

**Somatische Mutationen im Gen des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors bei
nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und ihre Effekte auf die
Signaltransduktions-Mediatoren Akt, Stat3 und MAPK**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Sebastian Zimmer
aus Giessen

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Büttner
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Torsten Pietsch

Tag der Mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2008

Aus dem Institut für Pathologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard Büttner

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
EINLEITUNG.....	7
<i>Bronchialkarzinome</i>	7
<i>Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)</i>	12
<i>Akt/Protein Kinase B</i>	16
<i>MAPK: Mitogen-activated Protein Kinases</i>	21
<i>STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>	24
MATERIAL UND METHODEN	27
<i>Tumorproben</i>	27
<i>Patienteninformation</i>	27
<i>Tissue Microarrays</i>	27
<i>BioBank Pro</i>	31
<i>DNA Extraktion und Reinigung</i>	33
<i>Polymerasekettenreaktion</i>	34
<i>PEG-Fällung</i>	35
<i>Sequenzierungs PCR</i>	35
<i>Fällungsreaktion zur Reinigung der sequenzierten Produkte</i>	36
<i>Sequenzierung</i>	36
<i>Immunhistochemie</i>	36
<i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)</i>	41
<i>Statistische Analyse</i>	43
ERGEBNISSE.....	44
<i>Patientenkollektiv</i>	44
<i>Mutationsanalyse des EGFR-Gens</i>	45
<i>Expression des EGFR</i>	51
<i>Auswirkungen der Mutationen im EGFR-Gen auf den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors</i>	52
<i>FISH-Analyse</i>	58
DISKUSSION	61
<i>EGFR in NSCLC</i>	61
<i>Prädiktive Diagnostik</i>	64
<i>Molekularpathologische Bedeutung von EGFR-Mutationen</i>	69
<i>Klinische Bedeutung von EGFR-Mutationen</i>	70

ZUSAMMENFASSUNG.....	71
LITERATURVERZEICHNIS	72
DANKSAGUNG.....	83
LEBENS LAUF.....	84

Abkürzungsverzeichnis

1-JÜR	Ein-Jahres-Überlebensrate
5-JÜR	Fünf-Jahres-Überlebensrate
AAH	Atypische adenomatöse Hyperplasie
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretische Hormon
Akt	Proteinkinase B
Apaf-1	Apoptose Protease-aktivierender Faktor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bronchiolo-alveoläres Adenokarzinom
Bcl	B-Zell Lymphom Onkogen
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
c-myc	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin-dependent kinase
CREB	cAMP response element-binding protein
CTMP	Carboxyl-terminal modulator protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGFR-M	Fälle mit EGFR Mutationen
EGFR-WT	Fälle ohne EGFR Mutationen
eIF-4E	Eukaryotic initiation factor-4E
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
Grb	Growth factor receptor bound protein
GRP	Gastrin releasing peptide
GSK-3	Glykogen Synthese Kinase 3
HPLC	High pressure liquid chromatography
Hsp	Heat shock protein
IGFR-1	Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor-Rezeptor
IK-B Kinase	I-kappa-B Kinase
IKK	IK-B Kinasekomplex
IL-6	Interleukin 6
ILK	Integrin-linked kinase
JAK2	Janus-Kinase 2
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
m⁷GTP	7-Methylguanosin-5'-Triphosphat
MAPK	Mitogen activated protein kinases
Mcl-2	Mantle cell lymphoma 2
Mdm2	Mouse double minute 2
MEK	MAP Kinase Kinase
MEKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MNK	MAPK-interacting kinase

Mos	Oocyte maturation factor mos
MSK	Mitogen- and stress-activated protein kinases
NFκB	Nuklear Faktor Kappa B
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PBS	Phosphate buffered saline
PDK-1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PH	Pleckstrin-Homolog
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PY	"pack years"
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RSK	Ribosomale Protein-S6-Kinasen
SAP-1	SRF accessory protein-1
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SCLC	Small cell lung cancer, Kleinzelliges Bronchialkarzinom
SH2	Src homology 2 domain
SOS	Son of Sevenless
Src	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
SRF	Serum response factor
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tcl1	T-Zell Leukaemie 1
TEY-Motivs	Threonin - Glutamat - Tyrosin
TGFα	Transformierender Wachstumsfaktor α
TMA	Tissue microarray
TNM	Tumorausbreitung, Lymphknotenbefall (Nodes), Metastasierung
TP-53	Tumorprotein p53
TRADD	TNF receptor type 1 associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Trb3	Tribbles 3
WHO	Weltgesundheitsorganisation
YAP	Yes-associated protein

Einleitung

Bronchialkarzinome

Die Lunge ist häufig von primären Lungentumoren und Metastasen extrathorakaler Tumore betroffen. Primäre Lungentumoren entspringen zu 95% dem Bronchialepithel (Bronchialkarzinome). Karzinoide, Tumore der Bronchialdrüsen (adenoid-zystisch und mukoepidermoide Karzinome), mesenchymale Neoplasien (z.B. Fibrosarkome und Leiomyome), Lymphome und wenige benigne Läsionen (vor allem Hamatome) bilden die restlichen fünf Prozent.

Das Bronchialkarzinom ist die maligne Entartung von Zellen der Bronchialschleimhaut. Es ist die zweithäufigste Geschwulst bei Frauen und Männern und hat eine extrem schlechte Prognose. Dadurch hat diese Krankheit enorme sozioökonomische Folgen.

Epidemiologie

Anfang des 20. Jahrhunderts war das Bronchialkarzinom noch eine seltene Erkrankung. Mit zunehmender Exposition karzinogener Noxen und ansteigender Lebenserwartung ist es aber zur größten Herausforderung bei malignen Tumorerkrankungen geworden. Mittlerweile ist es unumstritten die häufigste Krebstodesursache weltweit. Bereits seit Mitte der fünfziger Jahre führt es in der Tumortodesstatistik bei amerikanischen Männern und hat 1988 auch bei Frauen das Brustdrüsenkarzinom in Todeszahlen überholt. Insgesamt sind Männer etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Die Mortalitätsrate steht aber im direkten Zusammenhang mit den Rauchgewohnheiten der Bevölkerung. In Ländern, welche schon früh anti-Raucher-Kampagnen initiiert haben (Benelux) sinkt bei Männern seit den 70iger Jahren und bei Frauen seit den 90iger Jahren die Mortalitätsrate. In Ländern wie Deutschland, welche später mit ähnlichen Programmen begonnen haben, sinkt die Mortalitätsrate bei Männern erst seit Ende der 90iger Jahre und steigt bei Frauen nach wie vor an. In Ländern mit steigenden Raucherzahlen, wie z.B. dem ehemaligen Ostblock zeichnet sich ein massiver Anstieg der Mortalität. Die Inzidenz ist bei afroamerikanischen und weißen Frauen etwa gleich, bei afroamerikanischen Männern jedoch 50% größer als bei weißen Männern. Die Mortalität des Bronchialkarzinoms bei Lateinamerikanern, amerikanischen Ureinwohnern und asiatisch/pazifischen Inselbewohnern ist signifikant niedriger als in der afroamerikanischen und weißen Bevölkerung. Lungenkrebs ist zwar die meistdiagnostizierte maligne Erkrankung weltweit, die geographische Verteilung zeigt aber erhebliche Unterschiede. Am häufigsten ist das Bronchialkarzinom in Europa und

Nordamerika, sehr viel seltener jedoch in den Entwicklungsländern von Afrika und Südamerika. Die Hauptinzidenz findet sich zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr (Alberg et al. 2007, Alberg und Samet 2003).

Ätiologie

Hauptursache für die Entwicklung von Lungenkrebs ist die Exposition exogener karzinogener Noxen. Neben Zigarettenrauch zählen auch Radongas, Arsen, Asbest, Chromverbindungen, Chloromethylether, Nickel und polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe zu den primären Noxen. Individuelle genetische Variationen beeinflussen entscheidend die persönliche Anfälligkeit für diese Substanzen (Amos et al. 2008, Hung et al. 2008, Thorgeirsson et al. 2008). Aus noch unerklärten Gründen sind Frauen für die karzinogenen Effekte des Zigarettenrauchens anfälliger als Männer.

Zigarettenrauch ist unumstritten das hauptverantwortliche Karzinogen in der Entstehung eines Bronchialkarzinoms. Neunzig Prozent von Patienten mit neu diagnostiziertem Lungenkrebs rauchen oder haben erst vor kurzem mit dem Rauchen aufgehört. Raucher haben ein 20fach höheres Lungenkrebsrisiko als niemals-Raucher. Es besteht ein fast linearer Zusammenhang zwischen der Lungenkrebsfrequenz und Anzahl der gerauchten Zigaretten („pack-years“; 1py = 20 Zigaretten/Tag/Jahr). Bei einer Verdreifachung der Rauchdauer steigt das Lungentumorrisiko um den Faktor 100. Das Rauchen von Zigaretten mit niedrigerem Teer- und Nikotingehalt senkt das Krebsrisiko nur minimal und ist hauptsächlich eine Marketingstrategie der Tabakkonzerne. Auch das Inhalieren von „Environmental Tobacco Smoke“ (auch Passivrauchen genannt) erhöht das Risiko für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms. Passivraucher haben ein doppelt so hohes Risiko wie die Normalbevölkerung. Erstaunlicherweise ist es bis heute nicht gelungen, Lungentumore durch Zigarettenrauch im Tiermodell zu induzieren.

Die maligne Transformation normaler Bronchialschleimhaut wird, wie bei anderen Neoplasien auch, durch die Akkumulation genetischer Mutationen erklärt. Verlust von Chromosom 3p steht oft am Anfang der karzinogenen Sequenz und wird sogar in großen Anteilen des respiratorischen Epithels von Rauchern ohne Lungenkrebs gefunden. Diese mutierte Mukosa ist ein fruchtbarer Boden („field effect“) für weitere genetische Veränderungen. TP53-Mutation und KRAS-Aktivierung finden sich dann häufig in malignen Zellen.

Morphologie

Histologisch wird das kleinzellige (SCLC) vom nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) unterschieden. Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome werden weiter in Plattenepithel-, Adeno- und undifferenzierte großzellige Karzinome unterteilt. Kombinationen histologischer Typen sind häufig.

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist meist ein lungenzentraler, hellgrauer Knoten mit Infiltrationen in das umliegende Parenchym und Beteiligung der hilären und mediastinalen Lymphknoten. Mikroskopisch finden sich runde bis fusiforme Zellen mit wenig Zytoplasma und fein granuliertem Chromatin. Trotz des Namens sind die Zellen etwa doppelt so groß wie inaktive Lymphozyten. Sie sind instabil und zeigen oft „crush artifacts“ wie Fragmentationen in Biopsiestanzen. Mitosen sind häufig. Wegen des schnellen Wachstums finden sich fast immer nekrotische Areale. Als Abkömmlinge neuroendokriner Zellen produzieren sie diverse Peptide wie ACTH, ADH, GRP und Calcitonin, und können häufig ein paraneoplastisches Syndrom verursachen.

Plattenepithelkarzinome der Lunge sitzen meist in einem zentralen Bronchus und breiten sich auf regionale hiläre Lymphknoten aus. Extrathorakale Absiedlungen treten später auf als bei anderen Typen. Präneoplastische Veränderungen sind häufig schon Jahre vor dem eigentlichen Tumor nachweisbar. Becher- und Basalzell-Hyperplasie, plattenepitheliale Metaplasie und Dysplasien wie Verlust der nuklearen Polarität, nukleäre Hyperchromasie, Pleomorphismus und Mitosen kennzeichnen die Entwicklung eines in-situ-Karzinoms. Erst mit dem Durchbruch der Basalmembran wird es als invasives Karzinom bezeichnet. Histologisch zeigen plattenepitheliale Bronchialkarzinome sehr unterschiedliche Differenzierungsgrade: von gut differenzierten verhornenden Zellschichten bis zu losen undifferenzierten Zellverbänden mit nur rudimentären plattenepithelialen Eigenschaften.

Adenokarzinome kommen auch in zentralen Lungenabschnitten vor, sind aber meistens weiter peripher gelegen. Sie wachsen langsamer als andere NSCLC-Typen, metastasieren aber bereits in frühen Stadien. Azinäre, papilläre und solide Formationen kommen vor. Die Muzinproduktion kann mittels spezieller Färbetechniken dargestellt werden und erleichtert die Diagnosestellung erheblich. Obwohl gelegentlich kleine Foci plattenepithelialer Präneoplasien in der unmittelbaren Umgebung des Tumors vorkommen, gelten sie nicht als Vorstufen des Adenokarzinoms. Als mutmaßlicher Ausgangspunkt des Adenokarzinoms wird die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH) anerkannt. Die AAH ist eine gut demarkierte Ansammlung

proliferierender monoklonaler rechteckiger Zellen, welche Clara Zellen oder Pneumozyten Typ 2 ähneln. Sie zeigen zytologische Atypien wie nukleäre Hyperchromasie, Pleomorphismus, und prominente Nukleoli, aber nicht vom Ausmaß eines ausgereiften Adenokarzinoms. Interessanterweise, werden Adenokarzinome immer zahlreicher und sind mittlerweile sogar häufiger als Plattenepithelkarzinome. Dies wird mit veränderten Rauchergewohnheiten in Zusammenhang gebracht, da bei den neuen Filterzigaretten und sog. „low tar cigarettes“ häufig kompensatorisch tiefer inhaliert wird. Adenokarzinome sind auch der dominierende histologische Typ bei Frauen, Nichtrauchern und Patienten unter 45 Jahren.

Bronchiolo-alveoläre Adenokarzinome (BAC) werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Subtyp der Adenokarzinome klassifiziert. BAC wachsen entlang der vorhandenen Lungenstruktur ohne die alveoläre Architektur der Lunge zu zerstören. Die Tumorzellen bilden eine Monoschicht auf den Alveolarsepten. Es wird vermutet, dass es eine Zwischenstufe vom AAH und dem invasiven Adenokarzinom darstellt. Demnach würde das Adenokarzinom der Lunge einer ähnlichen Adenom/Karzinom Sequenz wie beim Kolonkarzinom folgen.

Großzellige Karzinome haben Eigenschaften von Plattenepithel- und Adenokarzinomen, sind aber nicht ausreichend genug differenziert und sie eindeutig einem Subtyp zuzuordnen. Sie bestehen aus sehr großen anaplastischen Zellen mit großen vesikulären Nuklei und prominenten Nukleoli. Die Prognose dieser Gruppe ist, wie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom besonders schlecht, da sie frühzeitig metastasieren.

Therapie

Die Therapie des Bronchialkarzinoms ist vom Tumorstadium, histologischen Typ, Allgemeinzustand und der körperlichen Verfassung des Patienten abhängig. Da chronische Raucher häufig eine erhebliche kardiovaskuläre Komorbidität und eine eingeschränkte Lungenfunktionsreserve aufweisen, sind dies häufig therapielimitierend Faktoren. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM Klassifikation und ist in Tabelle 1 skizziert.

Patienten mit NSCLC im Stadium I und entsprechend gutem Allgemeinzustand sind geeignet für eine aggressive lokale Therapie mit kurativem Ansatz. Eine routinemäßige Chemotherapie wird nicht empfohlen. Neue Studien konnten allerdings zeigen, dass eine neoadjuvante Chemotherapie praktikabel und sicher ist. Primär inoperable Patienten erhalten eine Strahlentherapie. Adjuvante und neoadjuvante Strahlentherapie verbessern jedoch weder Prognose noch Lebensqualität der Patienten mit Stadium I NSCLC (Smythe 2001, 2003).

Auch im Stadium II des NSCLC, welches insgesamt nur etwa 5-10% aller Fälle ausmacht, ist die primäre Resektion die Therapie der Wahl. Keine adjuvante Therapie konnte bis jetzt eine Verlängerung der Überlebenszeit bei Patienten mit R0 reseziertem Tumor bewirken. Eine postoperative Strahlentherapie sollte für Patienten erwogen werden, bei denen sich im Resektat noch Tumorzellen in unmittelbarer Nähe des Schnittrandes befinden. Für eine adjuvante Chemotherapie fehlen ausreichende Daten und wird deshalb nur im Rahmen von Studien empfohlen. Eine neoadjuvante- oder Induktionstherapie wird derzeit nur für Patienten mit zentral sitzendem Tumor empfohlen (Scott et al. 2007, Scott et al. 2003).

Tabelle 1: Stadieneinteilung der NSCLC

A TNM Klassifikation des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms	
TX	Tumorgröße und Ausbreitung können nicht beurteilt werden
T0	Kein Tumor
Tis	Karzinoma in-situ
T1	≤3 cm, umgeben von Lungenparenchym oder Pleura, bronchoskopisch keinen Befall eines Hauptbronchus
T2	Tumor mit mindestens eines der Folgenden: ≥ 3cm, Befall eines Hauptbronchus ≥ 2cm distal der Karina oder Infiltration der Pleura visceralis
T3	Tumor jeder Größe mit Infiltration von: Thoraxwand, Diaphragma, Pleura mediastinalis oder parietales Perikard; oder ein Tumor des Hauptbronchus <2 cm distal der Karina
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration von: Mediastinum, Herz, der großen Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Karina; oder mehrere neoplastische Läsionen innerhalb eines Lungenlappens; oder Tumor mit malignem Pleuraerguß
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen oder hilären Lymphknoten, ipsi- oder kontralaterale Beteiligung skalenärer oder supraclavikulärer Lymphknoten
MX	Fernmetastasen könne nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
B Staging (Stadieneinteilung) des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms	
Stadium	Definition
Früh	Radiologisch umschriebene Läsion < 2 cm, endoskopisch nur oberflächlich und mit deutlichen Grenzen, überschreitet nicht den Knorpel.
IA	T1, N0, M0
IB	T2, N0, M0
IIA	T1, N1, M0
IIB	T2, N1, M0; T3, N0, M0
IIIA	T1-3, N2, M0
IIIB	T4, jedes N, M0 oder jedes T, N3, M0
IV	Jedes T, jedes N, M1

Übersicht der TNM Klassifikation (A) und Stadieneinteilung (B) des NSCLC (Sobin und Wittekind 2002).

Stadium IIIA ist, mit einer 5-JÜR von nur 23%, das therapeutisch schwierigste und meist umstrittene der NSCLC-Stadien. Es befindet sich in der Grauzone zwischen den primär resektablen Stadien I und II und dem nicht-resektablen Stadium IIIB. Die besten Ergebnisse werden mit einer Kombination aus neoadjuvanter Chemo- oder Radiochemotherapie und chirurgischer Therapie erzielt. Lediglich die postoperative Strahlentherapie wird als adjuvante Therapie bei selektierten Patienten empfohlen, da sie zu einer Reduktion der Lokalrezidive führt. Nicht-operationsfähige Patienten erhalten eine Radiochemotherapie (Robinson et al. 2007, Robinson et al. 2003).

Eine Resektion kann nur bei wenigen selektierten Patienten mit T4, N0, M0 erwogen werden. Sonst ist die Chirurgie nicht Bestandteil der Therapie bei IIIB NSCLC. Die zeitgleich kombinierte Strahlen-Chemotherapie erzielte die besten Ergebnisse in Bezug auf Lebenserwartung und Lebensqualität (Jett et al. 2003).

Stadium IV des NSCLC impliziert die Gegenwart von Fernmetastasen und gilt als unheilbar. Eine frühe zeitlich begrenzte Chemotherapie mit 3. Generation Cisplatin-Präparaten kann bei selektierten Patienten eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit und Verbesserung der Lebensqualität bewirken (Socinski et al. 2003).

Prognose

Die Prognose von Lungenkrebs ist nach wie vor bis heute sehr schlecht: wenn alle Stadien zusammengezählt werden beträgt die 5-JÜR nur etwa 14%, im Vergleich zu 61% beim Kolon-, 86% beim Mamma- und 96% beim Prostatakarzinom. Patienten mit unbehandeltem metastasierten NSCLC haben eine mittlere Überlebenszeit von 4 bis 5 Monaten und einer 1-JÜR von 10%. Eine optimale Therapie verlängert die mittlere Überlebenszeit nur drei bis vier Monate und erhöht die 1-JÜR lediglich auf 33%. Die 5-JÜR ist auch bei einem potentiell resezierbaren Befund schlecht; Stadium IA, 67%; Stadium IB, 57%; Stadium IIA, 55%; Stadium IIIB, 39%; und Stadium IIIA, 23%. Zum Diagnosezeitpunkt haben bereits mehr als 50% der Patienten periphere Metastasen und bei jedem vierten sind regionale Lymphknoten befallen.

Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor ist eine transmembranäre Tyrosinkinase und gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren. ErbB-Rezeptoren übermitteln Signale von extrazellulären Wachstumsfaktoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), transformierenden

Wachstumsfaktor α ($TGF\alpha$) und Neuregulinen an intrazelluläre Signalkaskaden. Diese Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und Physiologie des Menschen, aber auch in der Pathophysiologie und Pathogenese diverser Erkrankungen. Der EGFR hat in letzter Zeit großes Interesse geweckt weil er in vielen Tumorentitäten überexprimiert ist und wichtige karzinogene Funktionen vermittelt.

Struktur des EGFR

Das EGFR-Gen liegt auf Chromosom 7p12, besteht aus 28 Exonen und kodiert ein Protein aus 1186 Aminosäuren, welches durch eine N-terminale Spaltung und konsekutiver Insertion in die Zellmembran entsteht. Für die Translokation an die Zelloberfläche müssen mehr als 20% des 170kDa Rezeptors N-Glykosyliert sein (Sliker et al. 1986). Der EGFR besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne.

Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors besteht aus vier Regionen; L1, CR1, L2 und CR2 (Abbildung 1). Die Bezeichnung L bezieht sich auf Ligand-bindend und CR auf Cystein-reich. L1 und L2 bestehen aus β -Helix Faltblättern und ähneln korrespondierenden Domänen des Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor-Rezeptor (IGFR-1) (Garrett et al. 1998). Liganden binden am EGFR zwischen L1 und L2 (Garrett et al. 2002, Ogiso et al. 2002). CR1 und CR2 enthalten mehrere kleine Module welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Eine große Schleife in CR1 interagiert mit der CR1 Domäne eines zweiten Rezeptors wenn sie als Dimer aneinander gelagert sind.

Die Transmembrandomäne befindet sich zwischen den Aminosäuren 622 und 644 (Ullrich et al. 1984). Sie besteht aus einer α -Helix, welche zum Teil in die juxtamembranäre Domäne hineinreicht (Rigby et al. 1998). Ihr werden diverse regulatorische Funktionen zugeschrieben, wie z.B. basolaterale Sortierung von EGFR polarisierten Zellen, ligandabhängige Rezeptorinternalisierung, und Assoziation mit Proteinen wie Calmodulin und Eps8 (Castagnino et al. 1995, He et al. 2002, Kil und Carlin 2000, Li und Villalobo 2002, Martin-Nieto und Villalobo 1998).

Die Kinasedomäne und die regulatorische C-terminale Sequenz bilden die Intrazellulardomäne des EGFR. Die Kinasedomäne ist analog zu der anderer Tyrosinkinase (Stamos et al. 2002). Adenosintriphosphat (ATP) bindet zwischen dem N-terminalen Ende, einem β -Faltblatt und einer größeren α -helikalen Schleife am C-Terminus. Das Carboxyl-terminale Ende des EGFR enthält

mehrere Tyrosin- und Serinreste. Diese modulieren durch Phosphorylierung die Funktionen des EGFR auf diverse Signaltransduktionskaskaden. Aminosäuren 984-996 interagieren mit Aktin und dienen der Formation von Oligomeren höherer Ordnung und/oder von „receptor-clusters“ nach Ligandaktivierung.

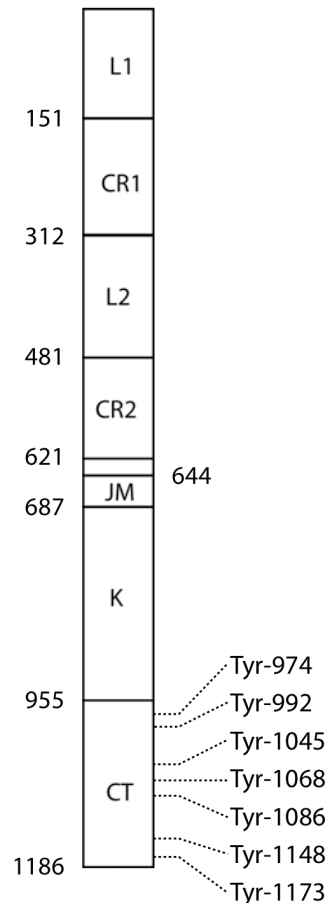


Abbildung 1: Schematische Darstellung des EGFR

Schematische Darstellung des EGFR. Alle Zahlen entsprechen der Codonzahl. L1 und L2 sind die Ligand-bindenden Domänen. CR1 und CR2 sind Cystein-haltig. JM entspricht der juxta- und transmembranären Domäne. Die Kinasedomäne (K) befindet sich zwischen Codon 687 und 955. Die phosphorylierbaren Tyrosinreste welche die Aktivität des EGFR bestimmen sind Teil des C-Terminus (CT).

Aktivierung des EGFR

Nach Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGFR, bildet dieser mit einem anderen ErbB-Rezeptor ein Dimer und die enzymatische Aktivität der intrazellulären Kinasedomäne steigt um ein Vielfaches. Die EGFR-Aktivierung induziert die Migration des EGFR von der „caveolae/raft“ Komponente der Zellmembran in die „bulk-membrane“

Komponente sowie eine Ansammlung von EGFR-Komplexen in „clathrin-coated pits“. Diese werden anschließend Kinase-abhängig internalisiert.

Bindung von Liganden an den EGFR

Mittels proteolytisch erzeugter EGFR-Fragmente konnte gezeigt werden, dass die L2 und CR2 Domänen hauptverantwortlich für die Affinität und Bindung der Liganden sind (Kohda et al. 1993). Allein L2 und kleine Abschnitte von CR1 und CR2 reichen um EGF und TGF α mit einer sub-mikromolaren Affinität zu binden (Lemmon et al. 1997). Dreidimensionale Untersuchungen von EGF und TGF α gebunden an die Ektodomäne des EGFR konnten zeigen, dass beide Liganden in der gleichen Art und Weise binden (Cho und Leahy 2002). Sie interagieren mit der L1 und L2 Domäne des Rezeptors. Arg-41 vom EGF bildet bidentate Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp-355 des EGFR. Eine Seitenkette von Gln-384 des EGFR macht zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen mit Gln-43 O und Arg-45 N der EGF-Hauptkette. Gln-16 und Gly-18 der L1 Domäne bilden drei Wasserstoffbrücken mit Cys-31 und Cys-33 des EGF, so dass das große β -Faltblatt von EGF in den Rezeptor hineinragt. Weiterhin sind auch Gly-39, Tyr-38, Leu-47 an der Formation und Erhaltung der Ligandenkonformation des EGFR beteiligt (Garrett et al. 2002).

Ligandeninduzierte Oligomerisation

Der EGFR kann mit allen ErbB-Rezeptoren Dimere bilden, entweder als Homodimer mit einem anderen EGFR oder als Heterodimer mit ErbB-2, ErbB-3 oder ErbB-4. Der ErbB-2 ist aber der bevorzugte Bindungspartner vom EGFR. Die Formation von Heterotetrameren und Heterokomplexen ist auch möglich, meist werden sie jedoch durch Liganden eines dritten ErbB-Protein induziert.

EGFR-Monomere können bereits katalytisch aktiv sein, aber erst eine Dimerisierung nach Ligandenbindung führt zur vollständigen Aktivierung des Rezeptors. Für eine stabile Dimerisierung interagiert eine Schleife am hinteren Ende der CR1 Domäne des einen Rezeptors mit einer Tasche an der Basis der CR1-Schleife des Partnerrezeptors (Garrett et al. 2002). Phylogenetisch sind die für diese Kopplung wichtigen Aminosäuren durchweg konserviert oder durch Aminosäuren substituiert, welche die Rezeptorinteraktion erhalten (z.B. Phe \rightarrow Tyr) (Ogiso et al. 2002). Eine Erhöhung der Rezeptordichte erleichtert die Dimerisierung, daher befinden sich mehr als die Hälfte der unstimulierten EGFR in der „caveolae“ Region der Zellmembran (welche nur 5-10% der Membran ausmacht) (Mineo et al. 1999). Auch die Transmembran- und Kinasedomänen sind aktiv an der Stabilisierung und Formation von

Dimeren beteiligt. Sie führen zu einer „Rezeptorselbstassoziation“ und erleichtern die Liganden-induzierte Rezeptordimerisierung (Chantry 1995, Schlessinger 1981, Tanner und Kyte 1999).

Liganden-induzierte EGFR-Aktivierung

Ligandbindung an den EGFR führt noch vor der Dimerisierung zu einer Konformationsänderung des Rezeptors (Moriki et al. 2001). L1, CR1 und L2 werden zunächst umorientiert und repositionieren dann CR2 und die intrazellulären Domänen. Es folgt eine Rotation des Rezeptors um einen Drehpunkt oberhalb der Transmembrandomäne, so dass die Intrazellulärdomäne in ihre aktive Kinasekonfiguration reorientiert wird (Humphrey et al. 1988, Kwatra et al. 1992, Malden et al. 1988, Yamazaki et al. 1988).

Die aktive Konfiguration der Intrazellulärdomäne ist energetisch günstiger, wird aber durch die Extrazellulärdomäne des Rezeptors verhindert. Rezeptormutanten ohne die Extrazellulärdomäne sind konstitutiv aktiv und bilden spontan Dimere. Es wird postuliert, dass eine Ligandbindung die Extrazellulärdomänen „entfesselt“ und somit die aktive Rezeptorkonformation ermöglicht (Ge et al. 2002, Groenen et al. 1997).

Funktion des EGFR

Die aktivierte EGFR-Kinase katalysiert eine *trans*-Übertragung des ATP γ -Phosphats an Tyrosinreste von exogenen Substraten und der eigenen C-terminalen Domäne. Der EGFR kann an den Tyrosinen 974, 992, 1045, 1068, 1086, 1148 und 1173 autophosphoryliert werden und durch Src und JAK2 an Tyrosin 845 und 1101 indirekt phosphoryliert werden. Der phosphorylierte EGFR wird von intrazellulären Proteinen erkannt und durch Protein-Protein-Interaktionen werden spezifische Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt, insbesondere Akt, STAT3 und MAPK vermittelte Signalwege.

Akt/Protein Kinase B

Akt ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und gehört zu der AGC-Superfamilie. Proteinkinasen der AGC-Superfamilie sind gekennzeichnet durch homologe Strukturen in der katalytischen Domäne und ähnlichen Aktivierungsmechanismen. Neben Akt gehören noch die cAMP-abhängigen Proteinkinasen A, G und C zur AGC-Superfamilie. Akt/PKB wurde von drei unabhängigen Arbeitsgruppen aufgrund seiner Homologie zur Proteinkinase A (PKA) (Coffer und Woodgett 1991) und C (PKC) (Jones et al. 1991b), und dem zellulären Homolog des retroviralen Onkogens „viral Akt (v-Akt)“ (Bellacosa et al. 1991) identifiziert. In Menschen gibt es

drei Akt/PKB Gene: Akt1/PKB α (Jones et al. 1991a), Akt2/PKB β (Cheng et al. 1992) und Akt3/PKB (Brodbeck et al. 1999) auf den Chromosomen 14q32, 19q13 und 1q44. Akt ist ein zentraler Bestandteil der Signaltransduktion von diversen Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF und Insulin.

Struktur von Akt/PKB

Alle drei Akt Isoformen bestehen aus einer konservierten Domänenstruktur mit einer aminoterminalen Pleckstrin-homologen (PH) Domäne, einer zentralen Kinasedomäne und einer Carboxyl-terminalen regulatorischen Domäne.

Die etwa 100 Aminosäuren der N-terminalen PH-Domäne wurden ursprünglich in Pleckstrin gefunden, dem Hauptphosphorylierungssubstrat der PKC in Thrombozyten (Tyers et al. 1988). PH-Domänen finden sich in diversen Molekülen welche alle 3-Phosphoinositide binden. Die PH-Domäne von Akt interagiert mit membranständigen Lipiden wie dem Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP3) (Ferguson et al. 2000, Lietzke et al. 2000).

Die zentrale katalytische Kinasedomäne von Akt ist mit der von anderen AGC-Kinasen (PKA, PKC, p70S6K und p90RSK) fast identisch (Peterson und Schreiber 1999). Sie enthält ein Threonin (Thr-308 in Akt1) welches nach Phosphorylierung Akt partiell aktiviert (Alessi et al. 1996).

Auf die Kinasedomäne folgt eine C-terminale Sequenz von etwa 40 Aminosäuren. Sie umfasst ein wichtiges hydrophobes Motiv: F-X-X-F/Y-S/T-Y/F (wobei X jede beliebige AA sein kann) (Peterson und Schreiber 1999). Phosphorylierung dieser Serin- und Threoninreste ist für eine maximale Aktivierung von AGC-Kinasen notwendig. Deletion des hydrophoben Motivs führt zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität von Akt. Interessanterweise ist in allen Säugetier-Akt-Isoformen dieses Motiv fast immer identisch, nur in der humanen Akt1-Splicevariante fehlt es gänzlich (Andjelkovic et al. 1997).

Alle Akt Isoformen, außer Akt3, haben zwei regulatorische Phosphorylierungsstellen, Thr-308 in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne und Ser-473 in der C-terminalen regulatorischen Domäne. Eine Phosphorylierung ausschließlich von Ser-473 hat kaum Einfluss auf die Akt-Aktivität, während die Phosphorylierung von Thr-308 eine partielle Aktivierung zur Folge hat. Phosphorylierung beider Aminosäuren ist notwendig für die vollständige Aktivierung (Alessi et al. 1996). Zudem gibt es mindestens drei weitere Tyrosinreste welche phosphoryliert werden: Tyr-

315, Tyr-326 und Tyr-474. Ihre Signifikanz für die Regulation von Akt wird noch kontrovers diskutiert (Chen et al. 2001, Conus et al. 2002).

Akt Aktivierung

Akt kann von Klasse 1A und 1B PI3-Kinasen aktiviert werden. Rezeptor-Tyrosinkinase, wie der EGFR, und G-Protein gekoppelte Rezeptoren induzieren eine Aktivierung von PI3-Kinasen (Wymann et al. 2003). Diese werden dann in die Zellmembran transloziert, wo sie die Phosphorylierung der 3-OH Gruppe von Phosphatidylinositol(4,5)-diphosphat (PIP₂) katalysieren. PIP₃ Konzentrationen werden durch Phosphatasen wie PTEN kontrolliert. Die PH Domäne von Akt bindet mit hoher Affinität an PIP₃ (Simpson und Parsons 2001). PIP₃ ist aber nicht imstande Akt direkt zu aktivieren, es induziert vielmehr seine Translokation in die Zellmembran und modifiziert seine Konformation, so dass es von der phosphoinositid-abhängigen Kinase-1 (PDK-1) phosphoryliert werden kann (Andjelkovic et al. 1997).

Der genaue Phosphorylierungsmechanismus von Thr-308 und Ser-473 ist nicht bekannt. Es gibt aber Indizien dafür, dass Thr-308 durch PDK-1 phosphoryliert wird (Stephens et al. 1998). PIP₃ ist hier wahrscheinlich nicht nur ein Aktivator von PDK-1 sondern interagiert auch mit der PH Domäne von Akt um Thr-308 für PDK-1 zugänglich zu machen (Biondi et al. 2001, Collins et al. 2003). PDK-1 ist ebenfalls an der Phosphorylierung von Ser-473 beteiligt. Ser-473 kann aber auch autophosphoryliert oder von spezifischen Serinkinasen, wie der Integrin-linked Kinase (ILK), phosphoryliert werden (Laine et al. 2000, Toker und Newton 2000).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass Substanzen, welche die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen (Forskolin, Chlorophenylthio-cAMP, Prostaglandin-E1 und 8-Bromo-cAMP), Akt via der Proteinkinase A (PKA) aktivieren (Filippa et al. 1999, Sable et al. 1997). Die PH Domänen von Akt und PI3-Kinasen sind hierfür nicht notwendig. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinasen (Perez-Garcia et al. 2004), Isoproterenol (Moule et al. 1997) und zellulärer Stress/Hitzeschock zusammen mit Hsp27 (Konishi et al. 1997) Akt aktivieren.

Proteine die Akt binden und regulieren

Die meisten Proteine, welche mit Akt interagieren, sind nur Substrate von Akt und beeinflussen nicht seine Kinaseaktivität (Brazil et al. 2002). Es wurde aber eine kleine Gruppe von Proteinen identifiziert, welche die Aktivität von Akt inhibieren oder fördern können.

Tabelle 2: Akt-modulatorische Proteine

Inhibitorische Proteine	
CTMP	„Carboxyl-terminal modulator protein“ reduziert die Phosphorylierung von Ser473 (Maira et al. 2001)
Trb3	Das Homolog von Tribbles in Säugetieren bindet und hemmt die zentrale Region der Akt-Kinasedomäne (Du et al. 2003)
Keratin K10	Bindet Akt und sequestriert es im Zytoskelett. Dies hemmt die intrazelluläre Translokation und Aktivierung von Akt (Paramio et al. 2001)
Positiv Regulatorische Proteine	
Hsp27	Aktiviert Akt und verhindert Apoptose von neutrophilen Granulozyten (Konishi et al. 1997, Rane et al. 2003)
Hsp90	Unterstützt Akt-Aktivierung. Hsp90 Inhibitoren wiederum degradieren Akt (Solit et al. 2003)
Grb10	Rekrutiert Akt in die Plasmamembran nach c-kit Aktivierung (Han et al. 2001, Jahn et al. 2002)
Tcl1	„T-Cell Leukaemia 1 Protein“ hat einen positiven Einfluss auf Akt (Auguin et al. 2004, Laine et al. 2000, Pekarsky et al. 2000)
Ft1	Hilft in der Phosphorylierung von Ser-473 und Thr-308 und der Interaktion mit PDK1 (Remy und Michnick 2004)

Übersicht der Proteine welche die Aktivität von Akt modulieren.

Funktionen von Akt

Der Akt-Signaltransduktionsweg ist ein zentraler Bestandteil in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose. Als Mediator von Wachstumsfaktoren fördert er die Zellzyklusprogression und blockiert die Apoptose, indem er direkt die Regulation des Zellzyklus beeinflusst, die Transkription moduliert und den Zellmetabolismus verändert. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass Akt an der Pathogenese diverser Tumorentitäten beteiligt ist.

Direkte Regulation des Zellzyklus

In Säugetierzellen ist der programmierte Zelltod eine Kaskade diverser, streng kontrollierter Schritte. Sie beginnt meistens mit dem Verlust der Integrität von Mitochondrienmembranen, wodurch Cytochrom-C ins Zytoplasma freigesetzt wird. Cytochrom-C bindet und aktiviert den Apoptose Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) welcher in Folge Caspase-9 spaltet und aktiviert. Caspase-9 induziert eine Reihe weiterer Caspasen, und führt schließlich zum Zelltod (Thornberry und Lazebnik 1998). Akt hat direkte Einwirkungen auf diese Prozesse durch seine Interaktionen mit Proteinen der Bcl-2 Familie (Datta et al. 1997, del Peso et al. 1997), Caspase-9 (Cardone et al. 1998) und dem Stress-aktivierten Proteinkinase (SAPK) Signalweg (Barthwal et al. 2003, Johnson und Lapadat 2002, Kim et al. 2001, Park et al. 2002).

Transkriptionsregulation

Akt und einige seiner Substrate („Forkhead transcription factors“ (Burgering und Medema 2003), I κ -B Kinase (Kane et al. 1999), Mdm2 (Gottlieb et al. 2002, Mayo und Donner 2001), CREB (Du

und Montminy 1998, Wang et al. 1999), YAP (Basu et al. 2003)) modifizieren die Transkription von pro- und anti-apoptischen Faktoren.

Alle vier der Forkhead oder FoxO Transkriptionsfaktoren können von Akt phosphoryliert werden. Viele Proteine mit Einfluss auf Proliferation und Zellzyklus werden von FoxO reguliert, wie z.B. Fas-Ligand, „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL), „TNF receptor type 1 associated death domain“ (TRADD) und intrazellulären Komponenten wie Bim („Bcl-2 interacting mediator of cell death“) oder Bcl-6.

Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist ein zentraler Regulator der zellulären Immunantwort und ist an der Entstehung von Autoimmunerkrankung und Krebs beteiligt. Die NF κ B Aktivität ist stark vom Phosphorylierungsgrad des IK-B Kinasekomplex (IKK) abhängig und Akt kann diesen direkt und indirekt modifizieren.

Akt kann Murine double minute 2 (Mdm-2) binden und an Ser-166 und Ser-186 phosphorylieren. Dies resultiert im nukleären Import von Mdm-2 und Hochregulation seiner Ubiquitinligaseaktivität. Die E3-Mdm-2 Ubiquitinligase reduziert die Expression von p53 und inhibiert dessen Funktion. Somit unterstützt Akt die Inaktivierung und Degradation von pro-apoptischem p53.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Akt den CREB-Transkriptionsfaktor und Yes-assoziiertes Protein (YAP) phosphoryliert. Hierdurch wird die Transkription von anti-apoptischen Proteinen wie Bcl-2, Mcl-2 und p73 gefördert.

Veränderung des Zellmetabolismus

Die Regulation des Zellmetabolismus ist eine der Hauptfunktionen von Akt. Akt fördert die Aufnahme von Glukose und Aminosäuren in die Zelle. Es wird postuliert, dass der Einfluss von Akt auf den Zellmetabolismus auch einen anti-apoptischen Effekt hat. Ein hoher Insulinspiegel induziert, via Akt, die Phosphorylierung und somit Inaktivierung von der Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) (Cross et al. 1995). Inhibition von GSK-3 fördert die Speicherung von Glukose als Glykogen und bietet, auf noch ungeklärte Weise, einen gewissen Schutz gegen Apoptose (Pap und Cooper 1998, Rathmell et al. 2003).

MAPK: Mitogen-activated Protein Kinases

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind eine Familie von ubiquitären Prolin-dirigierten Serin/Threonin Kinasen. Sie bilden Signaltransduktionskaskaden, die wichtig für die Steuerung von Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und dem Zelltod sind. Tabelle 3 gibt einen Überblick der verschiedenen MAPK des Säugetiers. Die weitere Zusammenfassung beschränkt sich auf ERK1 und ERK2, weil nur diese in der Studie untersucht wurden.

Tabelle 3: Übersicht der MAPK und ihrer Phosphorylierungsmotive

MAP Kinase	Alternativer Name	Phosphorylierungsmotiv
ERK1	p44 MAPK	TEY
ERK2	p42 MAPK	TEY
ERK3α	p63, rat ERK3	SEG
ERK3β	Human ERK3	SEG
ERK1b	ERK4	TEY
JNK1	SAPK γ	TPY
JNK2	SAPK α	TPY
JNK3	SAPK β	TPY
p38α	p38, CSBP, SAPK2	TGY
p38β	p38-2	TGY
p38β2		TGY
p38γ	ERK6, SAPK3	TGY
p38δ	SAPK4	TGY
Mxi		TGY
ERK5		TEY
ERK7		TEY
NLK	Nemo-like Kinase	THE
MAK	Male Germ Cell Associated Kinase	TDY
MRK	MAK-related Kinase	TDY
MOK		TEY

MAPK sind ubiquitäre Prolin-dirigierte Serin/Threonin Kinasen. In dieser Arbeit wurden nur ERK1 und ERK2 untersucht. Zur Übersicht sind daher hier weitere wichtige MAPK und deren Phosphorylierungsmotive aufgeführt.

ERK1 und ERK2

Das ERK1 Gen befindet sich auf Chromosom 16 p11.2 und kodiert für ein 43kDa großes Protein. ERK2 ist 41kDa schwer und liegt auf Chromosom 22 q11.21- q11.22. Beide sind ubiquitär exprimiert, zeigen jedoch gewebeabhängige Unterschiede im Expressionsniveau. Sie werden durch eine Reihe von Liganden und zellulären Stimuli, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Stress, Serum, Zytokine, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und transformierende Agentien aktiviert (Boulton et al. 1991, Lewis et al. 1998). Ihre Aktivität ist abhängig von der Phosphorylierung des TEY-Motivs ihrer Aktivierungsschleife. Das bedeutet,

dass die Phosphorylierung von Tyrosin und Threonin, getrennt durch ein Glutamat, in einer ERK1 oder ERK2 Aktivierung resultiert (Payne et al. 1991).

Aktivierungsmechanismus

Grundsätzlich wird die Aktivität von MAPK durch spezifische Phosphorylierungskaskaden reguliert. Die Aktivierung von MAPK erfolgt durch die serielle Phosphorylierung mindestens zweier vorangeschalteter Proteinkinasen (Abbildung 2). Direkt oberhalb einer MAPK befindet sich immer eine MAP/ERK Kinase (MEK oder MKK). Diese sind dual spezifische Enzyme welche von MEKK aktiviert werden und selbst die Hydroxylgruppe von Serin/Threonin und Tyrosin der MAPK phosphorylieren.

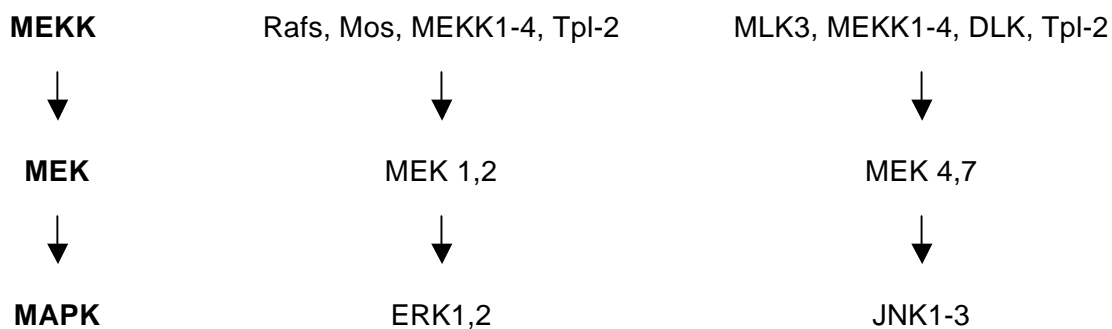


Abbildung 2: Aktivierung von MAPK

Die Aktivierung von MAPK erfolgt durch die serielle Phosphorylierung mindestens zweier vorangeschalteter Proteinkinasen. Zunächst werden MAPK Kinasen phosphoryliert, dann folgen MAPK Kinasen und endlich MAPK. Diese Kaskade dient der Regulation, Spezifität und Amplifikation eines Aktivierungssignals.

Die ERK1/2 aktivierende Phosphorylierungskaskade hat im Wesentlichen drei regulatorische Funktionen: die Spezifität des Signals wird gewährleistet (Corbit et al. 1999, Frost et al. 1997, Schonwasser et al. 1998), das Signal wird amplifiziert (Errede et al. 1995, Stevenson et al. 1992) und ein Schwellenwert wird gesetzt (Ferrell 1997, 1999). Raf Isoformen und Mos aktivieren ausschließlich MEK1,2 und somit nur ERK1,2 der MAP Kinasen. MEK1 und ERK sind sehr viel höher konzentriert als Raf, so dass eine geringe Raf Aktivierung eine opulente ERK Aktivierung zur Folge hat. Die Phosphorylierungsstellen von ERK1,2 werden in Serie phosphoryliert. Zunächst nur an ihrer Tyrosingruppe, was allerdings noch keine Aktivierung zur Folge hat. Erst ab einer gewissen Schwelle und Konzentration von tyrosinphosphorylierten ERKs werden auch die Threoninreste phosphoryliert und ERK1,2 gehen in ihre aktive Konformation über.

Funktion von ERK1 und ERK2

Aktivierte ERK1,2 regulieren Wachstumsfaktor-induzierte Zielenzyme im Zytosol und beeinflussen die Transkriptionsfaktor-regulierte Genexpression im Zellkern.

Zytoplasmatische Zielproteine

Mehrere Aminosäuren von SOS werden von aktiviertem ERK1,2 phosphoryliert, wodurch eine negative Rückkopplung initiiert wird (Chen et al. 1996). SOS-Phosphorylierung destabilisiert den SOS-Grb2 Komplex und die Translokation von SOS in die Zellmembran wird gehemmt. Dies behindert die ERK Aktivierung durch Ras. ERK1,2 können auch den EGFR an Tyr-669 phosphorylieren (Northwood et al. 1991). Die physiologische Bedeutung dieses potentiell negativen Rückkopplungsmechanismus wird noch diskutiert.

„MAPK-interacting kinase 1“ (MNK1) und MNK2 sind zytosolische Serin/Threonin Proteinkinasen (Waskiewicz et al. 1997). Sowohl ERK als auch p38 können MNK an Thr-197 und Thr-202 phosphorylieren und somit aktivieren. MNK induziert eine Hochregulation von „eukaryotic initiation factor-4E“ (eIF-4E) welcher, nach Phosphorylierung an Ser-209 eine erhöhte Affinität für 7-Methylguanosin-5'-Triphosphat (m^7GTP) hat. Die Bindung von eIF-4E an m^7GTP dirigiert Ribosomen an das 5' Ende von mRNAs und erhöht somit die Translationseffizienz (Knauf et al. 2001).

ERK1,2 regulieren Transkription auch indirekt durch Phosphorylierung von 90kDa ribosomalen Protein-S6-Kinasen (RSKs). RSKs sind Serin/Threonin Kinasen welche durch mitogene Stimuli, wie Wachstumsfaktoren und tumorinduzierende Phorbolster, aktiviert werden (Chen et al. 1993). RSKs besitzen zwei verschiedene katalytische Domänen welche durch Bindung von aktiviertem ERK1,2 und eine sequenzielle Phosphorylierung von Aminosäureresten aktiviert werden (Dalby et al. 1998, Nebreda und Gavin 1999). RSKs spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription. Nach nukleärer Translokation phosphorylieren sie Faktoren wie das Protoonkogen c-fos, den „serum response factor“ (SRF) und CREB (Chen et al. 1993).

Zielproteine im Zellkern

Die nukleäre Translokation von aktiviertem ERK ist essentiell für die Genexpression und Wachstumsfaktor-induzierter DNA-Replikation (Brunet et al. 1999). Im Zellkern phosphorylieren ERKs verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk-1 (Marais et al. 1993) (Gille et al. 1995), Sap-1, Sap-2 (Price et al. 1995) und c-myc (Gupta et al. 1993)) und „mitogen- and stress-activated protein kinases“ (MSKs) (Deak et al. 1998). MSKs phosphorylieren und aktivieren die

AP-1 Komponente ATF-1 an Ser-63 (Gupta und Prywes 2002) und CREB an Ser-133 (Wiggin et al. 2002). Des Weiteren phosphorylieren sie Histon H3 an Ser-10 und Ser-28, und das „high-mobility-group protein-14“ (HMG-14) an Ser-6 welches zu einer „immediate-early“ Geninduktion auf mitogene Stimuli führt (Soloaga et al. 2003).

Schließlich wurde auch gezeigt, dass Wachstumsfaktoren die Ribosombiogenese stimulieren. Nach Seruminduktion phosphoryliert ERK die BRF1 Untergruppe des RNA-Polymerase III spezifischen Transkriptionsfaktors TFIIIB (Felton-Edkins et al. 2003). Dies verbessert die Translationseffizienz durch tRNA und 5S-rRNA Synthese. Zudem aktiviert ERK den „upstream binding factor“ durch Phosphorylierung von Thr-117 und Thr-201. Hierdurch wird die Expression der RNA-Polymerase I hochreguliert und die Synthese von ribosomaler RNA stimuliert (Stefanovsky et al. 2001).

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

STAT3 ist ein zytoplasmatischer Transkriptionsfaktor und gehört zu der STAT-Proteinfamilie. STAT Proteine übermitteln Signale von extrazellulären Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen und beeinflussen somit Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung. STAT Proteine assoziieren mit aktivierten Tyrosinkinase und werden von diesen oder durch rezeptorassoziierte JAK Kinasen phosphoryliert. Aktivierte STATs bilden Dimere, werden in den Nucleus transloziert, binden an spezifische Promotersequenzen ihrer Zielgene und regulieren so die Transkription. Eine Dysregulation der Stat-Funktion wird häufig in neoplastischen Zellen beobachtet.

STAT3 Struktur

Das STAT3-Gen befindet sich auf Chromosom 17q21 und besteht aus 24 Exonen. Es liegt Kopf an Kopf mit STAT5A, welches wiederum direkt an STAT5B grenzt.

Alle STAT Proteine bestehen aus funktionell modularen Domänen: einer N-terminalen Domäne, einer „coiled-coil“ Domäne, einer DNA-bindenden Domäne, der SH2 Domäne und einer Carboxyl-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD). Die N-terminale Domäne ist an der Formation von Di- und Tetrameren und der nukleären Translokation beteiligt. Die „coiled-coil“ Domäne dient Protein-Protein-Interaktionen, die DNA-bindende Domäne der Erkennung von spezifischen DNA-Motiven und die SH2 Domäne der Dimerisierung. Die SH2 Domäne und die

TAD besitzen Phosphorylierungsstellen und sind an der transkriptionellen Aktivierung und Protein-Protein-Interaktionen beteiligt.

Funktion von STAT3

Aktiviertes STAT3 bindet an DNA Promoterregionen und reguliert die Transkription von Genen mit Bedeutung für die Onkogenese.

Bcl-x_L

STAT3 aktiviert den bcl-x Promoter (Bromberg et al. 1999). Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter Expression des anti-apoptotischen Proteins *Bcl-x_L* und Krebs (Reed 1999). In IL-6 abhängigen menschlichen Myelomzelllinien inhibiert eine Blockade der STAT3 Signaltransduktion die bcl-x Expression und induziert Apoptose (Catlett-Falcone et al. 1999a, Catlett-Falcone et al. 1999b). Studien mit Tyrosinkinaseinhibitoren in NIH3T3-Zellen konnte zeigen, dass die v-Src Induktion von bcl-x/STAT3 abhängig ist. Auch Mcl-1, ein weiteres Mitglied der bcl-2 Familie, ist abhängig von STAT3 (Karni et al. 1999).

Cyclin D1

Cyclin D1 in Assoziation mit cdk4 oder cdk6 kontrolliert die Zellzyklusprogression von G1 nach S. Die Cyclin D1 Expression ist in STAT3 exprimierenden Zellen erhöht (Bromberg et al. 1999, Sherr und Roberts 1999, Sinibaldi et al. 2000). Auch STAT5 scheint an der Regulation von Cyclin D1 beteiligt zu sein (de Groot et al. 2000, Matsumura et al. 1999, Wen et al. 1999).

p21^{WAF1/CIP1}

STAT1 Aktivierung durch Interferon- γ führt zur Induktion von p21^{WAF1/CIP1} und Wachstumsstop (Bromberg et al. 1996, Chin et al. 1996). Der p21^{WAF1/CIP1} Promoter hat drei STAT Bindungsstellen: zwei für STAT1 und eine für STAT1 und STAT3 (Chin et al. 1996). Zellen mit konstant aktivierten STAT3 haben erhöhte p21^{WAF1/CIP1} mRNA und Proteinspiegel (Sinibaldi et al. 2000). Obwohl p21^{WAF1/CIP1} meistens die Zellzyklusprogression blockiert, ist es in menschlichen Tumorentitäten oft überexprimiert und induziert den Aufbau von aktiven CyclinD1/CDK Komplexen (LaBaer et al. 1997).

c-Myc

c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor und wichtiger Regulator der Proliferation. Zelllinien mit STAT3 Überexpression haben erhöhte c-myc mRNA Spiegel. Dies impliziert, dass STAT3 an der Regulation von c-myc beteiligt ist (Bromberg et al. 1999). Regulation der c-myc Transkription via

STAT3 ist durch IL-6 induzierbar (Kiuchi et al. 1999). Eine Mutation in der STAT3 Bindungsstelle des c-myc Promoters kann die IL-6 induzierte Transkription komplett verhindern (Shirogane et al. 1999).

Material und Methoden

Tumorproben

Alle Tumorproben stammen aus dem Archiv des pathologischen Instituts der Universität Bonn und wurden anhand folgender Kriterien selektiert:

- Die Läsion entspricht einem primären nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom.
- Ausreichendes Gewebe wurde archiviert.
- Zum Zeitpunkt der Resektion bestand keine weitere aktive neoplastische Erkrankung.
- Operationsdatum nicht vor 1995.
- Keine präoperative Chemo- oder Strahlentherapie.

Routinediagnostik

Im Rahmen der Routinediagnostik bei Lungentumoren wurden die Bronchialkarzinome formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Histologische Schnitte wurden nach Standardprotokollen gefärbt (z.B. Hämatoxylin-Eosin oder Periodsäure-Leukofuchsin). Alle Läsionen wurden eindeutig als primäre Bronchialkarzinome identifiziert und nach den Leitlinien der WHO klassifiziert.

Lagerung der Proben

In Paraffin eingebettetes Tumorgewebe wurde im kühlen, trockenen und dunklen Archiv gelagert und chronologisch nach Eingangsdatum sortiert.

Patienteninformation

Personalien und allgemeine Tumordaten wurden mit Hilfe von der PathoPro Datenbank des pathologischen Instituts der Universität Bonn erhoben. Spezifische und detaillierte klinische Information, wie Raucherstatus und berufliche Noxenexposition, wurden aus Patientenakten des Zentralarchivs der Universität Bonn ermittelt.

Tissue Microarrays

Der Tissue Microarray (TMA) ist eine Untersuchungsmethode, mit der eine große Anzahl von Gewebeproben kostengünstig und effizient histologisch untersucht werden können. In TMA

werden Gewebstanzen verschiedener Proben in einem Paraffinblock vereinigt. Dadurch ist es möglich, multiple Proben simultan zu untersuchen. TMA vereinfachen außerdem den direkten Vergleich zwischen verschiedenen Stenzen, da alle genau derselben Behandlung ausgesetzt werden.

Herstellung von Tissue Microarrays

Zunächst muss ein leerer Paraffinblock als Matrize für die Gewebstanzen gegossen werden (TMA-Block). Hierfür wird 67°C warmes Paraffin in eine 1,5 cm x 4 cm x 2 cm große Gussform gefüllt und anschließend für mindestens 12 Stunden bei 37°C zum Abkühlen gelagert. Eine glatte und gerade Oberfläche wird durch Anschneiden im Mikrotom geschaffen. Paraffin schneidet sich umso leichter je härter es ist. Deshalb wird vor dem Anschneiden der Block noch kurz auf 4°C abgekühlt. Wenn der Block keine Risse oder Luftblasen enthält, kann er als Matrize verwendet werden.

Nun müssen die Tumoreale ausgesucht werden aus denen Gewebstanzen entnommen werden sollen. Die Herstellung von TMA ist in Abbildung 3 dargestellt. An histologischen Schnitten werden zunächst repräsentative Tumoreale markiert und anschließend am originalen Paraffinblock identifiziert. Bevor die erste Stanze gepresst wird, muss der TMA-Block vorbereitet werden. Die Gewebstanzen sollen in vorgefertigte Löcher des TMA-Blocks eingeschoben werden. Hierfür wird ein Loch mit einem Durchmesser von 1,5 mm und einer Tiefe von 10 mm gebohrt. Mit einer Hohnadel kann jetzt aus dem Gewebeblock ein Zylinder ausgestanzt und in den TMA-Block an richtiger Stelle eingeführt werden.

Pro Patient werden mindestens drei Tumorgewebszylinder entnommen. Zur Übersicht unter dem Mikroskop werden die Stenzen in 9er Gruppen (3 x 3) angeordnet. Innerhalb einer Gruppe trennen 0,5 mm Paraffin die einzelnen Stenzen, zwischen den Gruppen sind es 1,5 mm (Abbildung 4).

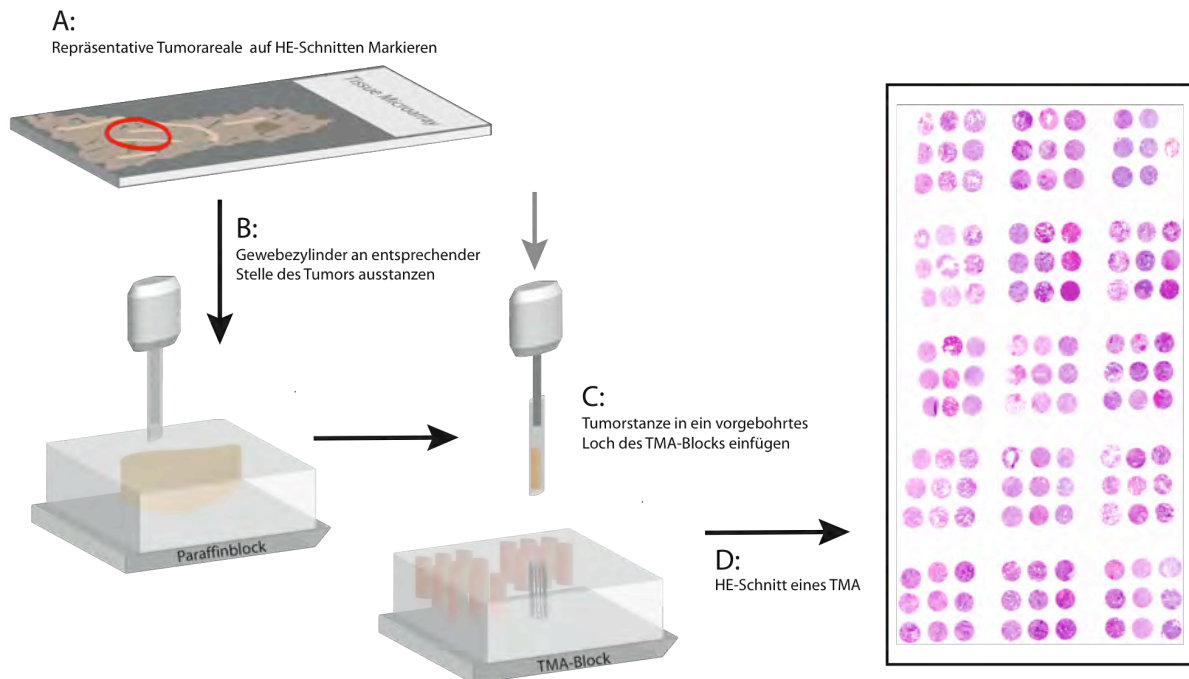


Abbildung 3: TMA-Produktion

Tissue Microarrays ermöglichen eine schnelle und kostengünstige Analyse von Gewebeproben. Zunächst werden die gewünschten Tumoreale auf HE-Schnitte markiert (A), um gezielt Gewebezyylinder aus den Paraffinblöcken zu stanzen (B). Diese Tumorstanzen werden dann in vorgebohrte Löcher des TMA-Blocks eingefügt (C). Histologische Schnitte können nun vom TMA-Block angefertigt werden (D).

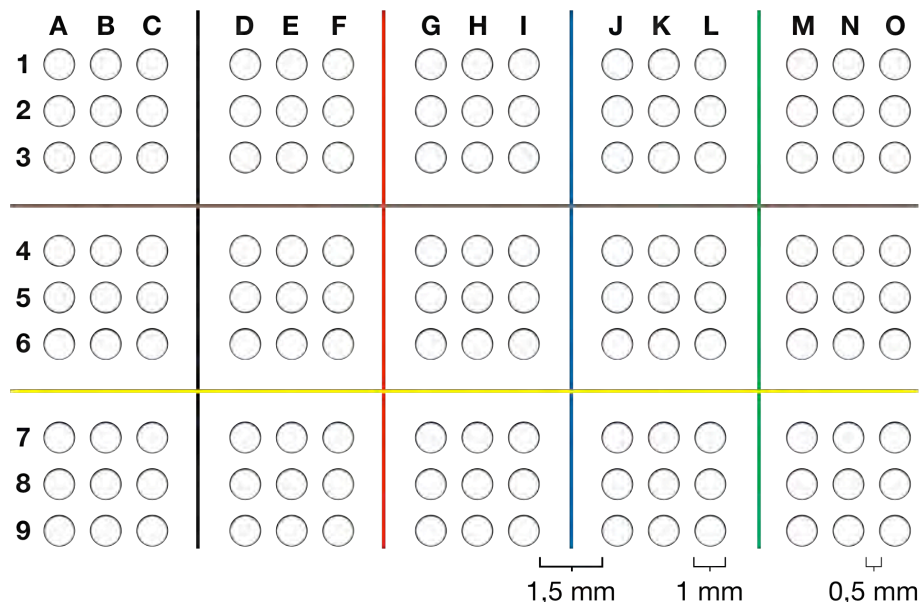


Abbildung 4: Layout der Tissue Microarrays

Einzelne Stanzen in Tissue Microarrays werden in 3 x 3 Gruppen angelegt um den Überblick im Mikroskop zu erleichtern. Die Position jeder Stanze wird mit einem Buchstaben- (Spalte) und Zahlencode (Reihe) identifiziert.

Problematik der Tissue Microarrays

In TMA werden nur kleine, selektierte Areale des Gesamttumors beurteilt. Wenn die Stenzen jedoch nicht repräsentativ für den Tumor sind, kann es zu falschen Aussagen kommen. Daher müssen nach der Stanzung histologische Kontrollschnitte angefertigt werden.

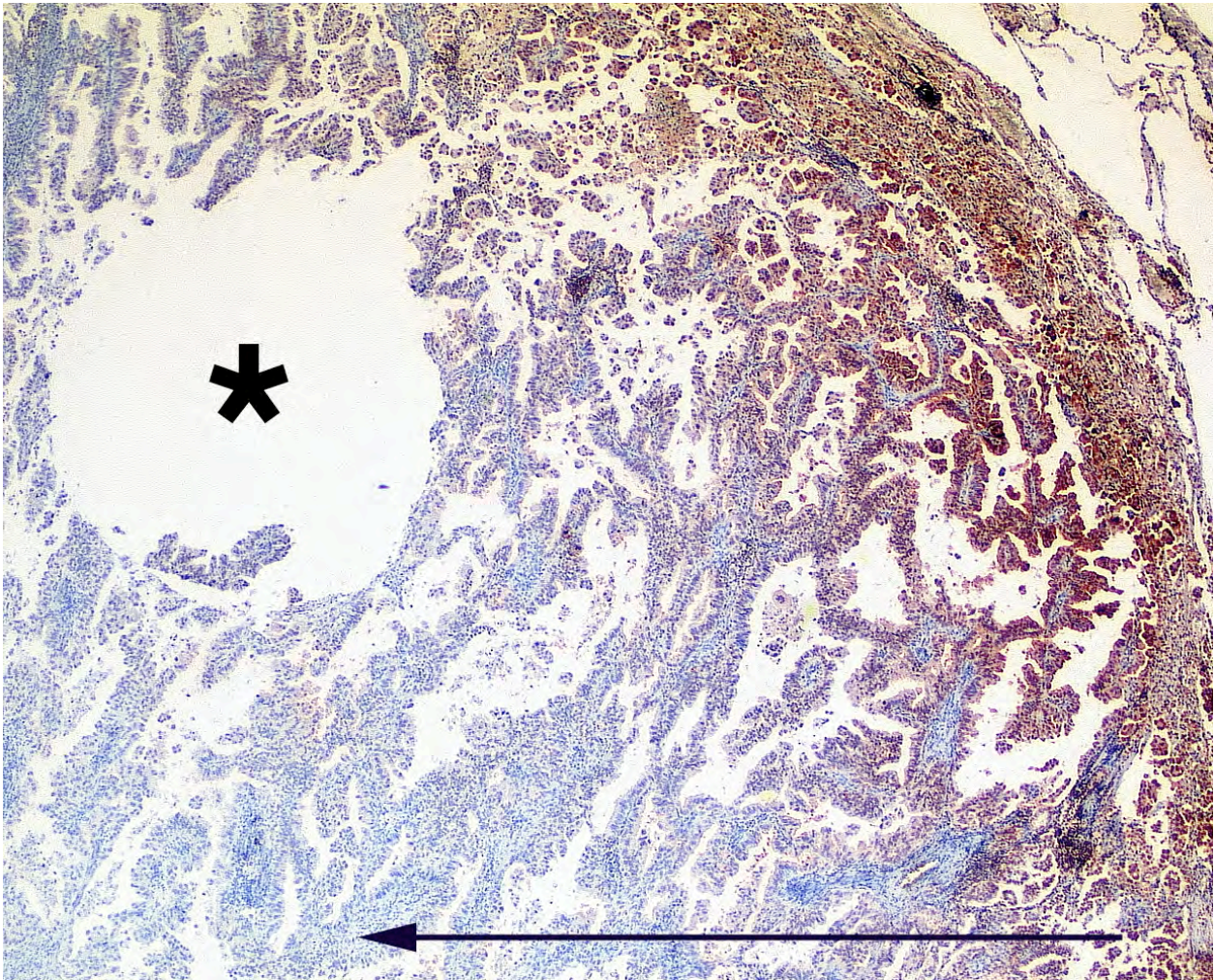


Abbildung 5: Problematik der Tissue Microarrays

Das Hauptproblem von TMA besteht darin, dass einzelne Stenzen nicht alle Aspekte des Tumors wiedergeben können. Aufgrund der schwierigen Formalinfixation von Lungengewebe wurden zentrale Tumorabschnitte nur unzureichend konserviert. Dargestellt ist hier eine EGFR-immunohistochemische Färbung von einem Adenokarzinom. Die korrespondierende TMA-Stanze () wurde als negativ bewertet. Allerdings ist eindeutig zu erkennen, dass die Färbeintensität vom der Peripherie zum Tumorzentrum abnimmt (Pfeil). Dieser Tumor wurde somit falsch negativ bewertet. Die Länge des Pfeils entspricht 2 mm.*

TMA-Schnitte wurden mit allen getesteten Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Anschließend wurden konventionelle Schnitte von positiv und negativ färbenden Tumoren hergestellt. Leider zeigte sich, dass die gewählten Areale nicht für den gesamten Tumor

repräsentativ sind (Abbildung 5). Aufgrund der schwierigen Formalinfixation von Lungengewebe wurden zentrale Tumorabschnitte nur unzureichend konserviert. Die Tumorstanzen wurden allerdings hauptsächlich vom Zentrum des Tumors entnommen um zu gewährleisten, dass in der Tiefe des Gewebszylinders noch Tumorgewebe ist. Somit sind TMA nicht für immunhistochemische Analysen von routinemäßigen formalinfixierten Bronchialkarzinomen geeignet.

BioBank Pro

BioBank Pro, früher Tumorbank genant, ist eine *FileMaker®*-basierte Datenbank (Filemaker Inc. Santa Clara, CA, USA) und dient der Organisation und Archivierung von Patientenmaterial/Information. BioBank Pro ermöglicht die problemlose Verwaltung von großen Probenkollektiven durch eine effiziente und variable Datenstruktur. Die intuitive und übersichtliche Benutzeroberfläche erlaubt auch dem ungeschulten Nutzer, schnelle und mühelose Bedienung (Abbildung 6). Ich habe diese Datenbank mit Hilfe von Lukas C. Heukamp für die Administration der Daten meiner Promotionsarbeit entwickelt.

The screenshot displays the BioBank Pro user interface. At the top right, there are tabs for 'Patient', 'Fall', and 'Probe', with 'Fall' currently selected. Below this, there are tabs for 'Formular', 'Liste', and 'Studie', with 'Formular' selected. The main form area is divided into several sections:

- PERSONALIEN**: Includes fields for 'Fallnummer:', 'Falljahr:', 'Vorname:', 'Nachname:', and 'Geburtsdatum:'. There is also a small icon of a person.
- EXTRA**: Includes a 'Kommentar:' field.
- PROBEN**: A table with columns for 'Tumorbank #', 'Kommentar', 'Box', 'Position', 'Studie', and '#'. The table is currently empty.
- OP Datum:** A field with a dropdown menu showing 'Heute'.
- Alter bei OP:** A field.
- Makroskopische Diagnose:** A field.
- Organ:** and **Dignität:** fields.
- Eingangsdatum:** A field at the bottom left.
- Zuschneider:** A field at the bottom right.

At the bottom of the interface, there is a toolbar with several icons: a left arrow, a right arrow, a magnifying glass, a document with a checkmark, a document with a plus sign, a document with a minus sign, a minus sign, and a question mark.

Abbildung 6: Benutzeroberfläche von BioBank Pro

Beispiel der Benutzeroberfläche von BioBank Pro. Über intuitive Schaltflächen kann schnell wichtige Information eingegeben oder gesucht werden.

FileMaker Pro

FileMaker Pro ist ein kommerziell erhältliches Programm für die Entwicklung von Datenbanken. Komplette Datenbankstrukturen mit Instanzen, Attributen und Verbindungen können definiert werden. Datenbearbeitungsfunktionen und Befehlsautomatisierung werden in einer einfachen Programmiersprache geschrieben. Zugriffsrechte und Datensicherheit werden automatisch vom Programm kontrolliert. Ein „what you see is what you get“ Editor ermöglicht eine einfache Gestaltung der Benutzeroberfläche. FileMaker Server erlaubt bis zu 250 Nutzern gleichzeitig den Zugriff. Die schnelle Suchfunktionen und Speicherverwaltung für fast unbegrenzte Datenmengen waren ausschlaggebend für die Entscheidung, FileMaker Pro für die Entwicklung von BioBank Pro zu verwenden.

Datenstruktur

BioBank Pro hat fünf Instanzen: Patient, Fall, Probe, Box und Studie. Die Patient-Instanz entspricht der eindeutigen Identifikation einzelner Personen. Die Fall-Instanz repräsentiert eine Patientenprobe. Jeder Fall gehört nur einem Patient, ein Patient kann aber mit vielen Fällen verbunden sein. Patientenproben enthalten häufig heterogene Substanzen und werden in ihre Bestandteile geteilt, z.B. ein Operationsresektat kann aus neoplastischem und normalem Gewebe bestehen. Diese Bestandteile werden getrennt als Proben-Instanz erfasst und Box-Instanzen zugeteilt. Box-Instanzen repräsentieren den Lagerort einzelner Proben-Instanzen. Ein Fall kann viele Proben haben, Proben können aber nur einem Fall und einer Box zugeteilt werden. Studienspezifische Daten werden mit der Fall-Instanz verknüpft da sie oft Information enthalten die im zeitlichen Zusammenhang zum Fall stehen, z.B. Serumtiter von Tumormarkern.

Die Patient-Instanz enthält Attribute wie Name, Geburtsdatum, Geschlecht und Adresse. Diese Daten sind wichtig um den Ursprung einer Probe eindeutig nachvollziehen zu können. Sie werden auch häufig in Studien verwendet um geschlechts- oder altersspezifische Datenverteilungen darzustellen. Die Fall-Instanz umfasst Informationen welche all seine Proben-Instanzen gemeinsam haben wie Entnahmedatum/zeit/ort. Jede Probe enthält mindestens die Attribute Probennummer und Inhaltsbeschreibung. Wird eine Probe im Archiv einsortiert, wird sie einer Box zugeordnet. Diese birgt Information über den Lagerort, z.B. 3. Etage, -80°C Kühlschrank, Schublade 1, Box Nummer 25, Position E9.

Entwicklung von BioBank Pro

BioBank Pro hat mit einem kleinen überschaubaren Ziel begonnen: Organisation der Tumorproben meines Patientenkollektivs. Mittlerweile ist BioBank Pro in der vierten Version, hat

eine Namensänderung unterlaufen (Tumorbank wurde zu BioBank Pro) und wird von mehreren Arbeitsgruppen diverser Institute der Universität Bonn genutzt. Das pathologische Institut der Universität Bonn nutzt BioBank Pro inzwischen seit vier Jahren für die Verwaltung ihrer Probenbank. Insgesamt werden über 35 000 Proben und 13 000 Fälle erfasst.

DNA Extraktion und Reinigung

Vier bis acht 10 µm dicke Schnitte des Tumors wurden mit einem Mikrotom angefertigt und auf Objektträger aufgenommen. Zur Entparaffinisierung wurden diese über Nacht bei 60°C senkrecht gelagert (damit das Paraffin abtropfen kann) und anschließend zweimal für 15 min in Xylol gebadet. Die Rehydrierung erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Objektträger wurden für jeweils 15 min in 5 Bädern mit verschiedenen Alkoholkonzentrationen gebadet (100%, 100%, 96%, 70% und 50%) und hinterher für weitere 15 min in destilliertes Wasser getaucht.

Anschließend wurde der Tumor makroskopisch auf dem Objektträger identifiziert und mit einem sterilen Skalpell in ein Eppendorfgefäß befördert. Dem wurden 180 µl von 37°C warmen ATL-Puffer (QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland) beigefügt und mit weiteren 20 µl Proteinase-K (20 µg/µl, QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland) versetzt. Die Proben wurden mit einer Vortex-Rüttelmaschine vermischt und über Nacht bei 56°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 200 µl AL-Puffer (QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland) hinzugefügt, vorsichtig vermischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurden 200 µl Ethanol zugegeben und das gesamte Volumen in ein *QIAamp Spin Column*® (QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland) pipettiert. Das Röhrchen wurde 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. 500 µl des AW1-Puffers (QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland) wurden in das *QIAamp Spin Column*® pipettiert, 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert und das Filtrat erneut verworfen. Nach Zugabe von 500 µl des AW2-Puffers (QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland) wurde erst für 1 min bei 8000 U/min und dann 5 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Das *QIAamp Spin Column*® wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß gesetzt, mit 200 µl eines 70°C warmen Tris-Puffer versetzt, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. 10 µl der gewonnenen DNA wurden nun mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft und der Rest bei -20°C eingefroren.

Spektrophotometrische Bestimmung der DNA und RNA

Mit einem Ultraviolett-Spektrometer wurde die Konzentration von DNA, RNA und Oligonukleotiden spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260nm bestimmt. Eine OD260 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA, oder 20 µg/ml Oligonukleotid. Gemessen wurde in Quarzküvetten.

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Für die PCR wurden 1-10 µl der DNA (abhängig von der Konzentration), 2,0 mM MgCl₂, 5,0 µl 10x-PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), 1,0 µl dNTP (10 mM), jeweils 1,0 µl sense und antisense Primer (10 µM), und 0,2 µl Platinum Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe Deutschland) in ein PCR-Gefäß pipettiert. Die Mischung wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Primer

Alle Primer wurden von Prologo Sigma-Aldrich Co. (Hamburg, Deutschland) erworben. Detaillierte Information zu den einzelnen Primern sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Primerdetails

Name	Sequenz	Primerlänge (bp)	Molekulargewicht (g/mole)	T _m (°C)	Amplifikatlänge (bp)
EGFR-18F	5' - TCCAgCATggTgAgggCTgAg - 3'	21	6528	60	
EGFR-18R	5' - ggCTCCCCACCAgACCATg - 3'	19	5720	64	
					223
EGFR-19F	5' - TgggCAgCATgTggCACCATC - 3'	21	6448	63	
EGFR-19R	5' - AggTgggCCTgAggTTCAG - 3'	19	5926	62	
					217
EGFR-21F	5' - CggATgCAgAgCTTCTTCCC - 3'	20	6070	64	
EGFR-21R	5' - AggCAgCCTggTCCCTggTg - 3'	20	6151	68	
					275

Detaillierte Information der verwendeten Primer. T_m = Schmelztemperatur des Primers.

PCR-Verlauf

Die PCR-Zyklen wurden wie folgt in den „Thermal Cycler“ eingegeben:

- 1) 4 min Vorheizen auf 94°C
- 2) 1 min bei 94°C; Denaturierung
- 3) 1 min bei 60°C; Annealing
- 4) 1 min bei 72°C; Extension

- 5) Schritte 2 bis 4 dreißig Mal wiederholen
- 6) 5 min bei 72°C; endgültige Extension
- 7) bis zum Abbruch bei 4°C

Alle PCR-Produkte wurden anschließend mittel Agarose-Gel-Elektrophorese kontrolliert.

PEG-Fällung

Die Fällung mit einer Polyethylenglykol/Salzmischung dient der Reinigung der PCR Produkte von restlichem Zelldetritus.

20 µl der PCR-Produkte wurden mit 20 µl PEG-Mix (30% PEG 6.000, 1,5 M NaCl-Lösung) versetzt, mit einer Vortex-Rüttelmaschine vermischt und 10 min bei Raumtemperatur gelagert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13 000 U/min bildet sich ein Pellet aus DNA und Salz am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dem Pellet wurden 100 µl 100% Ethanol zugeführt und erneut bei 13 000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Röhrchen mit dem DNA-Pellet wurde unter einer Luftabzugshaube offen für 20 min zum Trockenen gelagert. Letztlich wurde das Pellet in 40 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

Sequenzierungs PCR

Für die kapillarelektrophoretische Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide an DNA-Templates mittels PCR inkorporiert.

Ein Ansatz der Sequenzierreaktion enthält:

- 4 µl Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland)
- 2 µl Terminator Ready Reaction Puffer (Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland)
- 1 µl DNA Template (abhängig von der Konzentration, 60 ng)
- je 1 µl sense oder antisense Primer (10 pmol/µl)

Jeder Ansatz wird auf ein Endvolumen von 20 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Sequenzierungs-PCR-Verlauf

Die PCR-Zyklen wurden wie folgt in den Thermal Cycler eingegeben:

- 1) 4 min Vorheizen auf 96°C
- 2) 10 s bei 96°C; Denaturierung
- 3) 5 s bei 50°C; Annealing
- 4) 4 min bei 60°C; Extension
- 5) Schritte 2 bis 4 fünfundzwanzig Mal wiederholen
- 6) bis zum Abbruch bei 4°C

Fällungsreaktion zur Reinigung der sequenzierten Produkte

In ein 1,5 ml Eppendorfgefäß werden 80 µl destilliertes Wasser, 10 µl 3M Natriumacetat (pH 4,6), 250 µl 100% Ethanol und die Sequenzierungsprodukte pipettiert. Es folgt eine Zentrifugation von 15 000 U/min bei Raumtemperatur für 15 min. Der Überstand wird verworfen. Als Nächstes werden 250 µl 70% Ethanol hinzugefügt und gut vermischt. Es folgt eine weitere Zentrifugation von 15 000 U/min bei Raumtemperatur, aber diesmal nur für 5 min. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet in einem Speed-Vac (Thermo Scientific Savant, Waltham, MA USA) 5 min getrocknet.

Sequenzierung

Für die Sequenzierung werden zunächst 25 µl TSR („Template Suppression Reagent, Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland) zu den Proben hinzugefügt und gut vermischt. Nun werden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Mit einer Vortex-Rüttelmaschine werden sie erneut vermischt und danach für 30 s bei 13 000 U/min zentrifugiert. Die gesamte Flüssigkeit wird nun in Sequenzier-Röhrchen überführt und in den ABI-PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland) geladen.

Immunhistochemie

Antikörper:

Folgende Antikörper wurden kommerziell von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) erworben. Sie werden durch die Immunisierung von Mäusen oder Kaninchen mit synthetischen Phosphopeptiden produziert. Diese synthetischen Phosphopeptide korrespondieren in Struktur mit den spezifischen Phosphorylierungsstellen.

EGF Rezeptor Antikörper (Artikelnummer 4405)

Dieser monoklonale Antikörper (isoliert aus Kaninchen) bindet den humanen EGFR am Carboxyl-terminalen Ende. Verdünnungsfaktor 1:400.

Phospho-EGFR Tyrosin-992 (Artikelnummer 2235)

Dieser polyklonale Antikörper stammt von Kaninchen und bindet nur den EGFR wenn dieser an Tyrosin 922 phosphoryliert ist. Verdünnungsfaktor 1:500.

Phospho-EGFR Tyrosin-1068 (Artikelnummer 2236)

Ein monoklonaler Mäuseantikörper welcher ausschließlich am EGFR bindet wenn dieser an Tyrosin 1068 phosphoryliert ist. Verdünnungsfaktor 1:500.

Phospho-EGFR Tyrosin-1173 53A5 (Artikelnummer 4407)

Dieser Mäuseantikörper detektiert nur den humanen EGFR wenn er an Tyrosin 1173 phosphoryliert ist. Verdünnungsfaktor 1:250.

Phospho-Akt Serin-473 736E11 (Artikelnummer 3787)

Dieser monoklonale Antikörper wird aus Kaninchen isoliert und bindet an Akt1, Akt2 und Akt3 wenn sie an Serin 473 phosphoryliert sind. Verdünnungsfaktor 1:400.

Phospho-Stat3 Tyrosin-705 D3A7 (Artikelnummer 9145)

Dieser monoklonale Kaninchenantikörper bindet nur an Tyrosin 705 phosphoryliertes Stat3. Verdünnungsfaktor 1:400.

Phospho-p44/p42 MAPK Threonin-202/Tyrosin-204 (Artikelnummer 4376)

Dieser monoklonale Kaninchenantikörper detektiert humane p42 und p44 MAP-Kinasen (Erk1 und Erk2) wenn sie an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphoryliert sind. Es gibt keine Kreuzreaktion mit phosphorylierten JNK/SAPK oder p38 MAPK. Verdünnungsfaktor 1:250.

Dako REAL™ Link, biotinylierte Sekundärantikörper

Diese biotinylierten Antikörper stammen von Ziegen und binden an die Fc-Fragmente von Mäuse- oder Kaninchen-Antikörper. Verdünnungsfaktor 1:400.

Die immunhistochemische Darstellung des EGFR gehört zum Routineprogramm des Pathologischen Institutes der Universität Bonn. Ich habe das vom immunhistochemischen Labor bereits standardisierte Protokoll für meine Analysen des EGFR angewendet. Auch für die immunhistochemische Färbung von Phospho-Proteinen wurde dieses Protokoll genutzt. Lediglich die Verdünnungen des Primärantikörpers mußten individuell angepaßt werden. Als Ausgangspunkt dienten die empfohlenen Richtwerte des Herstellers. Alle Antikörperverdünnungen wurden primär auf TMA-Schnitten getestet. Ausschließlich beim Phospho-EGFR Tyrosin-1068 Antikörper wurde der vom Hersteller empfohlene Richtwert in der endgültigen Analyse verwendet (1:500). Bei allen anderen Antikörpern war das Hintergrundrauschen im Verhältnis zum spezifischen Signal zu hoch, so dass diese weiter verdünnt wurden. Der Phospho-EGFR Tyrosin-992 und der Phospho-EGFR Tyrosin-1173 53A5 Antikörper wurden um eine 10er Potenz verdünnt (von 1:50 auf 1:500 und 1:25 auf 1:250 entsprechend). Das spezifische Signal bei dem Phospho-Akt Serin-473 736E11 und dem Phospho-Stat3 Tyrosin-705 Antikörper war mit einer Verdünnung von 1:500 zu gering ausgeprägt (empfohlene Verdünnung 1:50), so dass 1:400 verwendet wurde. Eine Verdünnung von 1:600 wurde für den Phospho-p44/p42 MAPK Threonin-202/Tyrosin-204 Antikörper empfohlen, diese zeigte jedoch ein ausgeprägtes Hintergrundrauschen. Bei einer 1:600 und 1:300 Verdünnung war das Signal wiederum zu schwach, so dass als endgültige Verdünnung 1:250 eingesetzt wurde.

Die Spezifität der verwendeten Antikörper wird vom Hersteller garantiert, da sie jede Charge kontrollieren und deren Reinheit verifizieren. Alle Antikörperverdünnungen wurden auf TMA-Schnitten getestet. Dies garantierte, dass immer das gesamte Spektrum an Färbeintensitäten von stark positiven bis negativen Proben auf einem Schnitt vorhanden waren. So war es möglich, die Verdünnung sehr präzise anhand weniger Schnitte auszutarieren. Auch eine bekannte Kreuzreaktion wurde berücksichtigt, zunächst wurde für die Darstellung von P-Stat3 ein polyklonaler P-Stat3 Tyr-705 Antikörper verwendet. Eine neuere Untersuchung hat dann jedoch ergeben, dass dieser Antikörper in sehr hohen Konzentrationen unspezifisch mit einem zytosolischen Epitop des EGFR kreuzreagiert. Daher wurden alle Schnitte erneut mit dem Phospho-Stat3 Tyrosin-705 D3A7 Antikörper (monoklonaler Antikörper ohne bekannte Kreuzreaktionen) gefärbt und neu ausgewertet. Zwischen den beiden Stat3-Färbungen war eine Korrespondenz von über 95%.

Färbung:

Zunächst müssen die Schnitte deparaffinisiert werden. Hierfür werden sie zweimal 5 min in Xylol, zweimal 10 min in 100% Ethanol, zweimal 10 min in 95% Ethanol und zweimal 5 min in de-ionisiertem Wasser gebadet. Anschließend werden sie zur Demaskierung kurz in 10 mM Tris-Puffer (pH 10,0) zum Kochen gebracht und dann für 10 min knapp unterhalb des Siedepunkt gewaschen. Innerhalb von 30 min kühlen sie auf Raumtemperatur ab. Danach folgen drei Waschschriffe (jeweils 5 min in de-ionisiertem Wasser), eine Inkubation in 3% Hydrogenperoxid für 10 min und weitere zwei Waschschriffe (jeweils 5 min in de-ionisiertem Wasser).

Die Schnitte werden nun einmal in PBS (pH 7,4) für 5 min gewaschen und danach eine Stunde bei Raumtemperatur mit 200 µl der „Blocking Solution“ inkubiert (Serum von der Spezies aus der der Antikörper gewonnen wurde). Der primäre Antikörper wird nun in der „Blocking Solution“ verdünnt (s. o.), jeder Schnitt mit 150 µl des primären Antikörper bedeckt und bei 4°C für 24 Stunden inkubiert.

Es folgt ein weiterer Waschschriff mit PBS (5 min). Der Sekundärantikörper wird in der „Blocking Solution“ 1:400 verdünnt und die Schnitte mit 150 µl für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die endogene Peroxidase wird anschließend durch die Inkubation mit 3% H₂O₂ für 10 min geblockt. Die Schnitte werden danach für 60 min mit 150 µl eines Streptavidin/HRP-Komplex (Streptavidin/ Horse-Radish-Peroxidase, Dako, Chem-Mate Detektionskit, Fa. Dako, Dänemark) inkubiert. Es folgt eine Inkubation mit Chromogen für 10 min und abschließend werden die Gewebeschnitte mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt.

Auswertung

Alle Schnitte wurden auf ihre Färbeintensität, Menge und Spezifität beurteilt. Die Proben wurden von zwei Wissenschaftlern verblindet und unabhängig bewertet. Widersprüchliche Ergebnisse wurden in einer Gruppe von drei Untersuchern besprochen und neu eingestuft. Wir implementierten ein 4-stufiges Punkteschema (Abbildung 7).

Punkteschema für EGFR, P-Tyr-992, P-Tyr-1068 und P-Tyr-1173 Immunhistochemie

- keine oder unspezifische Hintergrundfärbung; 0
- schwache diskontinuierliche Färbung der Zellmembran; +1
- moderate aber eindeutige Färbung der Zellmembran; +2
- starke vollständige Färbung der Zellmembran; +3

Punkteschema für P-Akt, P-MAPK und P-Stat3 Immunhistochemie

- keine oder unspezifische Hintergrundfärbung; 0
- schwache diskontinuierliche Färbung des Zytoplasma oder Nukleus; +1
- moderate aber eindeutig Färbung des Zytoplasmas und Nukleus; +2
- starke vollständige Färbung von Zytoplasma und Nukleus; +3

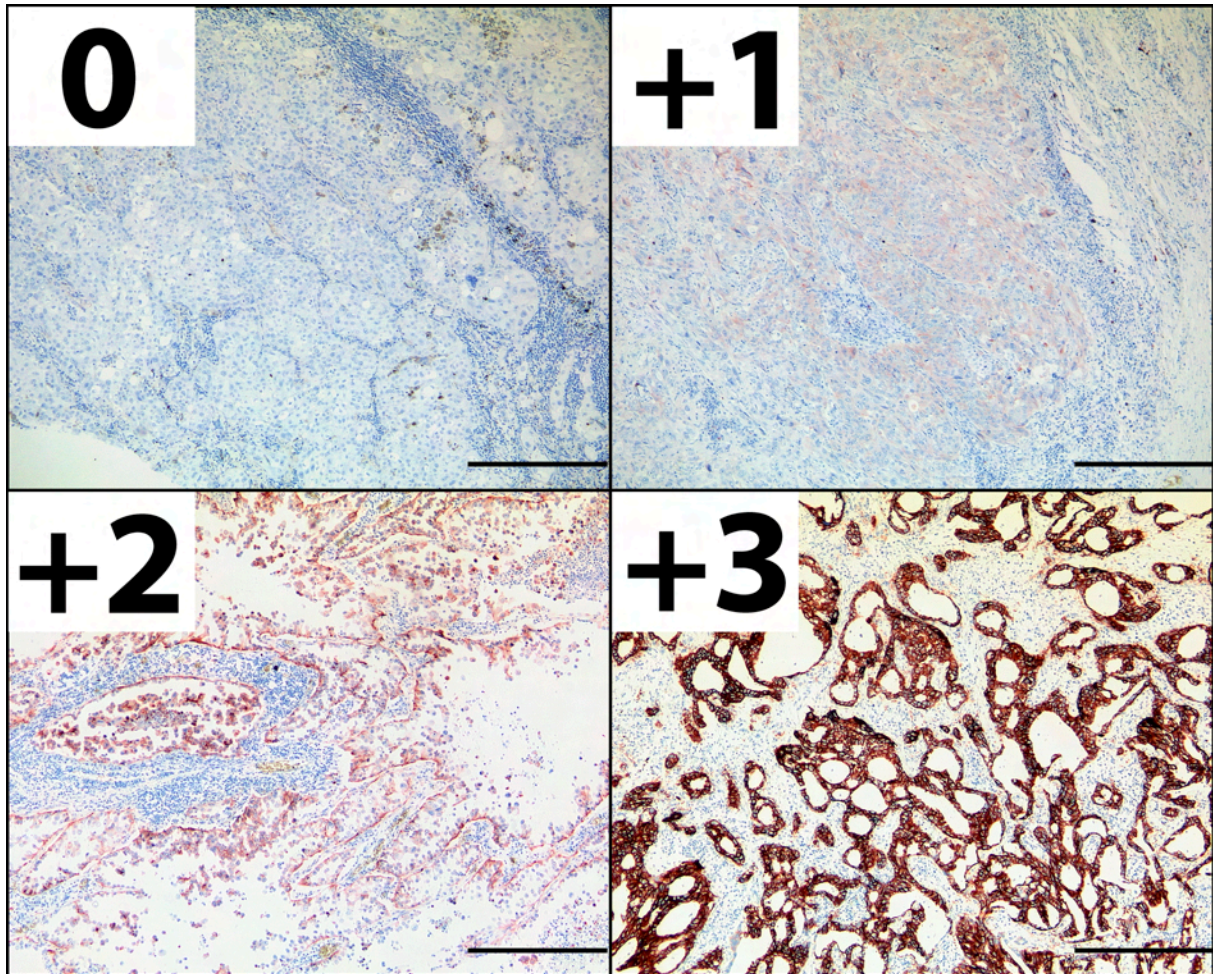


Abbildung 7: Bewertungsschema der EGFR-Färbeintensität

Beispiel des Bewertungsschema der EGFR-Immunhistochemie, hier ist die Färbung des EGFR ohne spezifische Phosphorylierung dargestellt. Der schwarze Balken entspricht 400 µm.

Tumorproben mit einer Färbestufe von +2 oder +3 wurden als positiv für die jeweilige Färbung bewertet und Färbestufen 0 und +1 als unspezifisch, bzw. negativ bewertet.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

In der Sequenzierung von zwei Bronchialkarzinomen imponierten homozygote Mutationen in Exon 19 des EGFR. Es erschien nicht wahrscheinlich, dass in beiden Chromosomen identische somatische Mutationen vorkommen. Wir postulierten deshalb, dass aufgrund einer massiven Amplifikation des mutierten EGFR Gens das normale EGFR Gen in der Sequenzierung nicht detektiert wurde. Um dies zu prüfen führten wir eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Zentromer 7- und EGFR Gen-Sonden durch.

Lösungen

LSI EGFR Dual Color Probe-Hyb Set

Vysis, Inc. Dowers Grove USA

Diese Sonde hybridisiert 7p12 in SpectrumOrange und den Zentromer des Chromosom 7 (7p11.-q11, 1, D7Z1 locus) in SpectrumGreen.

20x SSC (2J10-32)

132 g 20x SSC, 500 ml Aquadest, pH 5,3.

2x SSC (= Wasch-Puffer oder Pretreatment-Buffer)

100 ml 20x SSC, 900 ml Aquadest, pH 7,0.

Pretreatment-Solution (2J06-30)

Protease-Puffer (2J07-30)

Protease I, 250 mg (2J10-30)

Post-Hybridisierungs-Puffer (2x SSC)

66 g 20x SSC, 250 ml destilliertes Wasser, pH 5,3, 50 ml 20x SSC, 1,5 ml NP-40, pH 7,0-7,5, auf 500 ml Gesamtvolumen füllen.

Protokoll

1. Tag

2-3 µm dicke Schnitte werden von den original Paraffinblöcken mit einem Mikrotom abgeschnitten, in ein 37°C warmes Wasserbad gelegt und auf ein Objektträger gespannt. Diese werden über Nacht bei 37°C getrocknet.

2. Tag

Die Schnitte werden 30 min bei 60°C senkrecht inkubiert damit das Paraffin abtropfen kann. Zur weiteren Entparaffinisierung und zur Rehydrierung durchlaufen die Schnitte eine Bäderreihe:

- 10 min; Xylol
- 10 min; Xylol
- 5 min; 100% Isopropanol
- 5 min; 100% Isopropanol
- 1 min; 96% Isopropanol
- 1 min; 80% Isopropanol
- 1 min; 70% Isopropanol

Anschließend werden sie bei 37°C getrocknet.

Zum Auflockern des Gewebes werden die Schnitte für 20 min in 0,2 M HCl eingetaucht. Hinterher für 3 min in destilliertem Wasser und dann für 3 min in 2x SSC-Waschpuffer gebadet. Nun werden sie sehr vorsichtig, die Schnitte dürfen sich nicht von dem Objektträger lösen, für 30 min in 82°C warmer „Pretreatment Solution“ gebadet. Nach 1 min in destilliertem Wasser und zweimal 5 min in 2x SSC kommen sie für 90 min in 37°C warme Proteaselösung. Danach werden sie zweimal für 5 min in 2x SSC-Waschpuffer gebadet, dann 10 min in 4% gepuffertem Formalin und anschließend erneut zweimal für 5 min in 2x SSC-Waschpuffer.

Die Schnitte werden bei 37°C getrocknet. Nun können 10 µl der LSI EGFR Dual Color Sonde auf einen Schnitt gegeben werden, dieser wird mit einem Deckgläschen versehen und mit Fixogum (Marabu, Bietigheim-Bissingen, Deutschland) abgedichtet. Nach 10 min bei 85°C werden sie über Nacht bei 37°C inkubiert.

3. Tag

Das Fixogum wird vom Objektträger entfernt und der Schnitt in 2x SSC-Waschpuffer gebadet bis sich das Deckgläschen löst. Nun werden die Schnitte für genau 2 min in 72°C Post-Hybridisierungspuffer inkubiert. Sie werden danach kurz in 2x SSC-Waschpuffer gebadet, abgetrocknet und dann mit 10 µl DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, Roche, Mannheim Deutschland) gefärbt. Ein neues Deckgläschen wird mit Fixogum fixiert und die Schnitte lichtgeschützt bei 4°C bis zur Auswertung gelagert.

Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit *Statistica 6.0* © von StatSoft Inc. für Windows © Microsoft durchgeführt. Gruppen wurden in 2 x 2 Tabellen verglichen und auf Signifikanz mit Fishers-exact p-Test (two-sided) geprüft. Gültigkeit der Nullhypothesen wurde auf ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ geprüft.

Ergebnisse

Patientenkollektiv

Ausgangspunkt für diese Arbeit waren alle konsekutiven Lungentumorproben die im Zeitraum Januar 1995 bis August 2003 vom Institut für Pathologie der Universität Bonn archiviert wurden. Lediglich 166 von mehr als 400 Adenokarzinomen erfüllten die Einschlusskriterien und wurden zur weiteren Analyse vorbereitet. Von allen Plattenepithelkarzinomen wurden 30 zufällig selektiert.

Zur DNA-Analyse wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und das Tumorgewebe makroskopisch dissektiert. Material von 3-5 Schnitten wurde vereinigt und zur DNA-Isolierung verwendet. Die DNA-Qualität wurde elektrophoretisch in einem Agarosegel beurteilt (Abbildung 8). Wegen mangelndem Gewebe oder schlecht fixierten Proben war die DNA-Qualität nicht in allen Fällen ausreichend und die Proben wurden aus der weiteren Studie entfernt. Insgesamt konnte aus 67 Tumorproben genomische DNA von geeigneter Qualität gewonnen werden.

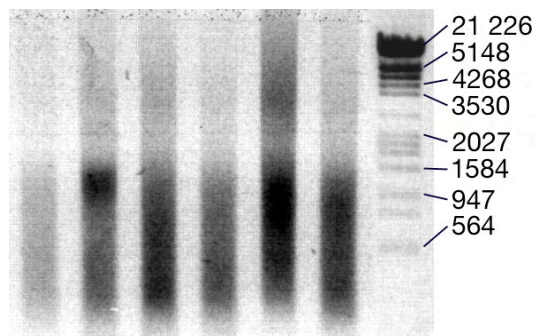


Abbildung 8: DNA-Isolationsqualität

Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Isolationsprodukten. Rechts wurde ein Hind III/λ-Längenmarker aufgetragen und die entsprechenden Basenpaarlängen beschriftet. Die Qualität der DNA ist umso besser je größer der Anteil hochmolekularer DNA ist.

Die wichtigsten Eckdaten des Tumorkollektivs sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Das Kollektiv beinhaltete 15 Plattenepithelkarzinome und 52 Adenokarzinome von 24 Frauen und 43 Männern im Alter zwischen 43-87 Jahren. Zwölf der Adenokarzinome waren vom bronchiolo-alveolären Subtyp. Über 80% der Patienten waren oder sind Raucher. 22 Proben entstammen der linken und 45 der rechten Lunge. Die beiden linken Lungenlappen waren gleichhäufig befallen während der rechte Oberlappen häufiger als der Unter- oder Mittellappen betroffen

war. 30 Patienten befanden sich im Tumorstadium I (47%), 24 in Tumorstadium II (37,5%), 8 in Tumorstadium IIIA (12,5%), keiner in Stadium IIIB, 2 in Stadium IV (3%) und bei 3 war ein vollständiges Staging nicht dokumentiert.

Tabelle 5: Grundeigenschaften des Patientenkollektivs

		n	%
Geschlecht	männlich	43	64,2
	weiblich	24	35,8
Durchschnittliches Alter z. Z. der Operation	in Jahren	64,6	8,2 Jahre (Standardabweichung)
Histologische Klassifikation	Adenokarzinom	40	59,7
	BAC*	12	17,9
	Plattenepithelkarzinom	15	22,3
Raucherstatus	Niemals-Raucher	7	16,7
	Ex-Raucher	12	28,5
	Raucher	23	54,8
	unbekannt	20	
Lokalisation *	linker Oberlappen	12	17,9
	linker Unterlappen	11	16,4
	rechter Oberlappen	25	37,3
	rechter Mittellappen	7	10,4
	rechter Unterlappen	15	22,4
Tumorstadium	I	30	46,8
	II	24	37,5
	IIIA	8	12,5
	IV	2	3
	unbekannt	3	
* Die kumulative Anzahl überschreitet die Probenzahl da der Tumor z.T. mehrere Lungenlappen befällt			

Übersicht der klinischen Grundeigenschaften des Patientenkollektivs als Anzahl an Proben (n) und in Prozentangaben. Bei 20 Patienten war der Raucherstatus nicht bekannt, deshalb wurden die Prozentangaben in der Rubrik Raucherstatus auf nur 47 Patienten bezogen.

Mutationsanalyse des EGFR-Gens

Der EGFR wird in 28 Exonen kodiert. Vorherige Studien haben gezeigt, dass Mutationen in Exonen 18, 19 und 21 ausschlaggebend für die Wirksamkeit von EGFR-TKI in NSCLC sind. Ich habe mich daher in dieser Arbeit auf diese Exone fokussiert. Zunächst wurden für die Mutationsanalyse die Exone mit flankierenden intronischen PCR-Primern amplifiziert. Die resultierenden Amplikons enthielten keine Verunreinigungen und waren direkt zur

Sequenzierung verwendbar (Abbildung 9). Alle Proben wurden sowohl in *sense* als auch *antisense* Richtung sequenziert.

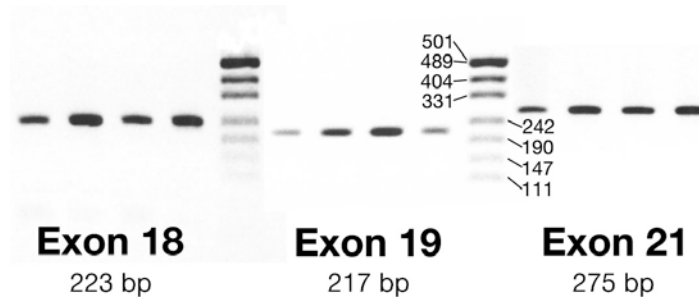


Abbildung 9: PCR-Amplifikation

Abgebildet ist eine Gelelektrophorese von vier Tumorproben nach DNA-Isolation und Amplifikation der Exone 18, 19 und 21 mittels PCR. Die Exone sind durch Größenmarker getrennt. Die Größe der einzelnen Banden ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

Insgesamt zeigten zwölf Tumore Mutationen im EGFR Gen. Von diesen waren zwei Mutationen in Exon 18, sechs in Exon 19 und vier in Exon 21. Punktmutationen in Exon 18 führten in zwei Proben zu Aminosäuresubstitutionen (Abbildung 10). Hierbei war in beiden Fällen das Glycin an Position 719 betroffen. Einmal wurde es durch das lipophile Alanin ersetzt (G719A). In dem anderen Tumor lag eine Doppelmutation vor. Glycin wurde durch schwefelhaltiges Cystein substituiert (G719C) und zusätzlich hydrophiles Glutamat an Position 709 durch das kleinere, aber auch hydrophile, Glycin ersetzt (E709G).

In Exon 19 fanden wir bei sechs Patienten Deletionen von 12-18 Basen (Abbildung 11). Alle Deletionen betrafen die Sequenz E-L-R-E-A oder Aminosäuren 746-750. In drei Fällen war die nicht-mutierte (normale) Sequenz nicht oder nur schwach erkennbar. Von der Sequenzanalyse konnte nicht beurteilt werden ob die Mutation homozygot vorlag oder das mutierte Gen amplifiziert war (siehe unten Abschnitt „FISH-Analyse“). Bei drei Proben war zusätzlich auch T751 und in einem Fall S752 deletiert. In keinem Fall führten diese Deletionen zu einer Verschiebung des Leserahmens.

Von den vier Mutationen in Exon 21 waren drei identische Punktmutationen und führten zu einer L858R Substitution. Hierbei wird lipophiles Leucin durch das basische Arginin ersetzt. In einem Fall wurde Glycin an Position 857 durch das basische Arginin substituiert (G857R) (Abbildung 12).

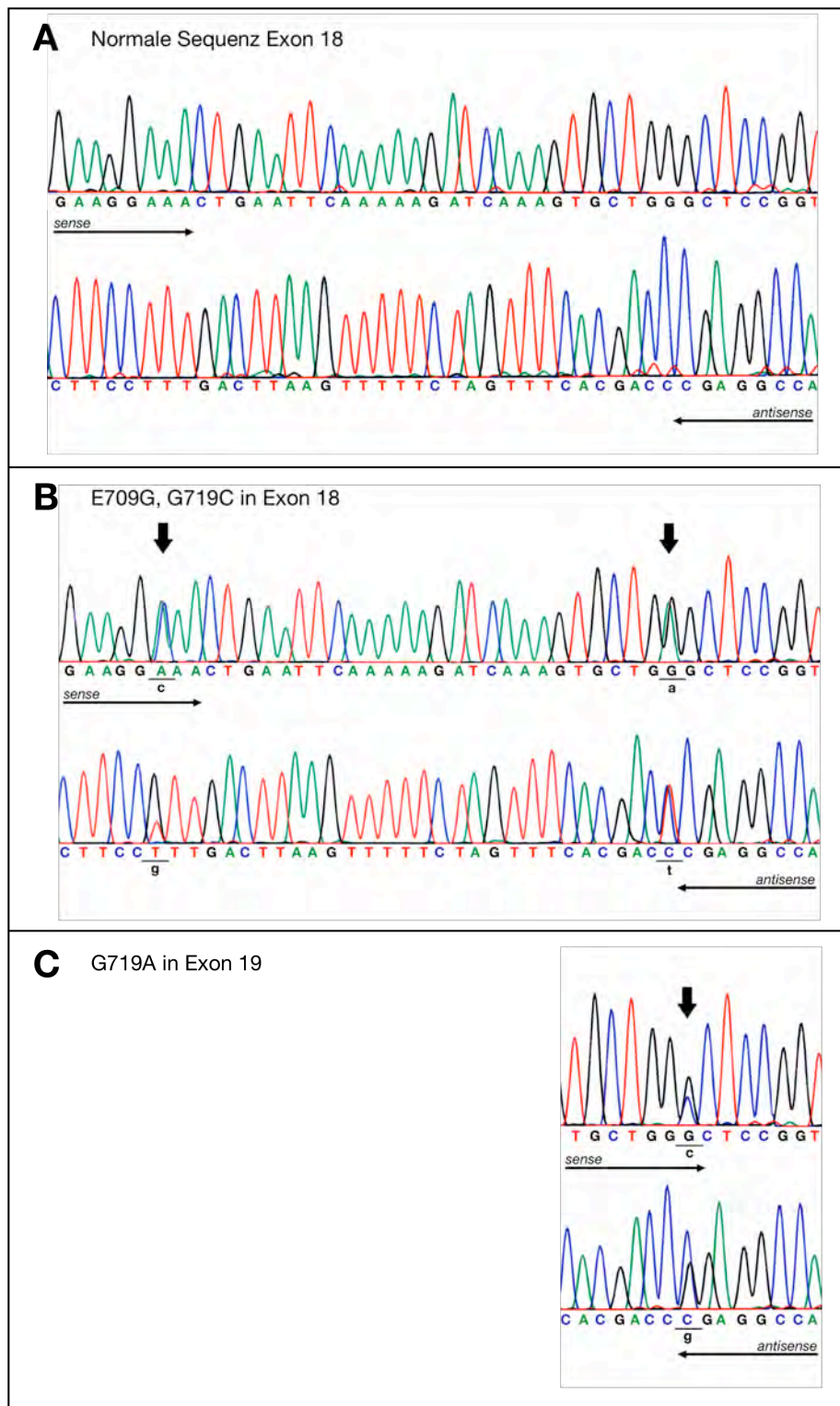


Abbildung 10: Mutationen in Exon 18

Gezeigt sind die Sequenzanalysen in sense und antisense Orientierung. Die einzelnen Nukleotidbasen sind farbkodiert. Die normale Sequenz ist in Großbuchstaben, die Mutation in Kleinbuchstaben dargestellt. A: Normale Nukleotidsequenz 2368 bis 2409. B: Heterozygote Doppelmutation E709G und G719C. Die Mutation ist eindeutig an den überlappenden Spuren des normalen und mutierten Allels erkennbar. C: Mutation G719A.

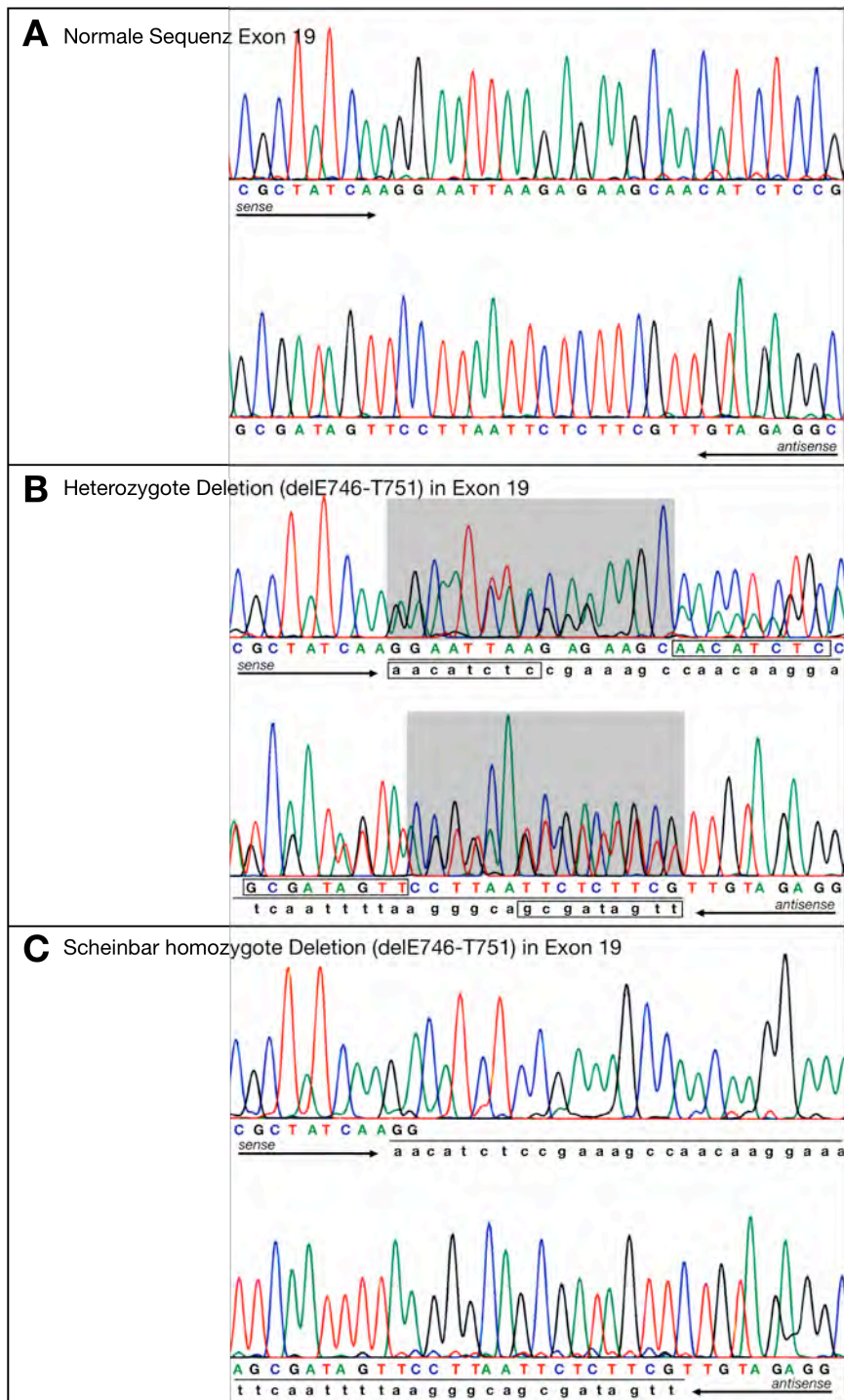


Abbildung 11: Mutationen in Exon 19

Gezeigt sind die farbkodierte Sequenzanalysen in sense und antisense Orientierung. Die normale Sequenz ist in Großbuchstaben und die Mutation in Kleinbuchstaben dargestellt. A: Normale Nukleotidsequenz 2471 bis 2505. B: Die heterozygote Deletion von 15 Nukleotiden (delE746-T751) ist eindeutig an den überlappenden Spuren des normalen und mutierten Allels erkennbar. Der deletierte Bereich ist grau hinterlegt. Kästchen dienen zur Verdeutlichung der Sequenzverschiebung. C: Identische Deletion wie in B, allerdings ist die normale Sequenz nicht oder nur sehr schwach erkennbar. Die Sequenzanalyse erlaubt keine Aussage darüber, ob eine homozygote Mutation oder eine Amplifikation des mutierten Allels vorliegt.

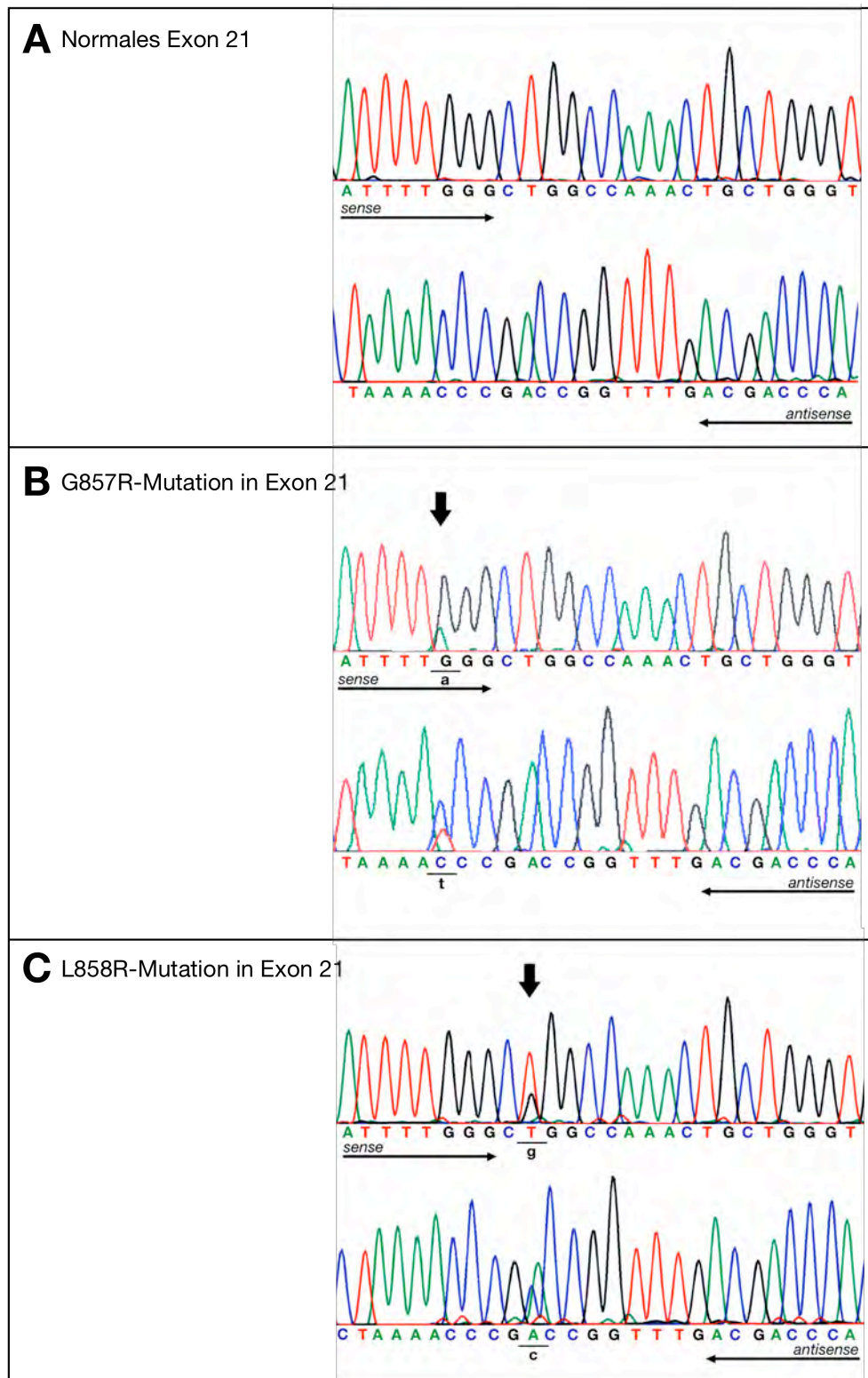


Abbildung 12, Mutationen in Exon 21

Gezeigt sind die Sequenzanalysen in sense und antisense Orientierung. Die normale Sequenz ist in Großbuchstaben und die Mutation in Kleinbuchstaben dargestellt. A: Normale Nukleotidsequenz 2809 bis 2835. B: Punktmutation mit resultierender G857R-Substitution. C: Mutation L858R.

Der Vergleich von EGFR-WT und EGFR-M Fällen zeigte, dass EGFR-Mutationen vermehrt in Frauen mit Adenokarzinomen vorkommen (Tabelle 6). Obwohl Frauen nur 30% des Patientenkollektivs ausmachten, trugen diese 10 von den 12 Mutationen (83%). Die Mutationsfrequenz bei Frauen war mit 41,6% signifikant höher als bei Männern (4,7%; $p = 0,0003$). Alle EGFR mutierten (EGFR-M) Tumorproben gehörten histologisch zur Gruppe der Adenokarzinome, drei davon zum bronchiolo-alveolärem Subtyp. Keiner der 15 Plattenepithelkarzinome trug eine EGFR-Mutation. Eine weitere Differenzierung von Raucherstatus und Tumorstadien ist wegen der geringen Fallzahl nicht aussagekräftig. Allerdings war die prozentuale Verteilung innerhalb der EGFR-WT und der EGFR-M Gruppen sehr ähnlich.

Tabelle 6: Grundeigenschaften des Patientenkollektivs getrennt nach Mutationsstatus

		EGFR-WT	EGFR-M
Geschlecht	männlich	41 (75%)	2 (17%)
	weiblich	14 (25%)	10 (83%)
Histologische Klassifikation	Adenokarzinom	31 (56%)	9 (75%)
	BAC*	9 (16%)	3 (25%)
	Plattenepithelkarzinom	15 (27%)	0
Raucherstatus	Niemals-Raucher	5 (15%)	2 (22%)
	Ex-Raucher	10 (30%)	2 (22%)
	Raucher	18 (54%)	5 (55%)
Durchschnittliches Alter z. Z. der Operation	in Jahren	65,1	59,9
Tumorstadium	I	25 (45%)	5 (42%)
	II	20 (36%)	4 (33%)
	IIIA	7 (13%)	1 (8%)
	IV	0	2 (17%)
	unbekannt	3 (6%)	0

*Dargestellt sind die Grundeigenschaften des Gesamtkollektivs geteilt nach EGFR-Mutationen in zwei Gruppen. Angegeben sind die Anzahl der Proben und die entsprechenden Prozentangaben (in Klammern) bezogen auf alle Proben innerhalb einer Gruppen (EGFR-WT = 55; EGFR-M = 12). * Bronchiolo-alveoläres Karzinom.*

Die detaillierte Klassifikation der Tumore mit EGFR-Mutationen ist in Tabelle 7 dargestellt. Zwei der drei Adenokarzinome vom bronchiolo-alveolären Subtyp, alle Tumorstadien IV und alle niemals-Raucher hatten Mutationen in Exon 19. Beide Männer hatten eine Mutation in Exon 21. Der überwiegende Anteil an mutierten Tumoren war im rechten Oberlappen lokalisiert.

Tabelle 7: Patientendetails der Mutierten Fälle

Nummer	Alter z. Z. der Operation	Geschlecht	Histologische Klassifikation	Grading	pT	pN	pM	Tumor-stadium	Mutation	Raucher Status	Lokalisation
1	71	f	Adenokarzinom	G2	2	1	0	II	Exon 18 - E709G, G719C	Ex-Raucher	re. Unterlappen
2	62	f	Adenokarzinom	G2	2	0	0	I	Exon 18 - G719A	Raucher	re. Oberlappen
3	55	f	Adenokarzinom	G2	1	2	0	IIIA	Exon 19 - delE746-A750	Raucher	li. Oberlappen
4	67	f	BAC	G2	2	0	0	I	Exon 19 - delE746-T751	Niemals-Raucher	re. Mittel-/Unterlappen
5	50	f	Adenokarzinom	G3	1	0	0	I	Exon 19 - delE746-S752	Raucher	re. Oberlappen
6	57	f	BAC	G2	2	2	1	IV	Exon 19 - delE746-T751		re. Ober-/Mittellappen
7	69	f	Adenokarzinom	G2	2	0	0	I	Exon 19 - delE746-T751		re. Unterlappen
8	53	f	Adenokarzinom	G3	2	1	1	IV	Exon 19 - delE746-A750	Niemals-Raucher	li. Oberlappen
9	51	f	BAC	G2	1	0	0	I	Exon 21 - L858R	Ex-Raucher	li. Oberlappen
10	61	m	Adenokarzinom	G1-G2	2	1	0	II	Exon 21 - L858R		re. Oberlappen
11	48	m	Adenokarzinom	G2-G3	1	1	0	II	Exon 21 - L858R	Raucher	re. Oberlappen
12	71	f	Adenokarzinom	G3	1	1	0	II	Exon 21 - G857R	Raucher	re. Oberlappen

*BAC: bronchioloalveoläres Karzinom

Zur Verdeutlichung sind die wichtigsten Charakteristika der Patienten mit EGFR-Mutationen hier gesondert aufgeführt. Sie sind nach den Mutationstypen sortiert.

Expression des EGFR

Als Nächstes wurden alle Tumore immunhistochemisch auf ihre EGFR-Expression untersucht. Hierfür wurden Schnitte der Tissue Microarrays nach der oben beschriebenen Methode zubereitet und nach dem vier-stufigen Schema bewertet. Um zu kontrollieren, ob die Stenzen des TMA repräsentativ für den Tumor sind, wurden von zehn Fällen (5 mit positiver und 5 mit negativer Färbung) immunhistochemische Färbungen eines vollen Schnittes angefertigt. Hierbei zeigt sich, dass die TMA nicht den Tumor als ganzes widerspiegeln. Von den TMA-negativ gefärbten Fällen zeigten vier Proben Areale welche deutlich positiv waren. Von den bereits positiv bewerteten Fällen wurde die Färbeintensität unterschätzt (Durchschnitt: TMA-positiv 2,4; Vollschnitt positiv 2,8). Insgesamt betrachtet zeigten die peripheren Tumorareale eine kräftigere Färbung als das Tumorzentrum (Abbildung 7 im Methodenabschnitt). Leider wurde in der TMA-Produktion meistens das Tumorzentrum für die Entnahme von Gewebsstanzen markiert, so dass die TMA von allen weiteren immunhistochemischen Analysen ausgeschlossen werden mussten.

Wir haben daher volle Schnitte von allen Tumorproben angefertigt und auf EGFR-Expression untersucht. Insgesamt exprimierten 49 Proben (73%) den EGFR, 69% der Adenokarzinome, 59% der bronchiolo-alveolären Adenokarzinome und 93% der Plattenepithelkarzinome (Tabelle 8). Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen Geschlecht oder Tumorstadium und der EGFR-Expression (67% der Tumorproben von Frauen und 77% von Männern exprimierten den EGFR). Auch nach Aufteilung der Gruppen in EGFR-WT und EGFR-M Bronchialkarzinome zeigte sich kein Unterschied in der EGFR-Expressionsrate (75% vs. 73%) (Abbildung 13). Diese

Ergebnisse implizieren, dass der EGFR-Mutationsstatus keinen Einfluss auf seine Expressionsrate hat. Deshalb analysierten wir zusätzlich den Aktivitätszustand des EGFR.

Tabelle 8: EGFR-Expression

		EGFR Expression ≤ 1	EGFR Expression ≥ 2	p-Wert
Geschlecht	männlich	10 (23%)	33 (77%)	0,401
	weiblich	8 (33%)	16 (67%)	
Histologische Klassifikation	Adenokarzinom	12 (31%)	27 (69%)	0,5771
	BAC*	5 (41%)	7 (59%)	0,0621
	Plattenepithelkarzinom	1 (7%)	14 (93%)	0,0528
Tumorstadium	I	12 (40%)	18 (60%)	0,0508
	II	3 (12,5%)	21 (87,5%)	0,0827
	IIIA	2 (25%)	6 (75%)	1
	IV	0	2 (100%)	1
	unbekannt	1	2	

Die EGFR-Expression wurde an immunhistochemisch gefärbten Schnitten bewertet. Die wichtigsten klinischen Eigenschaften der EGFR-negativen (≤ 1) und EGFR-positiven (≥ 2) Karzinome sind hier aufgeführt. Angegeben sind die Anzahl der Proben und die entsprechenden Prozentangaben (in Klammern).

Auswirkungen der Mutationen im EGFR-Gen auf den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors

Als nächstes wurde die Auswirkung von den oben beschriebenen Mutationen im EGFR-Gen analysiert. Die Aktivität und Funktion des EGFR wird von intrazellulären Phosphorylierungsstellen bestimmt. Das bedeutet, dass eine Autophosphorylierung oder src-vermittelte Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten die Signalkaskaden des EGFR initiiert.

Die Phosphorylierung an Tyrosin 992, 1068 und 1173 wurde immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern erfasst. Insgesamt zeigten 33 Tumorproben einen aktivierten EGFR (49%) und die Phosphorylierungsrate unter den Tyrosinresten war gleichmäßig verteilt (P-Tyr-992, 28%; P-Tyr-1068, 24%; P-Tyr-1173, 21%).

Wurde aber anhand des Mutationsstatus differenziert, zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Phosphorylierung zwischen EGFR-WT und EGFR-M (Abbildung 13). 83% der mutierten Tumorproben zeigten mindestens eine Phosphorylierung während nur 42% der normalen

Tumoren phosphoryliert waren ($p = 0,0115$, nicht dargestellt). Der größte Unterschied lag bei Tyrosin 992 und 1173. Nur 20% der EGFR-WT Fälle waren an Tyrosin 992 phosphoryliert, aber 67% der EGFR-M Fälle ($p = 0,0027$). Tyr-1173 war in 13% von EGFR-WT und in 58% der EGFR-M Läsionen phosphoryliert ($p = 0,002$). Demnach korrelieren Mutationen im EGFR-Gen mit einer erhöhten Rezeptoraktivität und unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern.

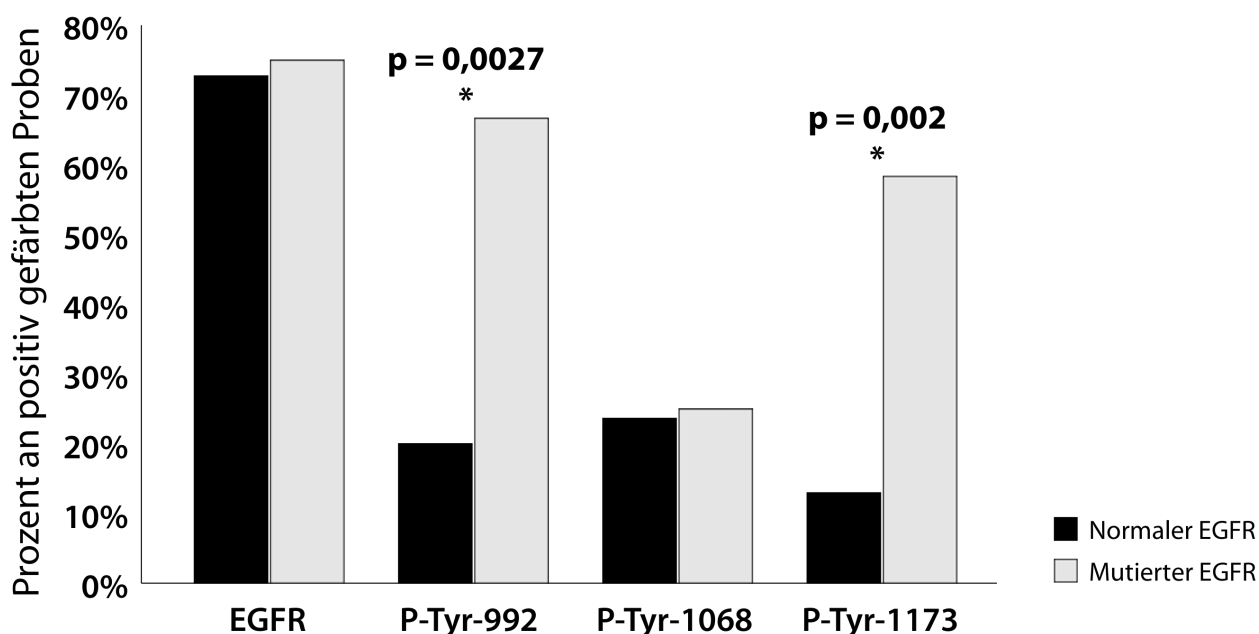


Abbildung 13: Prozent an spezifischen P-Tyrosinen, EGFR-WT vs. EGFR-M

Graphische Darstellung der EGFR-positiven und der EGFR spezifisch phosphorylierten Proben, getrennt nach Mutationsstatus. Der EGFR ist in mutierten Tumoren an Tyr-992 und Tyr-1173 signifikant häufiger phosphoryliert. P-Werte wurden mit dem Fishers-exact p-test (two-tailed) berechnet.

Um zu ermitteln welche Signaltransduktionswege durch die erhöhte EGFR-Aktivität initiiert werden, analysierten wir den Phosphorylierungsstatus von Stat3, Akt und MAPK via Immunhistochemie. Lediglich 18 Proben färbten positiv für P-Akt, allerdings waren acht von ihnen EGFR-M (67%) und nur 10 EGFR-WT (18%, $p=0,0017$) (Abbildung 14). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Phosphorylierungsrate zwischen EGFR-WT und EGFR-M Tumorproben bei Stat3, welches in 44 Tumorproben phosphoryliert war (75% EGFR-M; 64% EGFR-WT), und in P-MAPK, welche bei 16 Patienten entdeckt wurden (33% EGFR-M; 22% EGFR-WT).

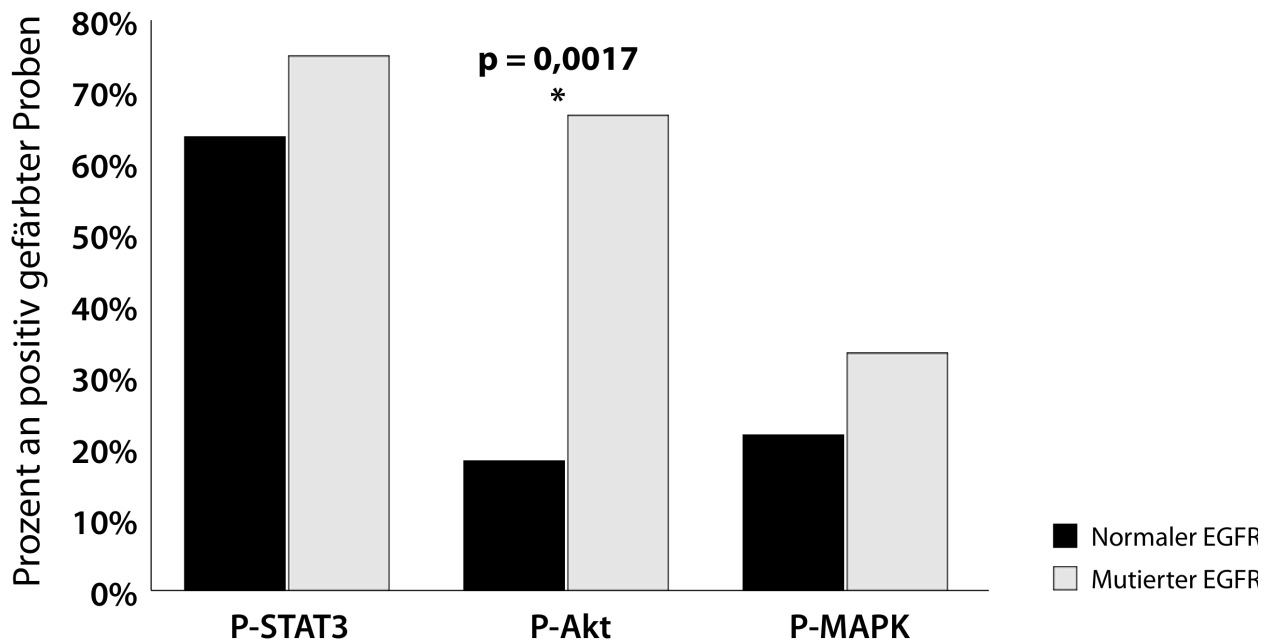


Abbildung 14: Prozent an aktivierten Signaltransduktionswegen in EGFR-WT und EGFR-M Proben

Darstellung der drei wichtigsten phosphorylierten (aktivierten) EGFR-Signaltransduktionskaskaden (Stat-3, Akt, MAPK) aufgetrennt nach dem EGFR-Mutationsstatus. EGFR-mutierte NSCLC zeigen eine signifikant erhöhte Akt-Phosphorylierung. P-Werte wurden mit dem Fishers-exact p-test (two-tailed) berechnet.

Da alle EGFR-M Fälle histologisch Adenokarzinome darstellten und alle 15 Plattenepithelkarzinome zu der EGFR-WT Gruppe gehörten, wollten wir überprüfen ob die oben genannten Ergebnisse tatsächlich ein Resultat der Mutationen sind, oder lediglich die heterogene Verteilung der beiden Gruppen widerspiegeln. Hierfür wurden die Plattenepithelkarzinome vom EGFR-WT-Kollektiv ausgeschlossen und die statistischen Analysen erneut durchgeführt. Das Ergebnis war jedoch gleich: Tyr-992 und Tyr-1173 des EGFR und Akt waren signifikant häufiger in der EGFR-M Gruppe als in der nicht mutierten Gruppe phosphoryliert ($p = 0,0175$, $p = 0,0013$ und $p = 0,0035$ entsprechend). Daher besteht eine direkte Korrelation zwischen den Phosphorylierungsmustern und EGFR-Mutationen und sie sind nicht Folge des histologischen Subtyps (Abbildung 15).

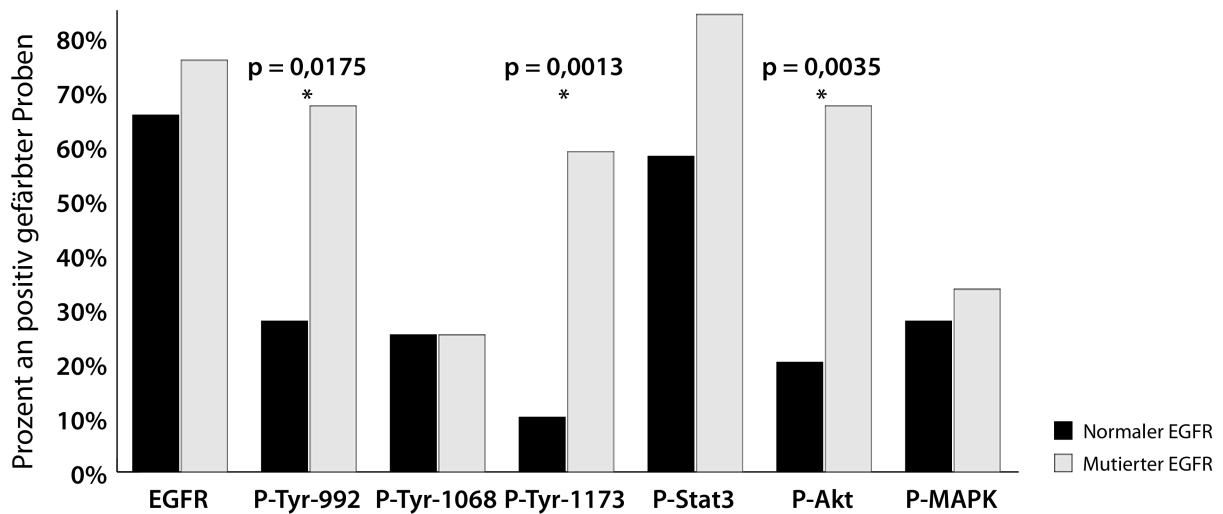


Abbildung 15: Patientenkollektiv exklusive der Plattenepithelkarzinome

Prozentuale Darstellung der immunhistochemischen Analyse von EGFR, P-Tyr-992, P-Tyr-1068, P-Tyr-1173, P-Stat3, P-Akt und P-MAPK des Patientenkollektivs nach Ausschluß der Plattenepithelkarzinome. Vom Trend sind die Ergebnisse identisch zu dem gesamten Patientenkollektiv, daher sind die beobachteten Effekte durch die Mutation bedingt und nicht ein Resultat des histomorphologischen Subtyps. P-Werte wurden mit dem Fishers-exact p-test (two-tailed) berechnet.

Meine Ergebnisse belegen eindeutig, dass EGFR-Mutationen grundsätzlich mit einer gesteigerten Phosphorylierung an spezifischen Tyrosinresten des EGFR und Aktivierung von gezielten Signaltransduktionswegen assoziiert sind. Als nächstes wollte ich prüfen, ob die Mutations-Lokalisation bzw. -Art verschiedene Aktivitätsmuster bedingt. Dazu wurde die EGFR-M Gruppe in drei Subgruppen unterteilt: Exon 18, Exon 19 oder Exon 21 Mutationen. Hierbei zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung von Tyr-992 in der Exon 21 Subgruppe ($p = 0,003$), von Tyr-1068 in der Exon 19 Subgruppe ($p = 0,0082$) und von Akt in den Exon 18 und 19 Subgruppen ($p = 0,0414$ und $0,0212$ entsprechend). Ein weitere detaillierte Analyse ist wegen der kleinen Gruppenszahl nicht möglich, aber das Muster der EGFR-M Gruppe wird in allen ihrer Subgruppen ohne Ausreißer widergespiegelt. Alle beschriebene EGFR-Mutationen führen somit zu einer ähnlichen und gesteigerte Rezeptoraktivität (Abbildung 16).

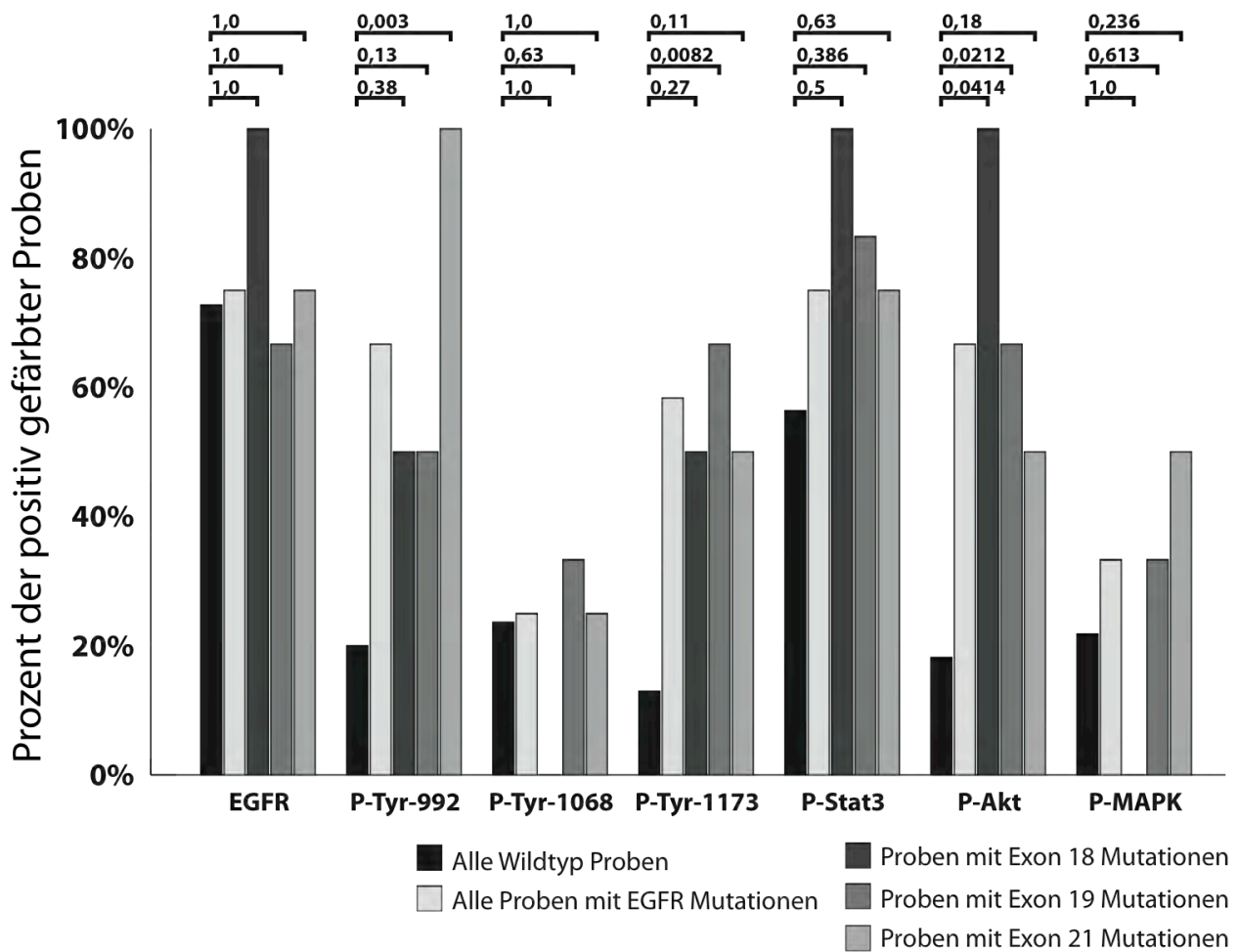


Abbildung 16: EGFR-M Subgruppenanalyse

Graphische Darstellung des EGFR, des phosphorylierten EGFR und der phosphorylierten (aktivierten) drei wichtigsten EGFR-Signaltransduktionskaskaden (Stat3, Akt, MAPK) aufgetrennt nach den EGFR-Mutationen-Subgruppen (Exon 18, 19 und 21). Diese Subgruppenanalyse zeigte ein ähnliches Muster wie das gesamte EGFR-Mutationskollektiv: Tyr-992 der Exon 21 Subgruppe ($p = 0,003$), Tyr-1068 der Exon 19 Subgruppe ($p = 0,0082$) und Akt der Exon 18 und 19 Subgruppen ($p = 0,0414$ und $0,0212$ entsprechend) zeigten eine vermehrte Phosphorylierung. P-Werte zwischen den einzelnen Gruppen sind über den entsprechenden Balken dargestellt und wurden mit dem Fishers-exact p-test (two-tailed) berechnet.

Schließlich untersuchte ich ob spezifische EGFR-Phosphorylierungsmuster mit der Aktivierung charakteristischer Signaltransduktionswege korreliert. Phosphotyrosin-1068 zeigte keinen Effekt auf die drei untersuchten Signaltransduktionswege. MAPK und Akt wiesen einen leichten Trend erhöhter Aktivität auf wenn der EGFR an Tyr-1173 phosphoryliert war. Die Phosphorylierung von Tyr-992 korrelierte allerdings signifikant mit Akt und MAPK-Phosphorylierung ($p = 0,0052$ und $p = 0,0011$ entsprechend) (Abbildung 17).

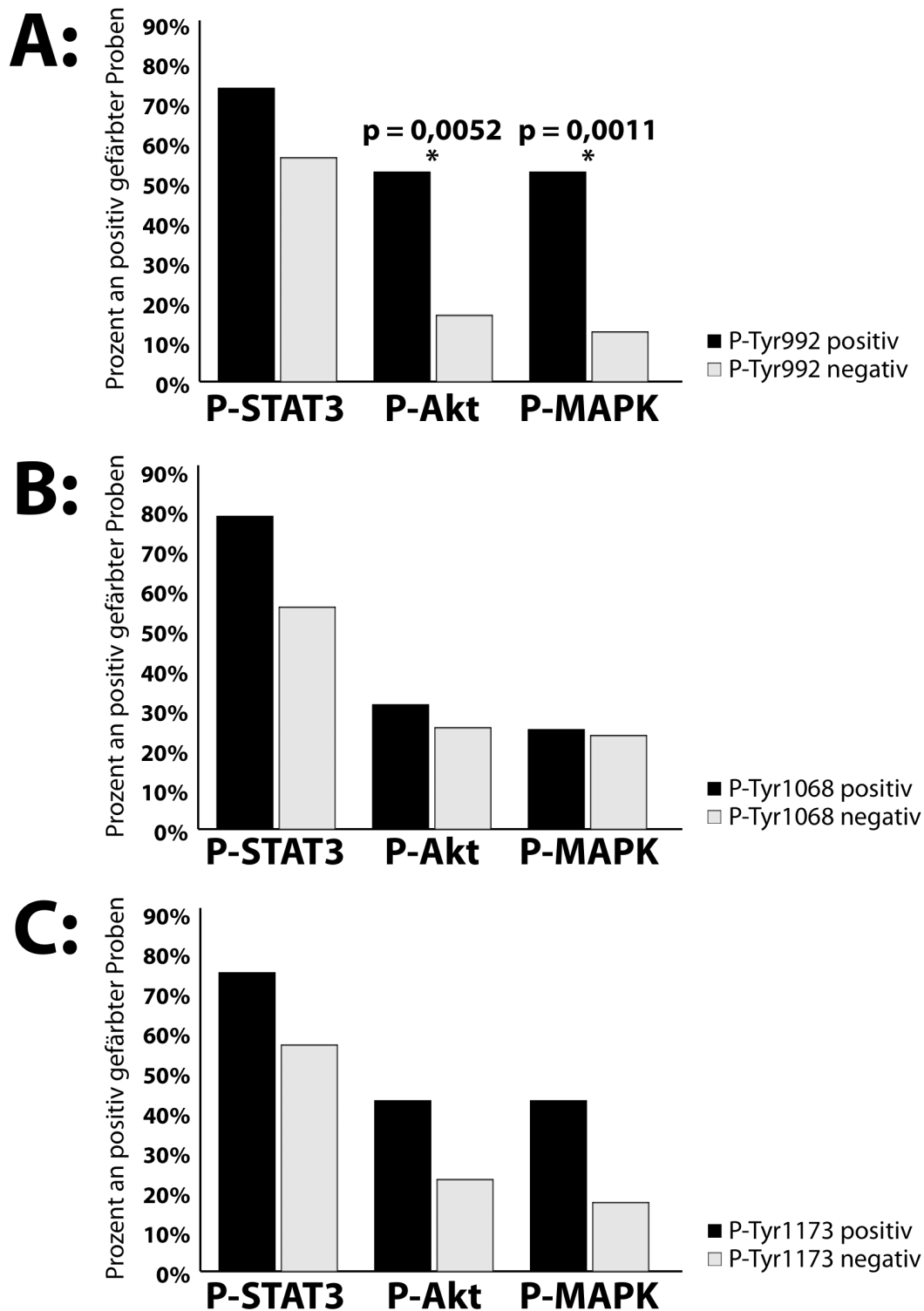


Abbildung 17: Effekt von spezifischer EGFR-Phosphorylierung auf EGFR-Signaltransduktionswege

Graphische Darstellung der phosphorylierten EGFR-Signaltransduktionswege (Stat3, Akt, MAPK) getrennt nach spezifischer EGFR-Phosphorylierung. Tumore welche eine Phosphorylierung des EGFR an Tyr-992 aufweisen, zeigen signifikant häufiger eine Aktivierung von Akt und MAPK. P-Werte wurden mit dem Fishers-exact p-test (two-tailed) berechnet.

FISH-Analyse

In der Sequenzanalyse von Exon 19 des EGFR fanden wir in drei Fällen Mutationen, welche charakteristischerweise wie homozygote Mutationen aussahen (Abbildung 11). Da homozygote Mutationen in einer erworbenen Neoplasie sehr unwahrscheinlich sind und eine Aussage über die Genkopiezahl in der Sequenzanalyse nicht möglich ist, erfolgte eine FISH-Analyse dieser Proben. Insgesamt wurden von 30 Proben histologische Schnitte mit einer Zentromer-Sonde des Chromosom 7 und einer EGFR-Sonde hybridisiert (Abbildung 18).

Zehn der dreißig selektierten Proben hatten Mutationen im EGFR-Gen und alle mutierten Fälle eine Amplifikation des EGFR-Gens. EGFR-Amplifikationen waren häufiger bei Frauen. Junge Patienten und solche mit Adenokarzinomen waren häufiger betroffen. Raucherstatus und Tumorstadium zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der Genkopien. Im Gegensatz dazu, zeigten nur wenige der nicht-mutierten Tumorproben polypleide EGFR-Amplifikationen und keine ein EGFR-Cluster (Tabelle 9). Somit korrelieren EGFR-Mutationen mit einer vermehrten EGFR-Genkopie in NSCLC.

In allen drei Tumorproben, welche in der Sequenzanalyse als homozygote Mutation imponierten, zeigte sich eine massive Amplifikation des EGFR-Gens, sog. EGFR-Cluster. Dies erklärt das beobachtete Muster der Sequenzanalyse, da die Genkopiezahl des mutierten Allels im Vergleich zum normalen Allel häufiger vorhanden war.

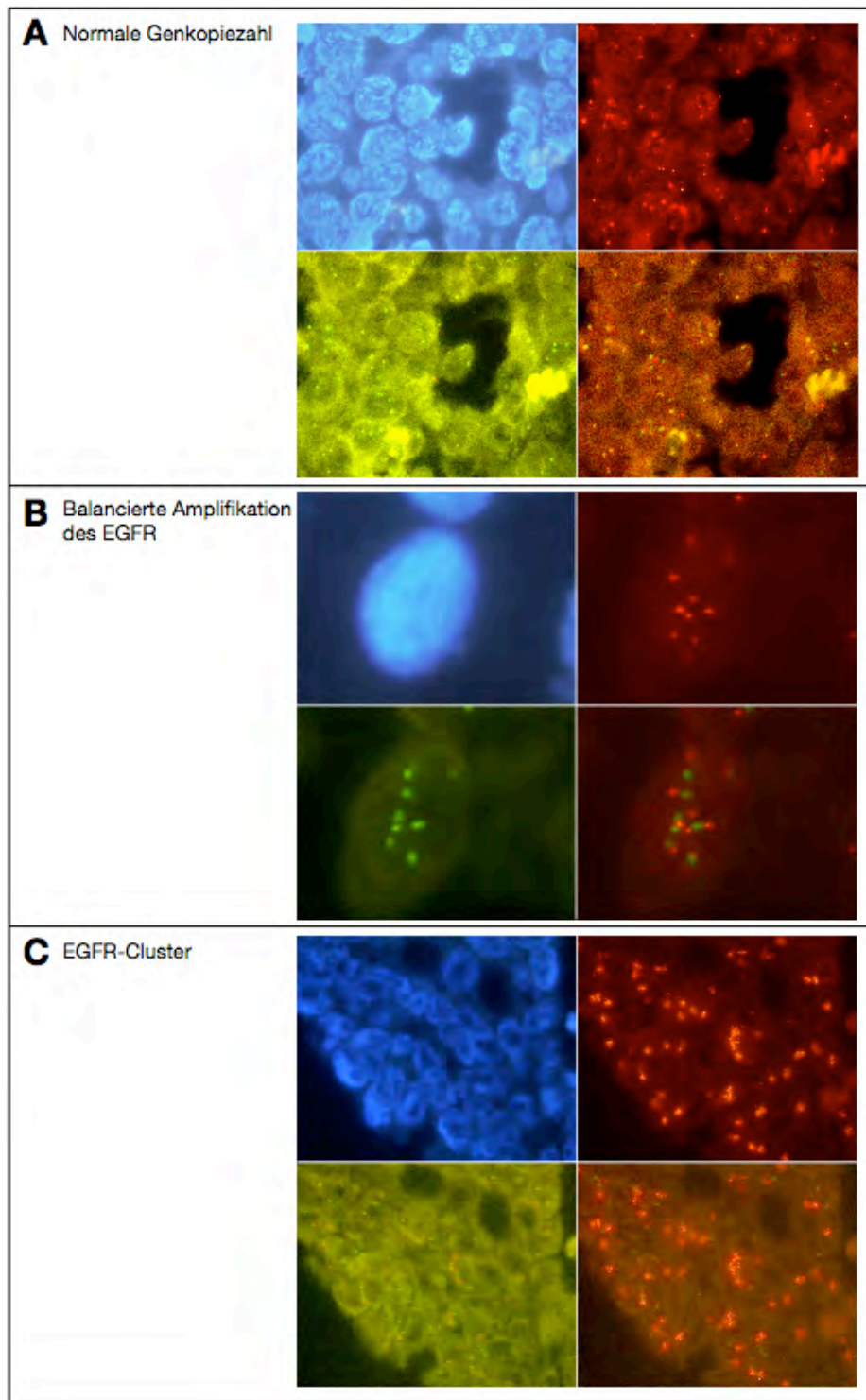


Abbildung 18: FISH-Analyse des EGFR

Beispiele der FISH-Analyse. Die Proben wurden mit einer Zentromer-7- (grün) und einer EGFR-Sonde (orange) hybridisiert. (A) Normale EGFR-Genkopiezahl: jede Zelle zeigte zwei grüne und zwei orangefarbene Punkte. (B) Balancierte Amplifikation: in jeder Zelle leuchteten mehr als zwei grüne und orangefarbene Punkte, aber das Verhältnis ist weiterhin 1:1. (C) EGFR-Cluster: jede Zelle weist eine normale oder leicht erhöhte Zahl der Zentromer-7-Sonden und eine massive Amplifikation des EGFR-Gens auf.

Tabelle 9: Grundeigenschaften des Patientenkollektivs aufgeteilt nach EGFR-Genkopiezahl (FISH-Analyse)

		Normal	Amplifiziert	Cluster
Geschlecht	männlich	16 (73%)	0	1 (25%)
	weiblich	6 (27%)	4 (100%)	3 (75%)
Histologische Klassifikation	Adenokarzinom	14 (64%)	3 (75%)	2 (50%)
	BAC*	3 (14%)	1 (25%)	2 (50%)
	Plattenepithelkarzinom	5 (22%)	0	0
Raucherstatus	Niemals-Raucher	0	0	2 (50%)
	Ex-Raucher	4 (29%)	1 (33%)	1 (25%)
	Raucher	10 (71%)	2 (66%)	1 (25%)
	unbekannt	8	1	
Durchschnittliches Alter z. Z. der Operation	in Jahren	63,9	61,5	55,3
Tumorstadium	I	8 (36%)	1 (25%)	2 (50%)
	II	11 (50%)	1 (25%)	1 (25%)
	IIIA	3 (17%)	1 (25%)	0
	IV	0	1 (25%)	1 (25%)
EGFR Mutationsstatus	Exon 18	0	2 (50%)	0
	Exon 19	2 (9%)	2 (50%)	2 (50%)
	Exon 21	0	0	2 (50%)

Dargestellt sind die Grundeigenschaften des Patientenkollektivs aufgeteilt nach EGFR-Genkopiezahl in drei Gruppen: Normal Genkopiezahl, Amplifikation des EGFR-Gens und EGFR-Cluster. Angegeben sind die Anzahl der Proben und die entsprechenden Prozentangaben (in Klammern).

Diskussion

Das Bronchialkarzinom entspricht einer unkontrollierten Proliferation von Zellen der Bronchialschleimhaut. Es wird vor allem durch die Exposition von exogenen Noxen, wie dem Tabakrauch, verursacht. Trotz kontinuierlicher Verbesserung der diagnostischen und therapeutischen Ansätze ist die Prognose des Bronchialkarzinoms weiterhin sehr schlecht. Nach wie vor ist es die häufigste Krebstodesursache bei Frauen und Männern in den westlichen Industrienationen und hat erhebliche sozioökonomische Folgen. Neue Forschungen haben zu der Entwicklung von chemotherapeutischen Substanzen geführt, welche spezifisch auf die Pathomechanismen des Bronchialkarzinoms gerichtet sind. Als vielversprechend gelten die molekularen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®), weil ihr Angriffspunkt, der EGFR, in mehr als 80% von NSCLC überexprimiert wird. Erste Studien zeigten, dass EGFR-TKI einen deutlichen Einfluss auf Tumorwachstum und Tumorgröße hatten, aber leider nicht die erwartete Ansprechrate. Nur etwa 10-20% von Patienten mit NSCLC profitierten von EGFR-TKI. Lynch et al. und Paez et al. haben gezeigt, dass aktivierende Mutationen im EGFR-Gen mit der Wirksamkeit von TKI korrelieren (Lynch et al. 2004, Paez et al. 2004). Für die Verbesserung vorhandener TKI, Entwicklung neuer Therapiestrategien und der Patientenselektion ist das Verständnis von den molekularbiologischen Pathomechanismen der EGFR-Mutationen von entscheidender Bedeutung. Wir haben zum ersten Mal umfassend die Aktivierungsmustern des EGFR und seinen drei wichtigsten Signaltransduktionskaskaden in NSCLC-Resektaten analysiert.

EGFR in NSCLC

Seit langem ist bekannt, dass der EGFR eine wichtige Rolle in der Entwicklung zahlreicher Tumorentitäten einnimmt (Stoscheck und King 1986). Er beeinflusst Zellzyklusprogression, Apoptose, Angiogenese und Metastasierung (Ciardiello und Tortora 2001, Sobol et al. 1987), und ist in Lungen-, Brust-, Kopf und Hals-, Prostata-, Blasen-, Ovar- und Kolorektaltumoren sowie in Glioblastomen überexprimiert. EGFR-Expression korreliert meist mit fortgeschrittener Erkrankung und schlechter Prognose (Porebska et al. 2000, Salomon et al. 1995, Sung et al. 2000, Woodburn 1999). Resistenz gegen Hormontherapie, zytotoxischen Substanzen und Bestrahlung sind ebenfalls mit EGFR-Expression assoziiert (Akimoto et al. 1999, Chen et al. 2000, Gee et al. 1999, Salomon et al. 1995).

Dies würde vermuten lassen, dass eine medikamentöse Inhibition des EGFR ein erfolgsversprechendes Therapiekonzept darstellt. Bereits in den achtziger Jahren wurden die ersten anti-EGFR Substanzen entwickelt (Masui et al. 1984). Bis heute wurden zwei verschiedene Substanzklassen von EGFR-Antagonisten erfolgreich in Phase 3 Studien geprüft und für den klinischen Einsatz zugelassen. Hierzu gehören anti-EGFR monoklonale Antikörper und niedermolekulare EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren (Ciardiello und Tortora 2001, Grunwald und Hidalgo 2003, Hynes und Lane 2005, Masui et al. 1984, Mendelsohn und Baselga 2003, Normanno et al. 2003).

Anti-EGFR monoklonale Antikörper, wie z.B. Cetuximab und Panitumumab binden an die extrazelluläre Domäne des EGFR in ihrer inaktiven Konformation. Sie blockieren kompetitiv die Ligand-bindende Region und inhibieren somit die Liganden-induzierte Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase (Hynes und Lane 2005, Li et al. 2005, Normanno et al. 2003). Molekulare EGFR-TKI, wie Gefitinib und Erlotinib gehen eine reversible Bindung mit der intrazellulären katalytischen Domäne des EGFR ein, konkurrieren mit ATP und inhibieren so die EGFR-Autophosphorylierung.

Phase 1 Studien mit Gefitinib und Erlotinib haben bereits deutliche Hinweise auf eine mögliche Wirksamkeit bei Patienten mit metastasierten und Chemotherapie-resistenten NSCLC-Varianten geliefert (Baselga et al. 2002, Herbst et al. 2002, Hidalgo et al. 2001, LoRusso et al. 2003, Ranson et al. 2002). Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählte dabei eine Dosis-abhängige Diarrhoe und ein Akne-ähnliches Exanthem (max. tolerierte Dosierung: 750 mg/d für Gefitinib und 150 mg/d für Erlotinib). Histologisch unterscheidet sich dieser Hautausschlag (Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die perifollikulären basalen Hautschichten) jedoch von der typischen Akne und wird bei allen anti-EGFR Therapien beobachtet. Hauttoxizität wird in der Regel erst 2 bis 3 Wochen nach Therapiebeginn beobachtet und verschwindet bei den meisten Patienten ohne Intervention trotz fortgesetzter Therapie.

Gefitinib in der Therapie von NSCLC

Gefitinib zeigte als erster EGFR-Antagonist in zwei Phase 2 Studien eine klinisch relevante anti-Tumoraktivität bei Patienten mit NSCLC, die nicht adäquat auf konventionelle Chemotherapie-Regime angesprochen hatten (inklusive Platinum und Docetaxel basierte Therapien) (Fukuoka et al. 2003, Kris et al. 2003, Lacouture 2006). Daraufhin wurde im Mai 2003 Gefitinib zur Therapie von lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC bei Patienten mit Chemotherapie-Versagen von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA zugelassen.

Leider erbrachte Gefitinib in der Placebo-kontrollierten und randomisierten ISEL-Studie (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer Trial) keinen Überlebensvorteil (Thatcher et al. 2005). Weder die mittlere Überlebenszeit noch die 1-JÜR zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Gefitinib- und der Placebo-Gruppe. Lediglich in der Subgruppenanalyse zeigte sich ein Überlebensvorteil bei Asiaten und niemals-Rauchern. Daher beschränkte die FDA im Juni 2005 ihre Zulassung von Gefitinib ausschließlich auf Patienten in klinischen Studien. Zurzeit wird Gefitinib nur in wenigen ostasiatischen Ländern vermarktet und ist weder in den USA noch in Europa zugelassen.

Vor kurzem jedoch wurde in zwei randomisierten Phase 3 Studien die Effektivität einer Gefitinib-Monotherapie in Kombination mit der Standardtherapie nach Therapieversagen (Docetaxel) verglichen. In der V-15-32 Studie aus Japan, konnte eine „non-inferiority“ (keine Unterlegenheit) der Gefitinib-Monotherapie bezüglich der Gesamtüberlebensrate leider nicht gezeigt werden (Niho S 2007). Allerdings zeigte eine große multi-zentrische Studie eine verbesserte Überlebensrate in der Gefitinib-Gruppe nachdem eine Platinium-basierte Therapie erfolglos war. Zusätzlich war das Nebenwirkungsspektrum günstiger in der Gefitinib-Gruppe (Douillard J-Y 2007).

Erlotinib in der Therapie von NSCLC

Die anti-Tumoraktivität einer Erlotinib-Monotherapie war mit der von Gefitinib in einer Phase 2 Studie bei Patienten mit therapieresistentem NSCLC vergleichbar (Douillard J-Y 2007). Viel wichtiger jedoch war, dass Erlotinib einen Überlebensvorteil von zwei Monaten in der BR.21 Studie zeigte, einer Phase 3 randomisierten, doppel-blind, und Placebo-kontrollierten Untersuchung (Shepherd et al. 2005). Der Überlebensvorteil war zwar in allen Subgruppen signifikant, aber die Therapieerfolgsquote war besser bei Frauen, Patienten mit Adenokarzinomen und niemals-Rauchern. Auch als palliative Therapieansätze verbesserten Gefitinib und Erlotinib die Lebensqualität, indem sie die Zeit bis zum Einsetzen von Symptomen verlängerten (Husten, Dyspnoe und Schmerzen) (Bezjak et al. 2006). Im November 2004 wurde daher von der FDA und im Oktober von der European Medicines Evaluation Agency (EMA) Erlotinib für die Therapie der 2. und 3. Wahl bei Chemotherapie-resistentem NSCLC zugelassen. Einige Hypothesen warum Erlotinib in der BR.21 besser als Gefitinib in der ISEL Studie war wurden bereits vorgestellt. Die plausibelste ist, dass Erlotinib in der maximal tolerierten Dosierung eingesetzt wurde und Gefitinib in einer viel geringeren (Blackhall et al. 2006).

In präklinischen Analysen wurde gezeigt, dass EGFR-Antagonisten die anti-Tumoraktivität von zytotoxischen Substanzen erhöhen. Daraufhin wurden vier Phase 3, doppel-blind, Placebo-kontrollierte und randomisierte Studien initiiert. Hier wurde die Kombination von Erlotinib oder Gefitinib mit einer Standardchemotherapie (zwei verschiedene Platin-basierten Chemotherapieregimen) als primäre Therapie eingesetzt. Keine dieser Studien zeigte eine Verbesserung der Überlebensrate, Ansprechrate oder Tumorprogression durch eine zusätzliche Therapie mit einem EGFR-Antagonist (Gatzemeier et al. 2007, Giaccone et al. 2004, Herbst et al. 2004, Herbst et al. 2005). Ein möglicher Grund für dieses frustrierende Ergebnis könnte darin liegen, dass das Patientenkollektiv in allen Studien ungefiltert war (Dancey und Freidlin 2003). In einer retrospektiven Subgruppen-Analyse zeigte sich jedoch eine Verbesserung durch die zusätzliche Gabe von Erlotinib zu Carboplatin oder Paclitaxel in der Überlebensrate bei niemals-Rauchern (Herbst et al. 2005).

Cetuximab in der Therapie von NSCLC

Cetuximab hat relativ wenige, meist unspezifische Nebenwirkungen, wie Hauttoxizität (Rötung, Akne-ähnliches Exanthem und Follikulitis), Fieber mit Schüttelfrost, Asthenie, vorübergehend erhöhte Transaminasen und Übelkeit. Circa 1,5% aller Patienten zeigen allergische Reaktionen nach der Infusion von Cetuximab, so dass sich eine weitere Therapie verbietet.

Als Monotherapie ist Cetuximab nur wenig effektiv, in Kombination mit Platin-basierten Therapieregimen ist es jedoch recht vielversprechend, wie einige Phase 2 Studien in der Therapie von NSCLC gezeigt haben (Belani CP 2007, Butts CA 2007, Herbst RS 2007, Rosell et al. 2008, Rossi et al. 2006). Eine große, multizentrische, randomisierte Phase 3 Studie in der die Kombination von Cetuximab mit der etablierten Platin-basierten Chemotherapie (Cisplatin und Binorelbine) untersucht wurde, wurde kürzlich beendet. Für eine weitere Einschätzung der Bedeutung von Cetuximab in der Therapie von NSCLC müssen die Ergebnisse dieser Studie abgewartet werden.

Prädiktive Diagnostik

Da nur eine kleine Subgruppe von Patienten mit NSCLC von einer Therapie mit EGFR-Antagonisten profitierten, ist es von essentieller Bedeutung, klinische und molekular-pathologische Marker zu identifizieren welche prädiktiv für Ihre Wirksamkeit sind. Hierfür müssen die klinischen Merkmale, aber vor allem auch die Pathomechanismen, welche diese

Patienten-Subgruppe ausmachen, erkannt werden. Hiermit haben sich bereits mehrere Studien beschäftigt, diese Arbeit hat aber erstmals EGFR-Mutationen mit EGFR-Phosphorylierungsmustern und Aktivierung von EGFR-Signaltransduktionswegen untersucht.

Klinische und pathologische Prädiktoren

Die meisten klinischen Studien mit Gefitinib und Erlotinib in der Therapie von NSCLC suggerieren, dass Frauen, Patienten mit asiatischem ethnischen Hintergrund, niemals-Raucher und histomorphologische Adenokarzinome potentielle Prädiktoren für die Effektivität von EGFR-Antagonisten sind (Karamouzis et al. 2007, Miller et al. 2004, Sridhar et al. 2003). Interessanterweise ist das Auftreten von toxischen Hautveränderungen, wie dem Akne-ähnlichen Exanthem, und deren Intensität das wichtigste klinische Korrelat für die Wirksamkeit von EGFR-Antagonisten. Es besteht sogar ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen diesen Hauterscheinungen, Rezidivfreiheit und Überlebensrate. In fast allen Studien mit Erlotinib, Cetuximab und Panitumumab in der Therapie vom NSCLC, Kolonkarzinom, plattenepitheliales Mundbodenkarzinom und Pankreaskarzinom wurde dieses Phänomen beobachtet (Cunningham et al. 2004, Lenz et al. 2006, Wacker et al. 2007).

EGFR-Expression

Die semi-quantitative Analyse der EGFR-Expression mittels Immunhistochemie war der erste untersuchte Biomarker für die Effektivität von EGFR-Antagonisten. Die meisten Studien konnten allerdings keine Korrelation zwischen EGFR-Expression und klinischer Wirksamkeit einer anti-EGFR-Therapie nachweisen (Galizia et al. 2007, Saltz L 2001). Es wurde sogar gezeigt, dass Cetuximab klinisch relevante Effekte bei EGFR-negativen Kolonkarzinomen zeigt (Chung et al. 2005). In einer Phase 2 Studie mit Panitumumab und metastasiertem Kolonkarzinom war die Wirksamkeit von Panitumumab komplett unabhängig vom EGFR-Expressionsprofil (Hecht J 2006). Auch in unserer Untersuchung war die EGFR-Expression unabhängig vom Mutationsstatus. Zusammengefasst ist die EGFR-Expression kein geeigneter Indikator für die Identifizierung von Patienten welche von einer anti-EGFR-Therapie profitieren.

Somatische EGFR-Mutationen

Die Entdeckung, dass spezifische Mutationen in der Tyrosinkinase und der ATP-bindenden Domäne des EGFR-Gens mit der Effektivität von EGFR-TKI in NSCLC assoziiert sind, hat unser Verständnis von der Wirksamkeit der EGFR-Antagonisten deutlich verbessert. Zum ersten Mal wurde eine realisierbare Patienten-Selektionsmethode beschrieben und ein Pathomechanismus einer Subgruppe des NSCLC dargestellt. Circa 90% aller EGFR-Mutationen betreffen einen

kleinen Bereich des EGFR-Gens von Exon 18 bis 24. Die häufigste Mutation ist eine Deletion ohne Rasterverschiebung in Exon 19 und betrifft die Codons 746 bis 750 (circa 45-50% aller EGFR-Mutationen). Auch in unsere Studie haben wir bei sechs Patienten Mutationen in Exon 19 gefunden (50% der gefundenen EGFR-Mutationen). Die zweithäufigste EGFR-Mutation (30-35% aller EGFR-Mutationen) ist eine Missense-Mutation im Exon 21. Sie resultiert meistens in einer Substitution von Leucin durch Arginin an Codon 858 (Sharma et al. 2007). In unserem Kollektiv fanden wir vier Mutationen in Exon 21 (33%).

Die EGFR-Mutationsrate beim NSCLC variiert nach Ethnizität: in einem unselektierten kaukasischen Patientenkollektiv findet man bei 5-15% und in einem unselektierten asiatischen Kollektiv bei 25-35% der Patienten Mutationen im EGFR-Gen. Insgesamt hatten 12 von unseren 67 Patienten (18%) Mutationen im EGFR-Gen. Elf waren west-europäischer und einer asiatischer Herkunft. Alle diese Mutationen werden fast ausschließlich beim NSCLC gefunden und nur extrem selten bei anderen Tumorentitäten.

EGFR-Mutationen korrelieren mit klinischen und molekular-pathologischen Charakteristika: dem histologischen Adenokarzinom insbesondere dem bronchiolo-alveolären Karzinom, fehlender Raucheranamnese, fehlende K-RAS Mutationen, asiatischer Herkunft und weiblichem Geschlecht (Nomura et al. 2007, Sakuma et al. 2007, Sequist et al. 2007, Shigematsu et al. 2005). Auch in unserer Studie traten EGFR-Mutationen gehäuft bei Frauen und Adenokarzinomen auf. Allerdings waren 55% unserer Patienten mit EGFR-Mutationen Raucher und 22% Ex-Raucher. Im Kontrast hierzu gibt es Studien, welche gezeigt haben, dass sich die Wahrscheinlichkeit von EGFR-Mutationen mit zunehmender Tabakexposition verringert. Übereinstimmend wird aber vermutet, dass Lungenkrebs bei niemals-Rauchern eine eigene Tumorentität darstellt, welche durch EGFR-Mutationen verursacht wird und sensibel auf EGFR-TKI reagiert (Pham et al. 2006, Toh et al. 2006). Unser Kollektiv widerspricht dem zwar, ist aber durch seine geringe Größe für solche phänotypischen Charakterisierungen nicht geeignet.

Die Assoziation zwischen EGFR-Mutationen und der Wirksamkeit von den EGFR-TKI Gefitinib und Erlotinib wurde auch in mehreren retrospektiven klinischen Untersuchungen verifiziert (Sharma et al. 2007). Es wurde deshalb postuliert, dass sie mit einer verbesserten Überlebensrate korreliert. Die BR.21 Studie zeigte allerdings, dass der Überlebensvorteil durch eine Erlotinib-Therapie nicht unbedingt mit dem EGFR-Mutationsstatus übereinstimmt. Daher sind EGFR-Mutationen zwar ein wichtiger, aber nicht der einzige Grund für die Wirksamkeit von EGFR-TKI beim NSCLC.

EGFR-Genkopiezahl

Das EGFR-Gen ist nur sehr selten in menschlichen Neoplasien amplifiziert. FISH-Analysen haben allerdings vermehrt eine erhöhte EGFR-Genkopiezahl in NSCLC, plattenepithelialen Mundbodenkarzinomen und Kolonkarzinomen gezeigt. Eine balancierte Polysomie kommt in 25-40% dieser Tumortypen vor. In einer Phase 2 Studie für die Behandlung von fortgeschrittenem chemotherapierefraktären NSCLC mit Gefitinib wurde erstmals eine signifikant erhöhte Ansprechrate von Gefitinib und verbesserte Überlebensrate bei Tumoren mit EGFR-Amplifikationen gezeigt (Cappuzzo et al. 2005). In der BR.21 Studie hatten Patienten mit FISH-positiven Tumoren (circa 40%) die Erlotinib erhalten haben eine signifikante Lebensverlängerung verglichen mit der FISH-positiven Placebo-Gruppen. Patienten mit FISH-negativen Tumoren hatten keinen Überlebensvorteil (Tsao et al. 2005). Die ISEL Studie erbrachte ähnliche Ergebnisse; Patienten mit FISH-positiven Tumoren die Gefitinib erhielten hatten eine verbesserte Ansprechrate und lebten länger als Patienten der Placebo-Gruppe. Kein Unterschied war bei FISH-negativen Patienten nachweisbar, unabhängig von der Behandlung (Hirsch et al. 2006). Die INTEREST (Iressa Non-Small-Cell Cancer Trial Evaluating Response and Survival against Taxotene) Phase 3 Studie konnte allerdings keinen Effekt der EGFR-Genkopiezahl auf Tumorprogression oder Überleben in der Gefitinib-Gruppe demonstrieren (Perez-Soler et al. 2004).

Der prädiktive Wert der EGFR-Genkopiezahl wurde auch schon bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom in einer Serie retrospektiver Analysen evaluiert. Der erste Bericht über eine Korrelation zwischen EGFR-Amplifikation und Ansprechen von Cetuximab oder Panitumumab bezieht sich auf eine kleine Patientenkohorte (31 Patienten) mit fortgeschrittenem Chemotherapie-refraktären Kolonkarzinom (Moroni et al. 2005). In einer neuen Untersuchung wurde die EGFR-Genkopiezahl in Tumorproben von Patienten einer Phase 3 Studie bestimmt. Die Studie hat Panitumumab mit den üblichen supportiven Maßnahmen bei fortgeschrittenem Kolonkarzinom verglichen. Patienten in der Panitumumab-Gruppe die eine normale EGFR-Genkopiezahl aufwiesen, hatten eine kürzere progressionsfreie Zeit und eine schlechtere Überlebensrate als Patienten mit EGFR-Amplifikationen (Sartore-Bianchi et al. 2007). In der Gruppe die nur mit den üblichen supportiven Maßnahmen behandelt wurden, war kein Zusammenhang zwischen EGFR-Genkopiezahl und Überlebensrate festzustellen. Dies impliziert, dass die EGFR-Genkopiezahl die Therapieeffektivität prädiziert. Von den 10 untersuchten EGFR-M Proben in unserem Kollektiv war bei allen eine EGFR-Amplifikation

nachweisbar. Auch dies unterstützt die These, dass die EGFR-Genkopiezahl mit der Effektivität von EGFR-Antagonisten korreliert.

Intrinsische Therapieresistenz

Aktivierende Mutationen im K-RAS Gen, welche zu einer EGFR-unabhängigen Aktivierung von MAPK führen, sind in ungefähr 15-30% von Patienten mit NSCLC nachweisbar. Sie sind auch mit einer schlechten Prognose assoziiert. K-RAS Mutationen finden sich vor allem bei Patienten mit einer langen Raucheranamnese (Ahrendt et al. 2001, Rodenhuis et al. 1988). Diese Mutationen betreffen meisten Codon 12 und 13 des Exon 2 vom K-RAS Gen und sind so gut wie nie zusammen mit EGFR-Mutationen vorhanden. Mehrere Studien haben belegt, dass K-RAS-Mutationen mit einer gewissen Resistenz gegen anti-EGFR-Therapien beim NSCLC vergesellschaftet sind. Dies lässt vermuten, dass eine EGFR-unabhängige, konstitutive Aktivierung von K-RAS Signaltransduktionskaskaden mit der Effektivität von EGFR-Antagonisten konkurriert (Benvenuti et al. 2007, De Roock et al. 2008, Eberhard et al. 2005, Han et al. 2006, Khambata-Ford et al. 2007, Lievre et al. 2006, Massarelli et al. 2007, Pao et al. 2005b, Tsao M 2006).

Erworbene Therapieresistenz

Patienten mit NSCLC die initial positiv auf eine Therapie mit Gefitinib oder Erlotinib angesprochen haben, entwickeln gelegentlich eine sekundäre Therapieresistenz. Bei diesen Patienten lassen sich weitere Mutationen im EGFR-Gen nachweisen (Sharma et al. 2007). Die bestuntersuchte dieser sekundären Mutationen befindet sich in Exon 20 des EGFR-Gens und resultiert in der Substitution von Methionin für Threonin an Codon 790 (T790M) (Kobayashi et al. 2005, Kosaka et al. 2006, Pao et al. 2005a). Sie führt zu einer Veränderung der dreidimensionalen Konformation der Tyrosinkinase und verhindert so die Bindung von Gefitinib und Erlotinib an den Rezeptor (Yun et al. 2007).

Eine Amplifikation des MET Protoonkogens könnte nach den Ergebnissen einer neuen Studie auch an der erworbenen anti-EGFR-Resistenz beteiligt sein (Engelman et al. 2007). Die MET-Amplifikation führt zu einer EGFR-unabhängigen, aber HER-3 vermittelten Aktivierung des PI3K-Akt Signaltransduktionsweges. In Zellkulturexperimenten konnte eine MET-Amplifikation-induzierte sekundäre Gefitinib-Resistenz durch spezifische MET-Inhibition die Wirksamkeit von Gefitinib wiederherstellen.

Molekularpathologische Bedeutung von EGFR-Mutationen

Der EGFR wird nach Ligandenbindung aktiviert und es kommt zur Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten. Studien an Zelllinien mit den bekannten Mutationen im EGFR-Gen haben gezeigt, dass diese Mutationen zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen (Lynch et al. 2004, Paez et al. 2004). Meine Ergebnisse bestätigen, dass EGFR-Mutationen mit einer vermehrten EGFR-Phosphorylierung in menschlichen NSCLC-Resektaten korrelieren. Allerdings zeigten meine Untersuchungen ein anderes Phosphorylierungsmuster. In EGFR-mutierten Epithelzelllinien wurden vor allem Tyr-992 und Tyr-1068, aber nicht Tyr-1173 Phosphorylierung gezeigt (Sordella et al. 2004). Wir haben in unseren Tumorsektaten aber vor allem eine Phosphorylierung von Tyr-992 und Tyr-1173, aber nicht Tyr-1068 gefunden. Die unterschiedlichen Befunde in Zellkultursystemen und primären Tumorsektaten sind funktionell bedeutsam, weil unterschiedliche Phosphorylierungsmuster verschiedene Signaltransduktionswege initiieren. Wir haben daher die Aktivität der drei wichtigsten Signaltransduktionskaskaden des EGFR analysiert. Alle drei zeigen eine vermehrte Aktivität bei EGFR-M Tumorproben. Den deutlichsten Effekt haben wir allerdings bei Akt gefunden. Die vermehrte Phosphorylierung von Akt wird auch in Zellkulturen beobachtet (Sordella et al. 2004) und wahrscheinlich durch P-Tyr-992 vermittelt.

Zelllinien mit mutiertem EGFR haben höhere Konzentrationen von P-Tyr-705 Stat3 als entsprechende Zellen ohne Mutationen. Durch eine Stimulation mit EGF kann diese weiter gesteigert werden. Spezifische JAK2- und Src-Inhibitoren beeinflussen diese Erhöhung jedoch nicht, daher wird sie wahrscheinlich durch eine noch unbekannte Kinase vermittelt. Noch wichtiger ist, dass Gefitinib die erhöhte basale Konzentration nicht senken konnte. Dies impliziert, dass die konstitutive Tyr-705 Phosphorylierung von Stat3 unabhängig von der EGFR-Aktivität ist (Alvarez et al. 2006). In unserer Studie waren mehr als sechzig Prozent der Proben P-Tyr-705 Stat3 positiv. Im Gegensatz zu Studien an Zellkulturen fanden wir keinen signifikanten Unterschied zwischen EGFR-WT und EGFR-M Fällen. Stat3-Phosphorylierung war auch unabhängig von der EGFR-Aktivität. Zusammengefasst implizieren diese Ergebnisse, dass die Stat3-Phosphorylierung in der Pathogenese von NSCLC eine wichtige, aber vom EGFR unabhängige Rolle spielt.

Wie auch in anderen Studien (Cappuzzo et al. 2004), war in unserem Kollektiv bei circa 25% der Proben die MAPK, unabhängig von EGFR-Mutationen phosphoryliert. Die MAPK-Aktivität zeigte allerdings eine starke Korrelation mit einer Phosphorylierung des EGFR an Tyr-992. Interessanterweise war die MAPK-Aktivität in EGFR-M Proben nicht erhöht, obwohl sie eine

vermehrte Phosphorylierung von Tyr-992 aufweisen. Wahrscheinlich ist die Aktivierung von MAPK via EGFR P-Tyr-992 nur in EGFR-WT NSCLC von Bedeutung. Diese Befunde unterstützen weiter, dass EGFR-Mutationen nicht nur die EGFR-Kinaseaktivität erhöhen sondern auch eine differenzierte Signaltransduktion einleiten.

Klinische Bedeutung von EGFR-Mutationen

Wie bereits ausführlich erläutert ist die Wirksamkeit von EGFR-TKI auf eine Subgruppe von Patienten mit NSCLC beschränkt. Um unnötige Therapieveruche und die damit verbundenen Nebenwirkungen zu vermeiden, ist es essentiell diese Patienten aus dem Gesamtkollektiv zu filtern. Da aufwendige Sequenzierungen teuer sind und nur von wenigen pathologischen Instituten angeboten werden, ist es um so wichtiger andere geeignete Filterkriterien zu identifizieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass relativ einfache und schnelle immunhistochemische Untersuchungen, wie sie an den meisten pathologischen Instituten täglich durchgeführt werden, stark mit EGFR-Mutationen korrelieren. Die Kombination dieser immunhistologischen Färbungen ermöglicht deshalb eine gute Charakterisierung des Tumors und könnte ggf. Patienten identifizieren welche von EGFR-Antagonisten profitieren.

Weiterhin ist die Identifizierung von Tumor-Pathomechanismen für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien essentiell. Eine gezielte anti-Tumorthherapie hat in der Regel weniger unspezifische Nebenwirkungen bei besserem klinischen Erfolg. Für die Entwicklung neuer EGFR-Antagonisten müssen die intrinsischen und erworbenen Resistenzen berücksichtigt werden. Möglicherweise könnten spezifische Inhibitoren von P-Tyr-992 und P-Tyr-1173 neue Ansatzpunkte darstellen. Auch viel versprechend sind Antagonisten der Signaltransduktionskaskaden des EGFR. Akt-Inhibitoren sind hierfür sehr gute Kandidaten und bereits für Therapie von Krebs und Arthritis in der klinischen Entwicklung (Li 2007).

Zusammenfassung

Neue Studien haben gezeigt, dass die Wirksamkeit der niedermolekularen EGFR-Antagonisten Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®) in der Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) auf Mutationen im EGFR-Gen zurückzuführen ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von EGFR-Mutationen auf die Aktivität des Rezeptors und seiner Signaltransduktionswege zu charakterisieren. Dazu wurden hier, zum ersten Mal die Aktivierungsmuster des EGFR und seinen drei wichtigsten Signaltransduktionskaskaden umfassend in NSCLC-Tumorresektaten analysiert. Das Verständnis der molekularbiologischen Pathomechanismen dieser Tumorsubgruppen ist für die Verbesserung vorhandener Tyrosinkinaseinhibitoren, Entwicklung neuer Therapiestrategien und der Patientenselektion von entscheidender Bedeutung.

Zunächst wurden die Exone 18, 19 und 21 des EGFR von 67 NSCLC-Proben sequenziert. Insgesamt zeigten sich in 12 Fällen Mutationen im EGFR-Gen. Diese Mutationen traten bevorzugt in Frauen und ausschließlich in Adenokarzinomen auf. Anschließend wurden die funktionellen Konsequenzen dieser Mutationen auf den Aktivierungszustand des EGFR getestet. Die Aktivität des Rezeptors ist von der Phosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste abhängig, die mithilfe spezifischer Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Es zeigte sich, dass alle EGFR-Mutationen zu einer erhöhten EGFR-Aktivität führen. Interessanterweise konnten spezifische EGFR-Phosphorylierungsmuster in den Tumorresektaten identifiziert werden. Vor allem Tyr-992 und Tyr-1173 waren signifikant häufiger phosphoryliert. Da unterschiedliche Phosphorylierungsmuster verschiedene zelluläre Funktionen initiieren, wurde als nächstes die Aktivität der drei wichtigsten EGFR-Signaltransduktionskaskaden untersucht. Nur Akt, aber weder Stat3 noch MAPK war bei Patienten mit Mutationen im EGFR vermehrt phosphoryliert. In nicht-mutierten Tumoren wurde eine Induktion des MAPK Signalweges nach EGFR Tyr-992 Phosphorylierung beobachtet. Schließlich wurde mittels FISH-Analyse gezeigt, dass EGFR-Mutationen vermehrt EGFR-Amplifikationen aufweisen.

Diese Ergebnisse identifizieren Eigenschaften von EGFR-mutierten NSCLC Proben die als Filterkriterien für die Indikation spezifischer Chemotherapien genutzt werden könnten, da die Effektivität von EGFR-Antagonisten mit aktivierenden Mutationen korreliert. Die hier beschriebenen molekularen Pathomechanismen sind auch für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien von Bedeutung.

Literaturverzeichnis

Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, Zhu Yr YR, Sanchez-Cespedes M, Yang SC, Haasler GB, Kajdacsy-Balla A, Demeure MJ und Sidransky D. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2001; 92: 1525-1530

Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK und Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2884-2890

Alberg AJ, Ford JG und Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132: 29S-55S

Alberg AJ und Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123: 21S-49S

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P und Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 1996; 15: 6541-6551

Alvarez JV, Greulich H, Sellers WR, Meyerson M und Frank DA. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2006; 66: 3162-3168

Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, Dong Q, Zhang Q, Gu X, Vijayakrishnan J, Sullivan K, Matakidou A, Wang Y, Mills G, Doheny K, Tsai YY, Chen WV, Shete S, Spitz MR und Houlston RS. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature genetics* 2008; 40: 616-622

Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM und Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997; 272: 31515-31524

Auguin D, Barthe P, Royer C, Stern MH, Noguchi M, Arold ST und Roumestand C. Structural basis for the co-activation of protein kinase B by T-cell leukemia-1 (TCL1) family proto-oncoproteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 35890-35902

Barthwal MK, Sathyanarayana P, Kundu CN, Rana B, Pradeep A, Sharma C, Woodgett JR und Rana A. Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J Biol Chem* 2003; 278: 3897-3902

Baselga J, Rischin D, Ranson M, Calvert H, Raymond E, Kieback DG, Kaye SB, Gianni L, Harris A, Bjork T, Averbuch SD, Feyereislova A, Swaisland H, Rojo F und Albanell J. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4292-4302

Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M und Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular cell* 2003; 11: 11-23

Belani CP RS, Schreeder M, et al. . Phase II study of cetuximab in combination with carboplatin and docetaxel for patients with advanced/ metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2007; 420s

Bellacosa A, Testa JR, Staal SP und Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 1991; 254: 274-277

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

Bezjak A, Tu D, Seymour L, Clark G, Trajkovic A, Zukin M, Ayoub J, Lago S, de Albuquerque Ribeiro R, Gerogianni A, Cyjon A, Noble J, Laberge F, Chan RT, Fenton D, von Pawel J, Reck M und Shepherd FA. Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: quality of life analysis of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3831-3837

Biondi RM, Kieloch A, Currie RA, Deak M und Alessi DR. The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *Embo J* 2001; 20: 4380-4390

Blackhall F, Ranson M und Thatcher N. Where next for gefitinib in patients with lung cancer? *The lancet oncology* 2006; 7: 499-507

- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH und Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663-675
- Brazil DP, Park J und Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 2002; 111: 293-303
- Brodbeck D, Cron P und Hemmings BA. A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* 1999; 274: 9133-9136
- Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD und Darnell JE, Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 7673-7678
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C und Darnell JE, Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98: 295-303
- Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S und Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J* 1999; 18: 664-674
- Burgering BM und Medema RH. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *Journal of leukocyte biology* 2003; 73: 689-701
- Butts CA BD, Middleman EL, et al. . Gemcitabine/platinum alone or in combination with cetuximab as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2007; 394s
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Jr. und Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-655
- Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, Bartolini S, Rossi E, Ludovini V, Gregorc V, Ligorio C, Cancellieri A, Damiani S, Spreafico A, Paties CT, Lombardo L, Calandri C, Bellezza G, Tonato M und Crino L. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1133-1141
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S und Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282: 1318-1321
- Castagnino P, Biesova Z, Wong WT, Fazioli F, Gill GN und Di Fiore PP. Direct binding of eps8 to the juxtamembrane domain of EGFR is phosphotyrosine- and SH2-independent. *Oncogene* 1995; 10: 723-729
- Catlett-Falcone R, Dalton WS und Jove R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer an activator of transcription. *Current opinion in oncology* 1999a; 11: 490-496
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS und Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999b; 10: 105-115
- Chantry A. The kinase domain and membrane localization determine intracellular interactions between epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 1995; 270: 3068-3073
- Chen L, Qi H, Korenberg J, Garrow TA, Choi YJ und Shane B. Purification and properties of human cytosolic folylpolygamma-glutamate synthetase and organization, localization, and differential splicing of its gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 13077-13087
- Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H und Qiu Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2001; 276: 31858-31862
- Chen RH, Abate C und Blenis J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10952-10956
- Chen Z, Ke LD, Yuan XH und Adler-Storthz K. Correlation of cisplatin sensitivity with differential alteration of EGFR expression in head and neck cancer cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 899-902
- Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN und Testa JR. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 9267-9271
- Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y und Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 1996; 272: 719-722
- Cho HS und Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 2002; 297: 1330-1333

- Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP und Saltz LB. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-1810
- Ciardello F und Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970
- Coffer PJ und Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *European journal of biochemistry / FEBS* 1991; 201: 475-481
- Collins BJ, Deak M, Arthur JS, Armit LJ und Alessi DR. In vivo role of the PIF-binding docking site of PDK1 defined by knock-in mutation. *Embo J* 2003; 22: 4202-4211
- Conus NM, Hannan KM, Cristiano BE, Hemmings BA und Pearson RB. Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 38021-38028
- Corbit KC, Foster DA und Rosner MR. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4209-4218
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M und Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378: 785-789
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I und Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
- Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J und Cohen P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 1998; 273: 1496-1505
- Dancey JE und Freidlin B. Targeting epidermal growth factor receptor--are we missing the mark? *Lancet* 2003; 362: 62-64
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y und Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-241
- de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW und Koenderman L. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3: 299-305
- De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E und Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008; 19: 508-515
- Deak M, Clifton AD, Lucocq LM und Alessi DR. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J* 1998; 17: 4426-4441
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R und Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278: 687-689
- Du K, Herzig S, Kulkarni RN und Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003; 300: 1574-1577
- Du K und Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 1998; 273: 32377-32379
- Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Janne PA, Januario T, Johnson DH, Klein P, Miller VA, Ostland MA, Ramies DA, Sebisanovic D, Stinson JA, Zhang YR, Seshagiri S und Hillan KJ. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5900-5909
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC und Janne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316: 1039-1043
- Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K und Matsumoto K. Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Molecular reproduction and development* 1995; 42: 477-485
- Felton-Edkins ZA, Fairley JA, Graham EL, Johnston IM, White RJ und Scott PH. The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. *Embo J* 2003; 22: 2422-2432
- Ferguson KM, Kavran JM, Sankaran VG, Fournier E, Isakoff SJ, Skolnik EY und Lemmon MA. Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Molecular cell* 2000; 6: 373-384

- Ferrell JE, Jr. How responses get more switch-like as you move down a protein kinase cascade. *Trends in biochemical sciences* 1997; 22: 288-289
- Ferrell JE, Jr. Building a cellular switch: more lessons from a good egg. *Bioessays* 1999; 21: 866-870
- Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B und Van Obberghen E. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4989-5000
- Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE und Cobb MH. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo J* 1997; 16: 6426-6438
- Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP und Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2237-2246
- Galizia G, Lieto E, De Vita F, Orditura M, Castellano P, Troiani T, Imperatore V und Ciardiello F. Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3654-3660
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW und Ward CW. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002; 110: 763-773
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Frenkel MJ, Bentley JD, Lovrecz GO, Elleman TC, Cosgrove LJ und Ward CW. Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature* 1998; 394: 395-399
- Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, Kaukel E, Roubec J, De Rosa F, Milanowski J, Karnicka-Mlodkowski H, Pesek M, Serwatowski P, Ramlau R, Janaskova T, Vansteenkiste J, Strausz J, Manikhas GM und Von Pawel J. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1545-1552
- Ge G, Wu J, Wang Y und Lin Q. Activation mechanism of solubilized epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 2002; 290: 914-920
- Gee JM, Willsher PC, Kenny FS, Robertson JF, Pinder SE, Ellis IO und Nicholson RI. Endocrine response and resistance in breast cancer: a role for the transcription factor Fos. *Int J Cancer* 1999; 84: 54-61
- Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, Von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemeier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A und Johnson DH. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004; 22: 777-784
- Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH und Shaw PE. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *Embo J* 1995; 14: 951-962
- Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y und Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 1299-1303
- Groenen LC, Walker F, Burgess AW und Treutlein HR. A model for the activation of the epidermal growth factor receptor kinase involvement of an asymmetric dimer? *Biochemistry* 1997; 36: 3826-3836
- Grunwald V und Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 851-867
- Gupta P und Prywes R. ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced c-jun expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 50550-50556
- Gupta S, Seth A und Davis RJ. Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 3216-3220
- Han DC, Shen TL und Guan JL. The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene* 2001; 20: 6315-6321
- Han SW, Kim TY, Jeon YK, Hwang PG, Im SA, Lee KH, Kim JH, Kim DW, Heo DS, Kim NK, Chung DH und Bang YJ. Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2538-2544
- He C, Hobert M, Friend L und Carlin C. The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. *J Biol Chem* 2002; 277: 38284-38293

Hecht J ME, Baranda J, et al. Panitumumab antitumor activity in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) expressing low (1-9%) or negative (<1%) levels of epidermal growth factor receptor (EGFr). . J Clin Oncol 2006; 157s

Herbst RS CK, Kelly K, et al. . A phase II randomized selection trial evaluating concurrent chemotherapy plus cetuximab or chemotherapy followed by cetuximab in patients with advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC): final report of SWOG 0342. J Clin Oncol 2007; 395s

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Olliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A und Johnson DH. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. J Clin Oncol 2004; 22: 785-794

Herbst RS, Maddox AM, Rothenberg ML, Small EJ, Rubin EH, Baselga J, Rojo F, Hong WK, Swaisland H, Averbuch SD, Ochs J und LoRusso PM. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. J Clin Oncol 2002; 20: 3815-3825

Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A, Kris MG, Tran HT, Klein P, Li X, Ramies D, Johnson DH und Miller VA. 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, Eckhardt SG, Tolcher A, Britten CD, Denis L, Ferrante K, Von Hoff DD, Silberman S und Rowinsky EK. 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

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira JR, Ciuleanu T, von Pawel J, Watkins C, Flannery A, Ellison G, Donald E, Knight L, Parums D, Botwood N und Holloway B. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2006; 24: 5034-5042

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Friedman HS, Werner MH, Bigner DD und Bigner SH. Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts. Cancer Res 1988; 48: 2231-2238

Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Chen C, Goodman G, Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Cassidy A, McLaughlin J, Liu G, Narod S, Krokan HE, Skorpen F, Elvestad MB, Hveem K, Vatten L, Linseisen J, Clavel-Chapelon F, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Martinez C, Bingham S, Rasmuson T, Hainaut P, Riboli E, Ahrens W, Benhamou S, Lagiou P, Trichopoulos D, Holcatova I, Merletti F, Kjaerheim K, Agudo A, Macfarlane G, Talamini R, Simonato L, Lowry R, Conway DI, Znaor A, Healy C, Zelenika D, Boland A, Delepine M, Foglio M, Lechner D, Matsuda F, Blanche H, Gut I, Heath S, Lathrop M und Brennan P. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. Nature 2008; 452: 633-637

Hynes NE und Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. Nature reviews 2005; 5: 341-354

Jahn T, Seipel P, Urschel S, Peschel C und Duyster J. Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt. Mol Cell Biol 2002; 22: 979-991

Jett JR, Scott WJ, Rivera MP und Sause WT. Guidelines on treatment of stage IIIB non-small cell lung cancer. Chest 2003; 123: 221S-225S

Johnson GL und Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 2002; 298: 1911-1912

Jones PF, Jakubowicz T und Hemmings BA. Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. Cell regulation 1991a; 2: 1001-1009

Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F und Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. Proc Natl Acad Sci U S A 1991b; 88: 4171-4175

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D und Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. Curr Biol 1999; 9: 601-604

Karamouzis MV, Grandis JR und Argiris A. Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. Jama 2007; 298: 70-82

Karni R, Jove R und Levitzki A. Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. Oncogene 1999; 18: 4654-4662

Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA, 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA und Mauro DJ. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3230-3237

Kil SJ und Carlin C. EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments. *Journal of cellular physiology* 2000; 185: 47-60

Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF und Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 893-901

Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, Hibi M und Hirano T. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *The Journal of experimental medicine* 1999; 189: 63-73

Knauf U, Tschopp C und Gram H. Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5500-5511

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG und Halmos B. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005; 352: 786-792

Kohda D, Odaka M, Lax I, Kawasaki H, Suzuki K, Ullrich A, Schlessinger J und Inagaki F. A 40-kDa epidermal growth factor/transforming growth factor alpha-binding domain produced by limited proteolysis of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 1976-1981

Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Takemura Y, Kuroda S, Ono Y und Kikkawa U. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS letters* 1997; 410: 493-498

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, Tada H, Kuwano H und Mitsudomi T. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5764-5769

Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ, Jr., Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ und Kay AC. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *Jama* 2003; 290: 2149-2158

Kwatra MM, Bigner DD und Cohn JA. The ligand binding domain of the epidermal growth factor receptor is not required for receptor dimerization. *Biochimica et biophysica acta* 1992; 1134: 178-181

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A und Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997; 11: 847-862

Lacouture ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nature reviews* 2006; 6: 803-812

Laine J, Kunstle G, Obata T, Sha M und Noguchi M. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Molecular cell* 2000; 6: 395-407

Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM und Schlessinger J. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *Embo J* 1997; 16: 281-294

Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ und Rowinsky EK. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4914-4921

Lewis TS, Shapiro PS und Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research* 1998; 74: 49-139

Li H und Villalobo A. Evidence for the direct interaction between calmodulin and the human epidermal growth factor receptor. *Biochem J* 2002; 362: 499-505

Li Q. Recent progress in the discovery of Akt inhibitors as anticancer agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2007; 17: 1077-1130

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P und Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer cell* 2005; 7: 301-311

Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP und Lambricht DG. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Molecular cell* 2000; 6: 385-394

Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F und Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3992-3995

- LoRusso PM, Herbst RS, Rischin D, Ranson M, Calvert H, Raymond E, Kieback D, Kaye S, Gianni L, Harris A, Bjork T, Maddox AM, Rothenberg ML, Small EJ, Rubin EH, Feyereislova A, Heyes A, Averbuch SD, Ochs J und Baselga J. Improvements in quality of life and disease-related symptoms in phase I trials of the selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in non-small cell lung cancer and other solid tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2040-2048
- 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 und 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: 2129-2139
- Maira SM, Galetic I, Brazil DP, Kaech S, Ingley E, Thelen M und Hemmings BA. Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* 2001; 294: 374-380
- Malden LT, Novak U, Kaye AH und Burgess AW. Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1988; 48: 2711-2714
- Marais R, Wynne J und Treisman R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 1993; 73: 381-393
- Martin-Nieto J und Villalobo A. The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry* 1998; 37: 227-236
- Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, Bekele BN, Herbst RS und Wistuba, II. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2890-2896
- Masui H, Kawamoto T, Sato JD, Wolf B, Sato G und Mendelsohn J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984; 44: 1002-1007
- Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Albanese C, Downward J, Pestell RG und Kanakura Y. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *Embo J* 1999; 18: 1367-1377
- Mayo LD und Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11598-11603
- Mendelsohn J und Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2787-2799
- Miller VA, Kris MG, Shah N, Patel J, Azzoli C, Gomez J, Krug LM, Pao W, Rizvi N, Pizzo B, Tyson L, Venkatraman E, Ben-Porat L, Memoli N, Zakowski M, Rusch V und Heelan RT. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1103-1109
- Mineo C, Gill GN und Anderson RG. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem* 1999; 274: 30636-30643
- Moriki T, Maruyama H und Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *Journal of molecular biology* 2001; 311: 1011-1026
- Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S und Bardelli A. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *The lancet oncology* 2005; 6: 279-286
- Moule SK, Welsh GI, Edgell NJ, Foulstone EJ, Proud CG und Denton RM. Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms. *J Biol Chem* 1997; 272: 7713-7719
- Nebreda AR und Gavin AC. Perspectives: signal transduction. Cell survival demands some Rsk. *Science* 1999; 286: 1309-1310
- Niho S IY, Tamura T, et al. Results of a randomized phase III study to compare the overall survival of gefitinib versus docetaxel in Japanese patients with non-small cell lung cancer who failed one or two chemotherapy regimens. *J Clin Oncol* 2007; 25: 387s
- Nomura M, Shigematsu H, Li L, Suzuki M, Takahashi T, Estess P, Siegelman M, Feng Z, Kato H, Marchetti A, Shay JW, Spitz MR, Wistuba, II, Minna JD und Gazdar AF. Polymorphisms, mutations, and amplification of the EGFR gene in non-small cell lung cancers. *PLoS medicine* 2007; 4: e125
- Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR und Salomon DS. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocrine-related cancer* 2003; 10: 1-21

- Northwood IC, Gonzalez FA, Wartmann M, Raden DL und Davis RJ. Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669. *J Biol Chem* 1991; 266: 15266-15276
- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M und Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002; 110: 775-787
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE und Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500
- Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG und Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS medicine* 2005a; 2: e73
- Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG und Varmus HE. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS medicine* 2005b; 2: e17
- Pap M und Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 1998; 273: 19929-19932
- Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S und Jorcano JL. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7449-7459
- Park HS, Kim MS, Huh SH, Park J, Chung J, Kang SS und Choi EJ. Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. *J Biol Chem* 2002; 277: 2573-2578
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ und Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J* 1991; 10: 885-892
- Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, Russo G, Tschlis P und Croce CM. Tc1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3028-3033
- Perez-Garcia MJ, Cena V, de Pablo Y, Llovera M, Comella JX und Soler RM. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 6132-6142
- Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, Rigas J, Clark GM, Santabarbara P und Bonomi P. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3238-3247
- Peterson RT und Schreiber SL. Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr Biol* 1999; 9: R521-524
- Pham D, Kris MG, Riely GJ, Sarkaria IS, McDonough T, Chuai S, Venkatraman ES, Miller VA, Ladanyi M, Pao W, Wilson RK, Singh B und Rusch VW. Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1700-1704
- Porebska I, Harlozinska A und Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol* 2000; 21: 105-115
- Price MA, Rogers AE und Treisman R. Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *Embo J* 1995; 14: 2589-2601
- Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR und Klein JB. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 27828-27835
- Ranson M, Hammond LA, Ferry D, Kris M, Tullo A, Murray PI, Miller V, Averbuch S, Ochs J, Morris C, Feyereislova A, Swaisland H und Rowinsky EK. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2240-2250
- Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM und Thompson CB. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7315-7328
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Current opinion in oncology* 1999; 11: 68-75
- Remy I und Michnick SW. Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1493-1504
- Rigby AC, Grant CW und Shaw GS. Solution and solid state conformation of the human EGF receptor transmembrane region. *Biochimica et biophysica acta* 1998; 1371: 241-253

- Robinson LA, Ruckdeschel JC, Wagner H, Jr. und Stevens CW. Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132: 243S-265S
- Robinson LA, Wagner H, Jr. und Ruckdeschel JC. Treatment of stage IIIA non-small cell lung cancer. *Chest* 2003; 123: 202S-220S
- Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC und Bos JL. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 1988; 48: 5738-5741
- Rosell R, Robinet G, Szczesna A, Ramlau R, Constenla M, Mennequier BC, Pfeifer W, O'Byrne KJ, Welte T, Kolb R, Pirker R, Chemaissani A, Perol M, Ranson MR, Ellis PA, Pilz K und Reck M. Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2008; 19: 362-369
- Rossi A, Maione P und Gridelli C. Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 59: 139-149
- Sable CL, Filippa N, Hemmings B und Van Obberghen E. cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. *FEBS letters* 1997; 409: 253-257
- Sakuma Y, Matsukuma S, Yoshihara M, Nakamura Y, Noda K, Nakayama H, Kameda Y, Tsuchiya E und Miyagi Y. Distinctive evaluation of nonmucinous and mucinous subtypes of bronchioloalveolar carcinomas in EGFR and K-ras gene-mutation analyses for Japanese lung adenocarcinomas: confirmation of the correlations with histologic subtypes and gene mutations. *American journal of clinical pathology* 2007; 128: 100-108
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F und Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183-232
- Saltz L RM, Hochster H, et al. . Cetuximab (IMC-C225) plus irinotecan (CPT-11) is active in CPT-11-refractory colorectal cancer (CRC) that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 3a
- Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M und Siena S. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3238-3245
- Schlessinger J. Dynamics of hormone receptors on cell membrane. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1981; 366: 274-284
- Schonwasser DC, Marais RM, Marshall CJ und Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 790-798
- Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B und Pisters K. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132: 234S-242S
- Scott WJ, Howington J und Movsas B. Treatment of stage II non-small cell lung cancer. *Chest* 2003; 123: 188S-201S
- Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ und Haber DA. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 587-595
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J und Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews* 2007; 7: 169-181
- Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P und Seymour L. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 123-132
- Sherr CJ und Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-1512
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba, II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD und Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 339-346
- Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M und Hirano T. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 1999; 11: 709-719
- Simpson L und Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001; 264: 29-41

- Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ und Jove R. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* 2000; 19: 5419-5427
- Slieker LJ, Martensen TM und Lane MD. Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. Glycosylation-dependent acquisition of ligand binding activity occurs post-translationally in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1986; 261: 15233-15241
- Smythe WR. Treatment of stage I and II non-small-cell lung cancer. *Cancer Control* 2001; 8: 318-325
- Smythe WR. Treatment of stage I non-small cell lung carcinoma. *Chest* 2003; 123: 181S-187S
- Sobin LH und Wittekind CL. TNM classification of malignant tumors. New York: John Wiley & Sons, 2002
- Sobol RE, Astarita RW, Hofeditz C, Masui H, Fairshtr R, Royston I und Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor expression in human lung carcinomas defined by a monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 403-407
- Socinski MA, Morris DE, Masters GA und Lilenbaum R. Chemotherapeutic management of stage IV non-small cell lung cancer. *Chest* 2003; 123: 226S-243S
- Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI und Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003; 63: 2139-2144
- Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, Mahadevan LC und Arthur JS. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *Embo J* 2003; 22: 2788-2797
- Sordella R, Bell DW, Haber DA und Settleman J. Gefitinib-Sensitizing EGFR Mutations in Lung Cancer Activate Anti-Apoptotic Pathways. *Science* 2004; 1163-1167
- Sridhar SS, Seymour L und Shepherd FA. Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *The lancet oncology* 2003; 4: 397-406
- Stamos J, Sliwkowski MX und Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* 2002; 277: 46265-46272
- Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI und Moss T. An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Molecular cell* 2001; 8: 1063-1073
- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J und Hawkins PT. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 1998; 279: 710-714
- Stevenson BJ, Rhodes N, Errede B und Sprague GF, Jr. Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. *Genes Dev* 1992; 6: 1293-1304
- Stoscheck CM und King LE, Jr. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Res* 1986; 46: 1030-1037
- Sung T, Miller DC, Hayes RL, Alonso M, Yee H und Newcomb EW. Preferential inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol* 2000; 10: 249-259
- Tanner KG und Kyte J. Dimerization of the extracellular domain of the receptor for epidermal growth factor containing the membrane-spanning segment in response to treatment with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1999; 274: 35985-35990
- Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, Thongprasert S, Tan EH, Pemberton K, Archer V und Carroll K. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005; 366: 1527-1537
- Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, Stacey SN, Bergthorsson JT, Thorlacius S, Gudmundsson J, Jonsson T, Jakobsdottir M, Saemundsdottir J, Olafsdottir O, Gudmundsson LJ, Bjornsdottir G, Kristjansson K, Skuladottir H, Isaksson HJ, Gudbjartsson T, Jones GT, Mueller T, Gottsater A, Flex A, Aben KK, de Vegt F, Mulders PF, Isla D, Vidal MJ, Asin L, Saez B, Murillo L, Blondal T, Kolbeinsson H, Stefansson JG, Hansdottir I, Runarsdottir V, Pola R, Lindblad B, van Rij AM, Dieplinger B, Haltmayer M, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Matthiasson SE, Oskarsson H, Tyrfinngsson T, Gudbjartsson DF, Gulcher JR, Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Kong A und Stefansson K. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008; 452: 638-642

- Thornberry NA und Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316
- Toh CK, Gao F, Lim WT, Leong SS, Fong KW, Yap SP, Hsu AA, Eng P, Koong HN, Thirugnanam A und Tan EH. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2245-2251
- Toker A und Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 2000; 275: 8271-8274
- Tsao M ZC, Sakurada A, et al. . An analysis of the prognostic and predictive importance of K-ras mutation status in the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group BR.21 study of erlotinib versus placebo in the treatment of non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 365s
- Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J und Shepherd FA. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353: 133-144
- Tyers M, Rachubinski RA, Stewart MI, Varrichio AM, Shorr RG, Haslam RJ und Harley CB. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature* 1988; 333: 470-473
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J und et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984; 309: 418-425
- Wacker B, Nagrani T, Weinberg J, Witt K, Clark G und Cagnoni PJ. Correlation between development of rash and efficacy in patients treated with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in two large phase III studies. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3913-3921
- Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ und Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6195-6206
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG und Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 1997; 16: 1909-1920
- Wen X, Lin HH, Shih HM, Kung HJ und Ann DK. Kinase activation of the non-receptor tyrosine kinase Etk/BMX alone is sufficient to transactivate STAT-mediated gene expression in salivary and lung epithelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 38204-38210
- Wiggin GR, Soloaga A, Foster JM, Murray-Tait V, Cohen P und Arthur JS. MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2871-2881
- Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 241-250
- Wymann MP, Zvelebil M und Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends in pharmacological sciences* 2003; 24: 366-376
- Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, Tamaoki N, Kawamoto T, Taniguchi S und Shibuya M. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 1816-1820
- Yun CH, Boggon TJ, Li Y, Woo MS, Greulich H, Meyerson M und Eck MJ. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer cell* 2007; 11: 217-227

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reinhard Büttner für die Überlassung des Themas, den vielen konstruktiven Ratschlägen und der permanenten Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lukas Heukamp, der mir bei Problemen und Fragen stets mit einer, weit über die vorliegende Arbeit hinausgehende Begeisterung zur Seite stand.

Ich danke auch all meinen Freunden, mit deren Hilfe alles Spaß und Freude macht.

Meiner Freundin Angela danke ich für ihre Geduld und Liebe in all den Jahren.

Zum Schluss möchte ich meiner Schwester Lena, meiner Mama Anne und meinem Papa Andreas herzlichst danken, die mich immer motiviert und begleitet haben und ohne deren Unterstützung ich hier nicht angekommen wäre.