindung mit Checkpoint-Inhibitoren

NKG2A, EGFR	Monalizumab	Cetuximab	NCT04590963 (INTERLINK1)	III	R/M, vorbehandelt*	—
	Monalizumab	Cetuximab	NCT02643550	I, II	R/M, vorbehandelt*	—
PD-L1, EGFR	Avelumab	Cetuximab, RT	NCT02999087 (GORTEC- REACH)	III	LA, Erstlinientherapie	—
	Avelumab	Cetuximab	NCT03494322 (REACH)	II	R/M, vorbehandelt	—
PD-L1, EGFR, CDK4/6	Avelumab	Cetuximab, Palbociclib	NCT03498378	I	R/M (anti-EGFR, -PD-1/L1-naive)	—
IL-15, EGFR	NKTR-255	Cetuximab	NCT04616196	I, II	R/M, vorbehandelt	—
PD-L1, EGFR	Durvalumab	Cetuximab	NCT03691714	II	R/M, vorbehandelt	—
PD-1, EGFR	Pembrolizumab	Cetuximab	NCT03082534	II	R/M, vorbehandelt	—
PD-1, EGFR, HER2, HER4	Pembrolizumab	Afatinib	NCT03695510 (ALPHA)	II	R/M, vorbehandelt	—
PD-1, MET, AXL, RET, VEGFR2	Pembrolizumab	Cabozantinib	NCT03468218	II	R/M, vorbehandelt	—
PD-1, EGFR, TGF- β	Pembrolizumab	BCA101(mAb)	NCT04429542	I	R/M, vorbehandelt	—
PD-1, EGFR	HLX10 (mAb)	HLX07 (mAb)	NCT04297995	II	RM, vorbehandelt	PD-L1-positiv

Anmerkungen zur Tabelle: Die Studien wurden nach den Wirkmechanismen der zu prüfenden Substanzen oder Substanzkombinationen gruppiert und nach Stand klinischer Entwicklung (Phase) in absteigender Reihenfolge gelistet. Sofern Mechanismus-bezogene Biomarker als Einschlusskriterium oder für die Selektion von Studienteilnehmern herangezogen und angegeben wurden, sind diese aufgeführt worden. Die Vorbehandlung des rezidierten oder metastasierten Karzinoms bezieht sich auf die jeweilige Standardtherapie (häufig Platin-basiert, in Einzelfällen (*) galt zusätzlich eine anti-EGFR und/oder anti-PD-(L)1-Therapie als explizites Einschlusskriterium für die Studie). Auf Angaben zur Verblindung, Randomisierung sowie detaillierte Angaben zu Regimen der Therapiearme wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. CT = Chemotherapie, LA = lokal fortgeschrittenes Karzinom, R/M = rezidiertes oder metastasiertes Karzinom, RT = Radiotherapie, RCT = Radiochemotherapie.

Die Recherche erfolgte systematisch unter Verwendung der Datenbank clinicaltrials.gov. Es wurden nur Studien mit Patienten eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle, des Larynx sowie des Naso-, Oro-, oder Hypopharynx berücksichtigt. Im Rahmen des Screenings wurden nur interventionelle Studien der klinischen Phasen I, II und III berücksichtigt. Nicht berücksichtigt hingegen wurden Studien zur Dosisfindung oder Sicherheit ohne Endpunkte zur Wirksamkeit. Da nasopharyngeale sowie HPV-assoziierte oropharyngeale Plattenepithelkarzinome zunehmend als eigenständige Entitäten betrachtet werden, wurden Studien, welche ausschließlich diese Patientengruppen rekrutierten, ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen.