

**Die Rolle von Cytohesinen als zytoplasmatischer  
EGFR-Aktivator in Adenokarzinomen der Lunge**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lisa-Christina Beate Meffert-Keller geb. Meffert

aus Troisdorf

2015

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Lukas Carl Heukamp
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Nicolas Wernert

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.02.2015

Aus dem Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

**Meiner lieben Familie**



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>- 10 -</b>
1.1	Bronchialkarzinome .....	- 10 -
1.2	Epidemiologie .....	- 11 -
1.3	Sozioökonomischer Status .....	- 13 -
1.4	Geographische Verteilung .....	- 13 -
1.5	Ätiologie .....	- 14 -
1.6	Prävention .....	- 15 -
1.7	Morphologie .....	- 16 -
1.8	Aktuelles Staging und Stadieneinteilung .....	- 22 -
1.9	Gegenwärtige, stadiengerechte Therapieoptionen .....	- 25 -
1.9.1.1	Molekulare, zielgerichtete Therapiemöglichkeiten .....	- 29 -
1.10	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) .....	- 36 -
1.10.1	Struktur des EGFR .....	- 37 -
1.10.2	Aktivierung des EGFR durch Ligandenbindung .....	- 38 -
1.10.3	Beeinflussung des EGFR-Signalweges auf molekularer Ebene .....	- 39 -
1.10.4	EGFR-Mutationen und ihre molekularpathologische Bedeutung .....	- 40 -
1.11	Der EGFR und seine Downstream-Faktoren .....	- 42 -
1.11.1	Akt/Proteinkinase B .....	- 42 -
1.11.2	MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinasen .....	- 43 -
1.11.3	Weitere Downstream-Signalwege des EGFR - STAT3 .....	- 45 -
1.12	Cytohesine .....	- 45 -
1.13	Der Cytohesininhibitor SecinH3 .....	- 46 -
1.14	Fragestellung .....	- 48 -

<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>- 49 -</b>
2.1	Tumorproben.....	- 49 -
2.1.1	Routinediagnostik.....	- 49 -
2.1.2	Patienteninformation.....	- 49 -
2.1.3	Patientenkollektiv .....	- 49 -
2.2	Tissue Micro Arrays (TMA).....	- 50 -
2.2.1	Herstellung von Tissue Micro Arrays .....	- 50 -
2.2.2	Problematik der Tissue Micro Arrays.....	- 51 -
2.2.3	Auswertung der Tissue Micro Arrays mit dem Mirax Viewer .....	- 52 -
2.3	Immunhistochemie .....	- 53 -
2.3.1	Antikörper .....	- 54 -
2.3.2	Färbung .....	- 55 -
2.3.3	Auswertung .....	- 57 -
2.3.4	Statistische Auswertung .....	- 57 -
2.4	Zellkulturen.....	- 57 -
2.5	Xenograft-Mausmodell .....	- 58 -
2.6	[ <sup>18</sup> F]FLT-PET Bildgebung .....	- 59 -
2.7	Ki-67-Färbung .....	- 62 -
2.8	TUNEL (= terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end labeling) – Methode .....	- 62 -
2.9	Doppelfärbung mit pEGFR und ARNO.....	- 64 -
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>- 66 -</b>
3.1	Cytohesine sind zytoplasmatische Aktivatoren des EGFR.....	- 67 -
3.2	Die Überexpression von Cytohesinen korreliert mit pEGFR.....	- 69 -
3.3	Die Überexpression von Cytohesinen korreliert mit dem Akt- und Erk1/Erk2-Signalweg.....	- 70 -

3.4	Koexpression von Cytohesinen und pEGFR auf der gleichen Zelle .....	- 72 -
3.5	SecinH3 reduziert das Wachstum von EGFR-abhängigen Bronchialkarzinomzellen.....	- 73 -
3.6	PC9-Xenograft-Tumore zeigen reduzierte Proliferationsaktivität unter SecinH3-Therapie (Ki-67).....	- 75 -
3.7	PC9-Xenograft-Tumore besitzen eine erhöhte Apoptoserate nach SecinH3- Behandlung .....	- 76 -
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>- 78 -</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>- 84 -</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>- 86 -</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>- 90 -</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 92 -</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>- 110 -</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>- 111 -</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AAH</b>	atypical adenomatous hyperplasia, dt.: atypische adenomatöse Hyperplasie
<b>AC</b>	atypical carcinoid, dt.: atypisch karzinoid
<b>ACTH</b>	adrenocorticotropes Hormon
<b>ADH</b>	antidiuretisches Hormon
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AIS</b>	Adenokarzinom in situ
<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>ARF</b>	ADP-Ribosylierungs-Faktor
<b>ASCO</b>	American Society of Clinical Oncology
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>ATS</b>	American Thoracic Society
<b>BAC</b>	bronchiolo-alveoläres Bronchialkarzinom
<b>CDK</b>	cyclin dependant kinase, dt.: Cyclin-abhängige Kinase
<b>CIO</b>	Centrum für Integrierte Onkologie
<b>CIS</b>	carcinoma in situ
<b>CLCGP</b>	Clinical Lung Cancer Genome Project
<b>CR</b>	cystein-reich
<b>DAG</b>	1,2-Diacylglycerol
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DFS</b>	disease free survival = erkrankungsfreies Überleben
<b>DIPNECH</b>	diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>ECOG</b>	Eastern Cooperative Oncology Group
<b>EGF</b>	epidermal growth factor, dt.: epidermaler Wachstumsfaktor
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor, dt.: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<b>EML4-ALK</b>	echinoderm microtube-associated-protein-like 4 gene - anaplastic lymphoma kinase
<b>EPV</b>	Epstein-Barr-Virus
<b>ERS</b>	European Respiratory Society
<b>EURTAC</b>	EUROpean TARceva vs. Chemotherapy
<b>FCS</b>	fetal calf serum, dt.: fetales Kälberserum (= FBS)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>[18F]FDG</b>	2-[18F]-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose
<b>[18F]FLT</b>	3'-Deoxy-3'-[18F]-Fluor-L-Thymidin
<b>GDP</b>	Guanosin-5'-diphosphat
<b>GEF</b>	guanine nucleotide exchange factor
<b>GEKID</b>	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V.
<b>GTP</b>	Guanosin-5'-triphosphat
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HER</b>	human epidermal growth factor receptor
<b>HPF</b>	high power fields
<b>HPV</b>	humaner Papilloma-Virus
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>IASLC</b>	International Association for Study of Lung Cancer



<b>IGFR-1</b>	Insulin-ähnlicher-Wachstumsfaktor-Rezeptor-1
<b>IP3</b>	Inositol-(1,3,5)-Triphosphat
<b>IPASS</b>	Iressa Pan Asia Study
<b>ISEL</b>	Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer
<b>L</b>	Liganden-bindend
<b>LCNEC</b>	large cell neuroendocrine carcinoma, dt.: großzelliges neuroendokrines Karzinom
<b>LDH</b>	Lactatdehydrogenase
<b>LPA</b>	lepidic predominant adenocarcinoma, dt.: lepidisch prädominantes Adenokarzinom
<b>MAPK</b>	mitogenaktivierte Proteinkinase
<b>MIA</b>	minimal invasive adenocarcinoma, dt.: minimalinvasives Adenokarzinom
<b>MTD</b>	maximal tolerierte Dosis
<b>NGM</b>	Network Genomic Medicine
<b>NSCLC</b>	non small cell lung cancer, dt.: nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
<b>NSCLC-NOS</b>	non small cell lung cancer not otherwise specified
<b>NSE</b>	neuronenspezifische Enolase
<b>OS</b>	overall survival, dt.: Gesamtüberleben
<b>PAK</b>	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline, dt.: phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PDK</b>	Phosphoinositid-abhängige Kinase
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomographie
<b>PI-3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
<b>PKB</b>	Proteinkinase B
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PTB</b>	Phosphotyrosin-Binde-Domäne
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog
<b>PTHrP</b>	dem Parathormon verwandtes Peptid, das wie das Parathormon wirkt und zu einem Pseudohyperparathyreoidismus führt
<b>ROI</b>	region of interest
<b>SCLC</b>	small cell lung cancer, dt.: kleinzelliges Bronchialkarzinom
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>TC</b>	typical carcinoid, dt.: typisch karzinoid
<b>TdT</b>	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	transforming growth factor $\alpha$
<b>TMA</b>	tissue microarray
<b>TNM</b>	Tumorausbreitung, Lymphknotenbefall (lymph nodes), Metastasierung
<b>TKI</b>	Tyrosinkinaseinhibitor
<b>TUNEL</b>	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end labeling
<b>UICC</b>	Union for International Cancer Control
<b>VALCSG</b>	Veterans Administration Lung Cancer Study Group
<b>VEGFR</b>	vascular endothelial growth factor, dt.: vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor-Rezeptor
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>ZfKD</b>	Zentrum für Krebsregisterdaten

## 1. Einleitung

### 1.1 Bronchialkarzinome

Das Bronchialkarzinom stellt trotz kontinuierlicher Verbesserung der diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten die häufigste tumorbedingte Todesursache in den westlichen Industrienationen dar und hat damit erhebliche sozioökonomische Folgen. Weltweit ist es die häufigste Krebsart. Jedes Jahr kommen ca. 1,61 Millionen neue Fälle hinzu, dies entspricht 13 % aller Krebsfälle. In Deutschland ist das Bronchialkarzinom mit über 42.000 Sterbefällen im Jahr 2008 die vierthäufigste Todesursache und die häufigste Krebstodesursache (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2012).

Die Lunge wird häufig von primären Lungentumoren sowie Metastasen extrathorakaler Tumore befallen. Bei den primären Lungentumoren werden solche, die dem Bronchialepithel entspringen (95 %), d.h. Bronchialkarzinome, von mesenchymalen Neoplasien (z.B. Fibrosarkome, Leiomyome), Karzinoiden, Tumoren der Bronchialdrüsen, Lymphomen und benignen Läsionen wie Hamartomen unterschieden. Das Bronchialkarzinom ist die maligne Entartung von Zellen der Bronchialschleimhaut.

Mehr als 90 % der Patienten sind bei der Diagnosestellung symptomatisch. Circa ein Drittel dieser Symptome wird direkt durch den Primarius verursacht. Hierbei führen zentral liegende Tumore häufiger und schneller zu klinischen Symptomen als peripher liegende Tumore. Husten, bzw. ein sich änderndes Hustenverhalten z.B. bei COPD-Patienten, ist das am häufigsten beklagte Merkmal, gefolgt von Dyspnoe, Brustschmerzen, Hämoptysen sowie Expektorat eines blutig tingierten Schleims. Bei fortschreitendem intrathorakalen Tumorwachstum können Heiserkeit, eine Läsion des Plexus brachialis, ein Horner-Syndrom und ein Vena-cava-superior-Syndrom auftreten. Ein weiteres Drittel der Symptome wird durch extrathorakale Metastasen verursacht: Knochenschmerzen, Ikterus bei Leberbefall und z.B. Kopfschmerzen, Übelkeit, fokale neurologische Defizite, Krampfanfälle, Verwirrtheit als Zeichen eines ZNS-Befalls. Zusätzlich können axilläre, supraklavikuläre oder zervikale Lymphknotenbefälle tastbar sein. Das letzte Drittel bilden systemische Symptome wie Kachexie, Gewichtsverlust,

Asthenie und paraneoplastisch Syndrome (bis zu 10 %). Hierbei können die Tumore Krankheitserscheinungen bewirken, die nicht direkt durch die physikalischen Effekte des Primarius oder seiner Metastasen bedingt sind. Ursache hierfür sind z.B. Hormone, Zytokine, die durch den Tumor gebildet werden, oder Antikörper, die als Reaktion des Organismus auf die maligne Erkrankung produziert werden. Diese Syndrome können organbezogen oder auch als systemische Phänomene auftreten. Es werden endokrine, neurologische, skelettale, metabolische, hämatologische, dermatologische, renale und kollagenose-vaskulitische Syndrome beschrieben (Kreuter et al., 2008).

## **1.2 Epidemiologie**

Die folgenden Daten sind aus der im Februar 2012 erschienen Publikation "Krebs in Deutschland" entnommen, die alle zwei Jahre als gemeinsame Publikation der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert Koch-Institut, das die Daten der epidemiologischen Landeskrebsregister auf Bundesebene zusammenführt, veröffentlicht wird (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2012). Die Ergebnisse dieser 8. Auflage beruhen auf Daten aus 15 von 16 Bundesländern (ausgenommen Baden-Württemberg) bis zum Jahr 2008.

**Tab. 1: Lungenkrebs - die wichtigsten epidemiologischen Zahlen für Deutschland** (aus „Krebs in Deutschland 2007/2008“ (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2012)) In der folgenden Tabelle werden die Anzahl von Krebsneuerkrankungen, die rohe Erkrankungsrate, die standardisierte und die mittlere Erkrankungsrate, die Sterbefälle, die rohe und die standardisierte Sterberate, die 5-Jahres-Prävalenz, die absolute sowie die relative 5-Jahres-Überlebensrate für 2007 und 2008 sowohl für Frauen als auch für Männer dargestellt und eine Prognose für 2012 erhoben.

	2007		2008		Prognose für 2012	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	33.650	15.280	33.960	15.570	33.700	17.700
Rohe Erkrankungsrate <sup>1</sup>	83,5	36,4	84,4	37,2	84,4	42,7
Standardisierte Erkrankungsrate <sup>1,2</sup>	61,4	24,0	60,6	24,3	55,9	26,8
Mittleres Erkrankungsalter <sup>3</sup>	69	68	69	68		
Sterbefälle	29.143	12.379	29.505	12.841		
Rohe Sterberate	72,3	29,5	73,3	30,7		
Standardisierte Sterberate <sup>1,2</sup>	52,7	18,5	52,3	19,2		
5-Jahres-Prävalenz	39.200	19.200	39.500	20.000	38.600	22.900
<hr/>						
Absolute 5-Jahres-Überlebensrate (2007-2008) <sup>4</sup>			13 (10-15)	18 (15-23)		
Relative 5-Jahres-Überlebensrate (2007-2008) <sup>4</sup>			15 (11-18)	19 (16-25)		

<sup>1</sup> je 100.000 Personen <sup>2</sup> altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung <sup>3</sup> Median  
<sup>4</sup> in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

Sowohl bei Männern (1. Prostata, 2. Darm, 3. Lunge) als auch bei Frauen (1. Brustdrüse, 2. Darm, 3. Lunge) ist Lungenkrebs die dritthäufigste Krebserkrankung. 2008 erkrankten ca. 34.000 Männer und 15.500 Frauen; ca. 29.500 Männer und 13.000 Frauen verstarben an der Krebserkrankung. Für 2012 wurden 33.700 Neuerkrankungen bei Männern und 17.700 bei Frauen prognostiziert. Bei Männern war Lungenkrebs mit einem Anteil von 26 % weiterhin mit deutlichem Abstand die häufigste Krebstodesursache, bei Frauen mit einem Anteil von 13 % die dritthäufigste Ursache nach Brust- und Darmkrebs. Aufgrund eines veränderten Rauchverhaltens beider Geschlechter in den letzten Jahrzehnten entwickeln sich die Erkrankungs- und Sterberaten seit Ende der 1990er Jahre gegenläufig: Sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität stiegen bei den Frauen jeweils um etwa 30 %, bei den Männern ist die Prävalenz bei rückläufigen Inzidenzraten nur aufgrund der demographischen Veränderungen leicht angestiegen. Da viele Lungentumore erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden - der Anteil des T4-Stadiums liegt bei ca. 40 % - , ist die Prognose trotz multimodaler Therapieansätze weiterhin eher ungünstig, hat sich aber seit den 1980er Jahren verbessert: Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Männern bei 15 % (1980er Jahre: 10 %)

und bei Frauen bei 18 % (1980er Jahre: 10 %), wobei sie je nach Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung variiert. In den USA werden je nach Krankheitsstadium folgende 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten angegeben: liegt ein lokaler Befund vor (Stadium IA und IB nach IASLC), überleben 49 % der Patienten 5 Jahre, bei regionaler Lymphknotenbeteiligung (Stadium IIA, IIB und IIIA nach IASLC) sind es noch 16 % und lediglich 2 % bei Fernmetastasen (Stadium IV nach IASLC) (Ries et al., 2005).

### **1.3 Sozioökonomischer Status**

Es gibt eine inverse Korrelation zwischen dem Auftreten von Lungenkrebs und der Ausbildung sowie dem Einkommen (Mao et al., 2003). Das Bronchialkarzinom tritt in der Bevölkerungsgruppe mit niedrigem Einkommen und schlechter Ausbildung häufiger auf als in der Gruppe mit höherem sozioökonomischem Status. Das liegt daran, dass der Anteil von Rauchern und damit verbunden auch das Lungenkrebsrisiko in der Gruppe mit niedrigem sozioökonomischem Status deutlich höher sind. Des Weiteren wirken sich z.B. die Ernährung und eine Exposition gegenüber Kanzerogenen in der Umwelt häufig negativ aus.

### **1.4 Geographische Verteilung**

Das Bronchialkarzinom stellt weltweit die häufigste Krebsart dar, wobei es große regionale Unterschiede in der geographischen Verteilung gibt. Am häufigsten tritt die Erkrankung in entwickelten Ländern in Europa und Nordamerika auf, in den Entwicklungsländern, besonders in Südafrika und Südamerika, ist sie seltener. Jedoch nimmt die Prävalenz in den entwickelten Ländern ab und in den Entwicklungsländern zu. Auch innerhalb der Länder selbst variiert die Häufigkeit: Aufgrund eines höheren Anteils an Rauchern und der häufigeren beruflichen Exposition gegenüber Kanzerogenen ist die Lungenkrebshäufigkeit in Städten und Industrieregionen besonders hoch; die Luftverschmutzung trägt hierzu nur einen kleinen Anteil bei (Sadler et al., 1999; Wichmann et al., 1991).

## 1.5 Ätiologie

Der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms ist die Exposition gegenüber exogenen, karzinogenen Noxen; die bei weitem wichtigste ist der Zigarettenrauch, gefolgt von Radon, radioaktiven Strahlenquellen, Röntgenstrahlung, Feinstaub, Dieselmotorabgasen, Asbest, künstlichen Mineralfasern, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), Chromaten, Siliziumdioxid, Arsen, Nickel, Mono- und Dichlordimethylether, Beryllium, Cadmium, Wolfram- und kobalthaltigen Hartmetallstäuben (Goeckenjan et al., 2010). Das aktive Tabakrauchen in der EU ist bei Frauen für ca. 65 % und bei Männern für bis zu 91 % der Lungenkrebstodesfälle ursächlich (McNeill, 2004). Hierbei steigt das Erkrankungsrisiko der Raucher dosisabhängig mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten im Laufe des Lebens an. Daraus ergibt sich in einer europäischen Studie aus dem Jahr 2001 ein bis zu 24-fach erhöhtes Lungenkrebsrisiko starker männlicher Raucher im Vergleich zu männlichen Niemals-Rauchern (Simonato et al., 2001). Wird das Rauchen beendet, sinkt das Erkrankungsrisiko mit jedem Jahr der Nikotinabstinenz. In der oben aufgeführten Studie von Simonato et al. haben Ex-Raucher im Schnitt ein 7,5-fach höheres Risiko. Trotz der Tatsache, dass der Nikotin-, Teer- und Kohlenmonoxidgehalt der Zigaretten in den letzten Jahrzehnten im Rahmen der Einführung von sogenannten „light“-Zigaretten deutlich reduziert wurde, konnte das Krebsrisiko nicht gesenkt werden. Im Jahr 2004 rauchten im Alter von über 18 Jahren rund 32 % der deutschen Bevölkerung (Goeckenjan et al., 2010). Auch das Passivrauchen stellt einen erhöhten Risikofaktor dar, wobei die Dauer der Exposition entscheidend ist: In einer Metaanalyse von 2007 zur Expositions-Wirkungs-Beziehung zwischen Passivrauchen und Lungenkrebs am Arbeitsplatz wurde bei Personen, die sich jahrelang in stark verrauchten Arbeitsräumen aufhielten, eine Verdopplung des Lungenkrebsrisikos gefunden (Stayner et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken um 10 % verringert werden könnte, wenn die berufliche Exposition gegenüber kanzerogener Noxen wegfielen (Huber, 2006). In einer detaillierten Darstellung der gewerblichen Berufsgenossenschaften werden folgende Noxen in absteigender Häufigkeit zwischen 1978 bis 2003 als Berufskrankheit bei Lungenkarzinomen anerkannt: Asbest, ionisierende Strahlung (Uranbergbau), PAK, Chromate, kristallines Siliziumdioxid, Arsen, Nickel und Dichlordimethylether; wobei die mittlere Latenzzeit bei ca. 30 bis 40

Jahren liegt, sodass von einem Schwerpunkt der Einwirkungen der Noxen zwischen 1950 bis 1970 ausgegangen wird, als dem Arbeitsschutz noch nicht so viel Bedeutung beigemessen wurde (Butz, 2005). Eine ausführliche Berufsanamnese sollte bei jeder Erstdiagnose einer Tumorerkrankung erhoben werden; der begründete Verdacht auf eine Berufskrankheit ist in Deutschland gesetzlich meldepflichtig (Mast et al., 2009).

Weitere Risikofaktoren sind humane Papilloma (HPV)- und Epstein-Barr-Viren (EBV) (Giuliani et al., 2007; Ho et al., 2006; Subramanian und Govindan, 2007). HPV konnte nicht nur mit Plattenepithelkarzinomen auf dem Boden von Papillomen/Papillomatosen sondern in Asien auch mit Adenokarzinomen assoziiert werden (Chen et al., 2004; Will et al., 2006b). Das großzellige lymphoepitheliale Lungenkarzinom, eine seltene Variante des großzelligen Karzinoms, wurde mit EBV in Verbindung gebracht. Diese Virus-assoziierten Bronchialkarzinome treten hauptsächlich in Asien und Afrika auf (bis zu 80 %). Da in Europa mit einer Häufigkeit von ca. 5 % HPV-assoziiierter Lungenkarzinome zu rechnen ist, sollte auch das HPV bei den Risikofaktoren mehr Berücksichtigung finden (Will et al., 2006a).

Ein gehäuftes Auftreten von genetischen Mutationen in Tumorsuppressorgenen, Onkogenen, Apoptose-relevanten Genen und Zellzyklus-relevanten Genen führt zu einer malignen Transformation der normalen Bronchialschleimhaut. Hier können genetische Faktoren besonders im jungen Alter zu einer beschleunigten Anhäufung dieser Mutationen führen (Bailey-Wilson et al., 2004; Kreuzer et al., 1998; Schwartz et al., 1996).

## **1.6 Prävention**

Da es keinen Schwellenwert gibt, unter dem der aktive – jedoch auch der passive – Tabakkonsum unbedenklich ist, stellt die absolute Nikotinkarenz den bei weitem wichtigsten Bestandteil der Prävention dar. In einer Studie durch Zhou et al., die 2006 publiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Prognose eines manifesten Bronchialkarzinoms (lokal, begrenztes NSCLC) besser ist, je früher der Tabakkonsum vor der Diagnosestellung beendet wurde (Zhou et al., 2006): Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei aktuellen Rauchern bei 50 %, bei Ex-Rauchern seit 1 - 8 Jahren bei

54 %, bei Ex-Rauchern seit 9 - 17 Jahren und bei 76 % bei Niemals-Rauchern. Weitere Bemühungen im Rahmen der Prävention, die jedoch im Vergleich zur Einstellung des Nikotinkonsums fast vernachlässigbar sind, beinhalten eine weitgehende Minimierung der Gefährdung kanzerogener Noxen am Arbeitsplatz, eine Verminderung der Radonexposition in Wohnungen durch bautechnische Maßnahmen, ein kritisches Überdenken der Indikationsstellung der Anwendung ionisierender Strahlung in der medizinischen Diagnostik und eine Reduktion der Dieselruß-Emission durch Dieselrußfilter (Goeckenjan et al., 2010).

### **1.7 Morphologie**

Das pathologisch-anatomische Gutachten stellt die entscheidende Grundlage für die Diagnose, die Therapieplanung und die Einschätzung der Prognose von Lungentumoren dar. Als Grundlage der mikroskopischen Charakterisierung dient die in Lyon 2004 revidierte und erweiterte WHO-Klassifikation der Tumore von Lunge, Pleura, Thymus und Herz der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) sowie ein Vorschlag der „International Association for Study of Lung Cancer“ (IASLC), der „American Thoracic Society“ (ATS) und der „European Respiratory Society“ (ERS) aus dem Jahr 2011 zur weitergehenden Klassifizierung von Adenokarzinomen und präinvasiven Läsionen in Lungenresektaten (Travis et al., 2011; Travis et al., 2004). Hierbei ging es der Arbeitsgruppe insbesondere darum, dass ein Großteil der Bronchialkarzinome (ca. 70 %) bei der Erstdiagnose bereits inoperabel ist und damit das pathologisch-anatomische Gutachten meist auf einer kleinen Biopsie bzw. einem zytologischen Präparat und eben nicht auf einem großen Tumorresektat, wie es streng genommen für die WHO Klassifikation von 2004 erforderlich war, beruht. In der 2011 veröffentlichten IASLC/ATS/ERS-Klassifikation von Adenokarzinomen der Lunge (s. unten) wurden u.a. der Begriff bronchiolo-alveoläre Bronchialkarzinome (BAC) abgeschafft und Tumore, die zuvor unter diesem Begriff subsumiert wurden, an fünf anderen Stellen der Klassifikation erwähnt. Außerdem wurde die Auflistung der präinvasiven Läsionen um das Adenokarzinom in situ (AIS) erweitert und das mikropapilläre Adenokarzinom wurde als Tumorentität mit einer schlechten Prognose als ein neuer Subtyp eingeführt. Zu diagnostischen Schwierigkeiten kann die Mannigfaltigkeit des Lungenkarzinoms führen.



Das Vorhandensein der vielen Mischentitäten – z.B. das kombinierte kleinzellige Karzinom, das adenosquamöse Karzinom, das Karzinosarkom – , die Heterogenität des Tumors sowie „die zu beobachtenden phänotypischen Transitionen zwischen mehreren Subtypen“ deuten nach Petersen auf die ausgeprägte genetische Instabilität, die schließlich auch für die hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate maßgeblich ist, hin (Petersen, 2011). Travis et al. geben in der neuen Klassifikation erstmals auch eine Empfehlung zur Verwendung des häufig limitierten Materials aus Biopsien und zytologischen Präparaten sowie zu deren Terminologie mit dem Ziel, dass im Anschluss an die subtile Diagnostik eine Festlegung auf eine definitive Tumorentität und damit die bestmögliche Therapie möglich ist und nicht nur eine Unterscheidung zwischen SCLC und NSCLC erfolgt (Travis et al., 2011).

**Tab. 2: Histologische Klassifizierung des Bronchialkarzinoms**

(basierend auf der WHO-Klassifikation von 2004 und der IASLC/ATS/ERS-Klassifikation der Lungenkarzinome von 2011) Die folgende Tabelle stellt eine ausführliche Übersicht über die aktuellen histologischen Subgruppen des Bronchialkarzinoms dar. Als Grundlagen dienen hierbei die WHO-Klassifikation der Tumore von Lunge, Pleura, Thymus und Herz der IRC von 2004 sowie ein Vorschlag der IASLC, der ATS und der ERC zur weiterführenden Klassifizierung von Adenokarzinomen und präinvasiven Läsionen in Lungenresektaten von 2011 (Travis et al., 2011; Travis et al., 2004).

---

- **Preinvasive lesions**
  - ✓ Squamous dysplasia/carcinoma in situ (CIS)
  - ✓ Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)
  - ✓ Adenocarcinoma in situ (AIS) (nonmucinous, mucinous, or mixed nonmucinous/mucinous)
  - ✓ Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia (DIPNECH)

---

- **Squamous cell carcinoma**
  - ✓ Papillary
  - ✓ Clear cell
  - ✓ Small cell
  - ✓ Basaloid

---

- **Small cell carcinoma**
  - ✓ Combined small cell carcinoma

---

- **Adenocarcinoma**
  - ✓ Minimal invasive adenocarcinoma (MIA) ( $\leq 3$  cm lepidic predominant tumor with  $\leq 5$  mm invasion)
    - nonmucinous, mucinous, or mixed nonmucinous/mucinous
  - ✓ Invasive adenocarcinoma
    - Lepidic predominant (LPA - formerly nonmucinous bronchioalveolar carcinoma (BAC) pattern, with  $\geq 5$  mm invasion)
    - Acinar predominant
    - Papillary predominant
    - Micropapillary predominant
    - Solid predominant with mucin
  - ✓ Variants of invasive adenocarcinoma
    - Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)
    - Colloid
    - Fetal (low and high grade)
    - Enteric

---

- **Large cell carcinoma**
  - ✓ Large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC)
    - Combined LCNEC
  - ✓ Basaloid carcinoma
  - ✓ Lymphoepithelioma-like carcinoma
  - ✓ Clear cell carcinoma
  - ✓ Large cell carcinoma with rhabdoid phenotype

---

- **Adenosquamous carcinoma**
- **Sarcomatoid carcinomas**
  - ✓ Pleomorphic carcinoma
  - ✓ Spindle cell carcinoma
  - ✓ Giant cell carcinoma
  - ✓ Carcinosarcoma
  - ✓ Pulmonary blastoma
  - ✓ Other

---

- **Carcinoid tumor**
  - ✓ Typical carcinoid (TC)
  - ✓ Atypical carcinoid (AC)

---

- **Carcinomas of salivary gland type**
  - ✓ Mucoepidermal carcinoma
  - ✓ Adenoid cystic carcinoma
  - ✓ Epimyoeptithelial carcinoma

---

Im Folgenden sollen die wichtigsten histomorphologischen Subtypen vorgestellt werden.

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (engl.: small cell lung cancer = SCLC) kommt vor allen Dingen bei Patienten mit einer langen und früh begonnenen Raucheranamnese vor und befindet sich zum größten Teil im Bereich der zentralen und intermediären Segment- und Subsegmentbronchien; es wächst häufig manschettenförmig, intramural-bronchial sowie perivasal. Diese Tumorentität zeichnet sich durch eine frühzeitige Stromainvasion mit darauffolgender Metastasierung über die Lymph- und Blutgefäße aus; aufgrund des schnellen Wachstums finden sich häufig nekrotische Areale. Mikroskopisch kommen kleine bis mittelgroße, runde, zytoplasmaarme Zellen mit hyperchromatischen, pleomorphen und dunklen Kernen sowie lediglich vereinzelt Nukleolen und zahlreichen Mitosen zur Darstellung. Die Tumorzellen liegen in ungeordneten Zellverbänden dicht zusammen, wobei sich die Kerne gegenseitig verformen, was als „moulding“ bezeichnet wird. Die maximale Größe der Zellen kleinzelliger Karzinome entspricht der dreier inaktiver Lymphozyten (4 - 9 µm). Charakteristisch sind Quetschartefakte und hämatoxyphile Gefäßanomalien (Müller und Wiethage, 2004). Neben kleinzelligen Karzinomen lassen sich besonders auch kombiniert kleinzellige Karzinome finden, die sich durch Anteile nicht kleinzelliger, adenoider, plattenepithelialer oder großzellig differenzierter Karzinomanteile auszeichnen. Als Abkömmlinge des neuroendokrinen Systems können kleinzellige Karzinomzellen multiple Peptide wie z.B. ACTH, ADH, PTHrP oder Calcitonin produzieren, wodurch paraneoplastische Syndrome hervorgerufen werden können.

Das Plattenepithelkarzinom befindet sich als stenosierend wachsender Tumor hauptsächlich in Segment- und Subsegmentbronchien, kann jedoch auch als isolierter knotiger Rundherd auftreten; es ist durch den Nachweis von Interzellularbrücken und/oder einer Keratin 5/6- und p40/p63-Expression bis hin zur Ausbildung von konzentrisch geschichteten Hornperlen definiert, wobei der Nachweis von Verhornungen entscheidend für die Zuordnung zu einem Plattenepithelkarzinom ist. Extrathorakale Metastasen treten später auf als bei den anderen Subtypen. Makroskopisch zeigen die grau-weißen Tumore eine feste bis bröckelige Konsistenz und besonders im höheren Lebensalter führen sie durch Destruktion oder Infiltration der Gefäße im Tumor und der daraus resultierenden Durchblutungsstörung zu Nekrosen bzw. Kavernenbildungen. Die

invasiven Plattenepithelkarzinome zeigen sehr unterschiedliche Differenzierungsgrade – von gut differenzierten verhornenden, langsam wachsenden epidermisähnlichen Epithelverbänden bis hin zu losen undifferenzierten Zellverbänden mit geringem Stromaanteil und kaum erkennbaren plattenepithelialen Eigenschaften.

Die Prävalenz von Adenokarzinomen hat in den letzten 20 Jahren um ca. 50 % zugenommen, mittlerweile sind sie häufiger als Plattenepithelkarzinome. Dieser Subtyp dominiert bei Frauen, Nichtrauchern und Patienten unter 45 Jahren. Adenokarzinome befinden sich hauptsächlich in der Peripherie, sie wachsen zwar langsamer als andere NSCLC-Typen, besitzen jedoch eine hohe Angioinvasivität. Dies spiegelt sich klinisch in einer relativ hohen hämatogenen Metastasierungsrate besonders in das zentrale Nervensystem wider. Es zeigt sich eine zentrale Tumorvernarbung als Folge erheblicher Regressionsphänomene im Bereich der Blutgefäße der zentralen Stromaanteile. Makroskopisch stellt sich eine grau-weiße, körnig-glasige Schnittfläche mit einer zentralen schwarzen Pigmentspeicherung dar (Müller und Wiethage, 2004). Mikroskopisch erkennt man atypische drüsenähnliche Strukturen, Schleimsubstanzen, Sekretvakuolen und mehrkernige Riesenzellen. Die Tumorzellen sind durch große, hyperchromatische, exzentrische gelegene Kerne mit häufig unregelmäßiger Kontur und großen Nukleolen gekennzeichnet. Wie bereits oben dargestellt, gibt es seit 2011 eine neue Klassifikation der Adenokarzinome (s. Tabelle 1), deren Entstehung u.a. auf der Tatsache beruht, dass es histomorphologisch zu unterscheidende Subtypen mit unterschiedlicher Prognose gibt, deren Pathologie auf verschiedene genetische Defekte sowie das Therapieansprechen hinweisen kann (Travis et al., 2011). Neben der atypischen adenomatösen Hyperplasie (AAH) wurde das Adenokarzinom in situ (AIS) mit seinen entsprechenden Untergruppen als eine neue präinvasive Läsion in die Klassifikation aufgenommen. Die AAH stellt eine bronchiolo-alveoläre Proliferation dar, die aus fokalen Ansammlungen von leicht atypischen, kubischen bis niedrigen, säulenartigen Epithelzellen entlang der Alveolen und der Bronchiolen besteht. Die Abgrenzung der AAH gegenüber einiger anderer Läsionen kann aufgrund von Überschneidungen in den morphologischen Eigenschaften schwierig sein; hier sind das nichtmuzinöse AIS, das minimalinvasive Adenokarzinom (MIA) oder das lepidisch prädominante Adenokarzinom (LPA) zu nennen. Das niedriggradige AIS entspricht dem ehemaligen reinen bronchiolo-alveolären Karzinom ohne invasives Wachstum; es ist

gekennzeichnet durch eine drüsige Proliferation von  $\leq 3$  cm Größe mit lepidischem Tumorwachstum und einer guten Prognose. Hauptsächlich lassen sich nichtmuzinöse Tumorzellen sowie Pneumozyten Typ 2 und Clara Zellen finden (Travis, 2011). Des Weiteren wurde das ebenfalls niedriggradige MIA als ein lepidisch prädominanter Tumor eingeführt, der  $\leq 3$  cm misst und eine invasive Komponente von  $\leq 5$  mm besitzt. Die invasiven Adenokarzinome werden jetzt nach dem prädominanten Wachstumsmuster in verschiedene Subgruppen mit unterschiedlichen Prognosen eingeteilt. Das LPA, das hauptsächlich aus Pneumozyten Typ 2 und Clara Zellen besteht und eine invasive Komponente von  $\geq 5$  mm besitzt, hat die beste Prognose, gefolgt von dem prädominant papillären und azinären Subtyp. Das neu eingeführte prädominant mikropapilläre Adenokarzinom hingegen weist mit einem 5-Jahre krankheitsfreien Überleben (disease free survival = DFS) von 67 % eine schlechte Prognose bereits im Frühstadium auf (Miyoshi et al., 2003; Travis et al., 2011; Tsutsumida et al.; Yoshizawa et al., 2011).

Das großzellige Bronchialkarzinom zeigt sich vor allen Dingen in der Lungenperipherie, kann jedoch auch selten zentral lokalisiert sein, und erscheint als großer nekrotischer Tumor. Es ist eine Ausschlussdiagnose – plattenepithelartige Zellen und adenoide Komponenten müssen mittels Lichtmikroskopie ausgeschlossen werden. Histologisch zeigen sich Lagen und Nester von großen anaplastischen, polygonalen Zellen mit vesikulären Nuklei und prominenten Nukleoli. Die Diagnose eines großzelligen Bronchialkarzinoms kann nur anhand eines Resektionspräparates gestellt werden, da die Anwesenheit von Adenokarzinom- oder Plattenepithelkarzinomzellen in einer kleinen Biopsie oder einem zytologischen Präparat nicht ausgeschlossen werden kann (Travis et al., 2004). Nach der neuen 2011 eingeführten Klassifikation nach IASLC/ATS/ERS sollten diese Tumore, wenn die Diagnose auf einer Biopsie o.ä. beruht, als NSCLC-NOS (= not otherwise specified) eingestuft werden, solange sie nur mittels Lichtmikroskopie evaluiert worden sind (Travis et al., 2011; Travis et al., 2004).

Eine immunhistochemische und genetische Aufarbeitung von 583 Lungenkarzinomfällen durch das „Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP)“ und das „Network Genomic Medicine (NGM)“ der Uniklinik Köln führte zu einer Reklassifizierung nahezu aller primär als „großzellige Bronchialkarzinome“ diagnostizierten Lungenkarzinome in Adeno-, Plattenepithel-, neuroendokrine und kleinzellige Karzinome, was insbesondere

auch neue therapeutische Optionen eröffnet(e) und zeigt, dass die Diagnose „großzelliges Bronchialkarzinom“ in Zukunft aufgrund der immer weiter reichenden Diagnostik kaum noch gestellt werden wird (Seidel et al., 2013)

### **1.8 Aktuelles Staging und Stadieneinteilung**

Das Staging des Lungenkarzinoms nach der aktuell gültigen 7. Auflage der TNM-Klassifikation sowie die Stadieneinteilung nach den Kriterien der „Union for International Cancer Control“ (UICC) sollten die Grundlagen zur Therapieplanung und Prognoseabschätzung eines jeden Tumorpatienten stellen. Seit 2010 gilt die 7. aktualisierte TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der UICC, sie wurde 2009 von Sobin publiziert (Sobin et al., 2010). Als Grundlage diente die Auswertung von Überlebensdaten von mehr als 67.000 Patienten mit NSCLC durch die IASLC, die zur Änderung der TNM-Deskriptoren geführt hat (Goldstraw et al., 2007; Groome et al., 2007; Postmus et al., 2007). Die folgenden Tabellen stellen diese Modifikationen dar. Dies sind insbesondere die Einführungen neuer Subtypen (T1a/b, T2a/b, M1a/b), da festgestellt wurde, dass die Ausdehnung des Primärtumors noch eine höhere prognostische Relevanz birgt. Ein maligner Perikard- oder Pleuraerguss entspricht jetzt dem Stadium M1a bzw. IV nach UICC. Kann ein maligner Erguss durch den Tumor mittels einer mehrfachen negativen Zytologie ausgeschlossen werden und der Erguss ist weder hämorrhagisch noch exsudativ, dann wird der Erguss beim Staging nicht berücksichtigt und der Tumor wird als M0 eingestuft.

**Tab. 3: TNM-Klassifikation nach IASLC (UICC 7. Auflage)**

Seit 2010 gilt diese aktualisierte TNM-Klassifikation, sie wurde von der UICC und dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) anerkannt und gilt seit dem 01.01.2010. Neu sind insbesondere die Einführungen neuer Subtypen (T1a/b, T2a/b, M1a/b), da herausgefunden wurde, dass die Ausdehnung des Primärtumors prognostisch noch bedeutsamer ist. Außerdem entspricht ein maligner Erguss jetzt dem Stadium M1a bzw. IV nach UICC und nicht mehr T4 bzw. IIIB.

<b>T-Primärtumor</b>	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor bis 3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus bronchoskopisch frei
T1a	Läsion bis 2 cm
T1b	Läsion größer 2 cm bis 3 cm
T2	Tumor größer > 3 cm ≤ 7 cm mit Befall von <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hauptbronchus ≥ 2 cm entfernt von Carina oder</li> <li>- viszerale Pleura infiltriert oder</li> <li>- Atelektase oder</li> <li>- obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge</li> </ul>
T2a	Läsion bis 5 cm
T2b	Läsion bis 7 cm
T3	T2-Tumor größer als 7 cm Tumor jeder Größe mit Infiltration von <ul style="list-style-type: none"> <li>- Brustwand oder</li> <li>- Zwerchfell oder</li> <li>- mediastinalem Perikard oder</li> <li>- parietalem Perikard</li> </ul> Hauptbronchus ≤ 2 cm entfernt von Carina, Carina selbst frei Atelektase oder obstruktive Entzündung der ganzen Lunge getrennte Herde im gleichen Lungenlappen (ehem. T4)
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration von <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mediastinum oder</li> <li>- Herz oder</li> <li>- großen Gefäßen oder</li> <li>- Trachea oder</li> <li>- Ösophagus oder</li> <li>- Wirbelkörper oder</li> <li>- Carina</li> </ul> Tumorherde in anderen Lungenlappen ipsilateral (ehem. M1)
<b>N-Lymphknoten</b>	
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen Lymphknoten und/oder in ipsilateralen Hilus-Lymphknoten (einschließlich einer direkten Ausbreitung des Primärtumors)
N2	Metastasen in ipsilateralen, mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
<b>M-Metastasierung</b>	
Mx	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden.
M1a	Tumor mit malignem Pleura- oder Perikarderguss (ehem. T4) Tumorherde in der kontralateralen Lunge
M1b	Fernmetastasen

**Tab. 4: Stadieneinteilung nach IASLC (UICC 7. Auflage)**

Die folgende Tabelle zeigt die neue Stadieneinteilung nach IASLC von 2010.

Stadieneinteilung	Tumor	Nodi	Metastasen
<b>okkultes Karzinom</b>	Tx	N0	M0
<b>Stadium IA</b>	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
<b>Stadium IB</b>	T2a	N0	M0
<b>Stadium IIA</b>	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
<b>Stadium IIB</b>	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3 gleicher Lappen	N0	M0
<b>Stadium IIIA</b>	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T3 gleicher Lappen	N1	M0
	T3 gleicher Lappen	N2	M0
	T4 Ausdehnung	N0	M0
	T4 Ausdehnung	N1	M0
	T4 Herd ipsilateral	N0	M0
	T4 Herd ipsilateral	N1	M0
<b>Stadium IIIB</b>	T4 Ausdehnung	N2	M0
	T4 Herd ipsilateral	N2	M0
	jedes T	N3	M0
<b>Stadium IV</b>	jedes T	jedes N	M1a
	jedes T	jedes N	M1b

Des Weiteren wird das Stadium IIIA nach Robinson et al. seit 2007 in weitere Subgruppen differenziert, die die prä- bzw. intraoperativen Befunde erläutern und für die Prognose sowie die weitere Differentialtherapie von Bedeutung sind (Robinson et al., 2007; Robinson et al., 2003).



**Tab. 5: Klassifikation des Stadiums IIIA nach Robinson et al., 2007**

Nach Robinson et al. wird das Stadium IIIA (N2) seit 2007 klinisch in weitere vier Subgruppen nach Auswertung von prä- bzw. intraoperativen Befunden, die für die Prognose und die adjuvante Therapie bedeutsam sind, unterteilt (Robinson et al., 2007).

Untergruppe	Beschreibung
IIIA <sub>1</sub>	inzidenteller Nachweis von mediastinalen Lymphknotenmetastasen in einer Lymphknotenstation bei der postoperativen histologischen Untersuchung des Resektats
IIIA <sub>2</sub>	intraoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer Lymphknotenstation
IIIA <sub>3</sub>	präoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer oder mehreren Lymphknotenstationen durch Staging mittels Mediastinoskopie, Feinnadelaspiration oder PET
IIIA <sub>4</sub>	„bulky“ oder fixierte N2-Metastasen oder Metastasen in mehreren Lymphknotenstationen (mediastinale Lymphknoten > 2 - 3 cm mit extrakapsulärer Infiltration; Befall mehrerer N2-Lymphknotenpositionen; Gruppen multipler befallener kleinerer (1 - 2 cm) Lymphknoten

Das kleinzellige Lungenkarzinom sollte ebenfalls nach diesen aktuellen TNM- und UICC-Kriterien klassifiziert werden, jedoch wurde dieses System primär für das NSCLC entwickelt und validiert. Nahezu alle Studien zum SCLC beruhen auf der vor knapp 40 Jahren verfassten Einteilung der „Veterans Administration Lung Cancer Study Group“ (VALCSG) in „limited“ oder „extensive disease“, je nachdem ob der Tumor in ein Bestrahlungsfeld passt oder nicht. Nach der sogenannten „Marburger Klassifikation“, die Anfang der 1990er Jahre durch die IASLC und eine deutsche Studiengruppe eingeführt wurde, werden klinisch relevante Subgruppen der begrenzten und grenzüberschreitenden Tumore unterschieden (Seeber, 1995). Neben der Tumorausbreitung sind der ECOG Performance Status, das Geschlecht – Frauen weisen in allen Untergruppen eine günstigere Prognose auf –, und der Laborparameter LDH, der mit der Prognose negativ korreliert und mindestens gleichbedeutend mit der Bedeutung des Tumormarkerwertes NSE ist, von besonderer prognostischer Relevanz (Albain et al., 1990; Bremnes et al., 2003; Cerny et al., 1987; Johnson et al., 1993; Rawson und Peto, 1990; Sagman et al., 1991; Singh et al., 2005; Spiegelman et al., 1989; Wolf et al., 1991a).

### **1.9 Gegenwärtige, stadiengerechte Therapieoptionen**

Die Therapieentscheidung beim Lungenkarzinom beruht auf klinischen, radiologischen sowie histologischen – und hier insbesondere molekularen – Kriterien; sie sollte in

Tumorkonferenzen multidisziplinär gefällt werden. Zunächst wird die Therapie des kleinzelligen grundsätzlich von der des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms unterschieden.

Bei Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom im Stadium T1-2 N0-1 M0 („very limited disease“) ohne mediastinalen Lymphknotenbefall sollten eine primäre Operation – wenn möglich eine Lobektomie – mit anschließender adjuvanter Chemotherapie (4 Zyklen Cisplatin/Etoposid) sowie eine prophylaktische Ganzhirnbestrahlung, die sowohl das Gesamt- (OS = overall survival) als auch das erkrankungsfreie Überleben bei Patienten in kompletter Remission verbessert, in Betracht gezogen werden (Auperin et al., 1999; Maassen et al., 1985; Shepherd et al., 1991; Tsuchiya et al., 2005; Ulsperger et al., 1991; Waddell und Shepherd, 2004). Postoperativ sollte zusätzlich eine Mediastinalbestrahlung bei N1-Befall diskutiert bzw. bei N2-Befall durchgeführt werden; bei einer R1/R2-Resektion wird sie ebenfalls empfohlen (Goeckenjan et al., 2010). Im Stadium T3-4 N2-3 M0 („limited disease“) stellt die Chemotherapiekombination Cisplatin/Etoposid – am besten mit simultaner Durchführung einer Radiatio bei bestrahlungsfähiger Primärtumorausdehnung unter Berücksichtigung des biologischen Alters und der Komorbiditäten – gefolgt von einer prophylaktischen Schädelbestrahlung nach Erreichen einer kompletten Remission, die sowohl das Gesamt- als auch das erkrankungsfreie Überleben verbessern kann, aufgrund der guten Datenlage die Therapie der 1. Wahl dar (Arriagada et al., 2002; Auperin et al., 1999; Goeckenjan et al., 2010; Mascaux et al., 2000; Meert et al., 2001; Pujol et al., 2000).

Nach einer Phase-III-Studie aus Japan von Takada et al. kann die mediane Überlebenszeit durch eine simultane, hyperfraktionierte – im Vergleich zu einer konsekutiven – Strahlentherapie unter Berücksichtigung der erhöhten Toxizität (besonders Panzytopenien) deutlich – von 19,7 auf 27,2 Monate – verlängert werden (Takada et al., 2002). Erwähnenswert ist, dass das Einstellen des Nikotinkonsums unter simultaner Radiochemotherapie die Prognose verbessert (Videtic et al., 2003). Liegt eine metastasierte Tumorausbreitung („extensive disease“) vor, wird standardmäßig eine Kombinationschemotherapie mit Cisplatin/Etoposid bzw. Carboplatin/Etoposid durchgeführt, wobei die Carboplatin-gabe zu weniger Nebenwirkungen führt, besser verträglich ist und daher in der S3-Leitlinie für Lungenkarzinome bevorzugt wird; in der

deutschen Studie von Wolf et al. zeigten sich gleiche Ansprechraten und Überlebensvorteile für beide Platinderivate (Goeckenjan et al., 2010; Wolf et al., 1991b). Bei Auftreten einer Hirnmetastasierung sollte möglichst frühzeitig und am besten simultan zu einer Chemotherapie eine Strahlentherapie eingeleitet werden, da es hierbei zu einer deutlich besseren Remissionsrate kommt; die mediane Überlebenszeit war jedoch in beiden Gruppen mit 3,2 vs. 3,5 Monaten schlecht (Postmus et al., 2000). Ansonsten ist – wie zuvor beschrieben – nach Erreichen einer kompletten Remission eine prophylaktische Ganzhirnbestrahlung indiziert. Liegt eine resistente Erkrankung oder ein sensibles Rezidiv vor, sollte nach der Second-Line-Studie von O'Brien et al. die Durchführung einer Topotecan-Monotherapie evaluiert werden, die im Vergleich mit einem Best-supportive-care-Vorgehen einen signifikanten Überlebensvorteil erbrachte (O'Brien et al., 2006) .

NSCLC-Patienten im Stadium I und II – mit Einschränkungen auch im Stadium III – sollten abhängig von der funktionellen Operabilität einer vollständigen Resektion (Lobektomie) mit systematischer, radikaler Dissektion ipsilateraler und mediastinaler Lymphknoten zugeführt werden (Goeckenjan et al., 2010). Ab dem Stadium II wird eine platinbasierte, adjuvante Kombinationstherapie empfohlen, die innerhalb von 60 Tagen postoperativ begonnen werden sollte, wobei die Gabe von Cisplatin und Vinorelbin für die Dauer von 4 Zyklen am besten belegt ist (Arriagada et al., 2004; Arriagada et al., 2010; Goeckenjan et al., 2010). Kann der Patient aufgrund seiner Komorbiditäten bzw. seiner Lungenfunktion nicht kurativ operiert werden, kommen Alternativen, wie z.B. eine definitive Radiatio oder eine limitierte Resektion, zum Zuge (Goeckenjan et al., 2010).

Die Subgruppen des Stadiums IIIA des NSCLC sind in ihrer Tumorausbreitung heterogen und so gibt es auch keine generelle Standardtherapieempfehlung. Ein operatives Vorgehen mit adjuvanter, platinbasierter Chemotherapie ist prinzipiell im Stadium IIIA<sub>1</sub> und IIIA<sub>2</sub> indiziert. Der Nutzen einer postoperativen Mediastinalbestrahlung sollte beim Befall von mediastinalen Lymphknoten (N2) geprüft werden (Goeckenjan et al., 2010).

Die Therapie für Patienten des Stadiums IIIA<sub>3</sub> sollte interdisziplinär und individuell entschieden und an Zentren durchgeführt werden. Albain et al. konnten beim Vergleich einer simultanen neoadjuvanten Radiochemotherapie mit nachfolgender Resektion und folgender adjuvanter Chemotherapie mit einer definitiven Radiochemotherapie ohne

Resektion insgesamt keinen Unterschied im medianen Überleben feststellen (Albain et al., 2009). Bisher wird in diesem Stadium daher die definitive Radiochemotherapie empfohlen. Ein trimodales Vorgehen, d.h., neoadjuvante Therapie, Operation, adjuvante Therapie, sollte nach Albain et al. nur dann erfolgen, wenn ein mediastinales Ansprechen, die Wahrscheinlichkeit einer R0-Resektabilität ohne Pneumektomie sowie ein stabiler Allgemeinzustand gegeben sind (Albain et al., 2009).

Im Stadium IIIB ist nach der „Interdisziplinären S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft“ primär eine Radiochemotherapie indiziert, wobei die simultane der sequentiellen Therapie überlegen ist (Goeckenjan et al., 2010). Auch hier werden cisplatinbasierte Chemotherapieprotokolle gewählt. In begründeten Einzelfällen kann im Stadium IIIA<sub>4</sub>/IIIB ein multimodaler Behandlungsansatz – am besten im Rahmen einer Studie – mit integrierter Operation erfolgen (Goeckenjan et al., 2010).

Neben einer palliativen, platinbasierten Kombinationschemotherapie rücken im Stadium IV multimodale, zielgerichtete Therapieansätze in den Vordergrund, die die Prognose, z.B. durch die Hinzunahme von neueren Substanzen wie Pemetrexed oder dem VEGF-Antikörper Bevacizumab beim nicht-plattenepithelialen NSCLC, verbessern können (Goeckenjan et al., 2010). Des Weiteren spielt die palliative Bestrahlung von singulären oder multiplen Nebennieren-, Hirn- oder Knochenmetastasen (hier auch zur Schmerzlinderung) sowie bei metastatischer Myelonkompression zur Verhinderung einer Querschnittslähmung, dann je nach Klinik in Kombination mit einer neurochirurgisch entlastenden Operation sowie einer begleitenden, hochdosierten Steroidtherapie, eine entscheidende Rolle (Goeckenjan et al., 2010; Greiner und Gruber, 2001; Sorensen et al., 1994). Liegen Knochenmetastasen vor, so wird neben der palliativen Systemtherapie eine regelmäßige Bisphosphonatgabe zur Verringerung der Inzidenz von pathologischen Frakturen, Spinalkanalkompressionen und Hyperkalzämien durchgeführt, die insbesondere in der Kombination mit einer Strahlentherapie sehr effektiv ist und auch analgetische Wirkung haben kann (Berenson, 2005; Goeckenjan et al., 2010; Rosen et al., 2003; Wong und Wiffen, 2002).

### 1.9.1.1 Molekulare, zielgerichtete Therapiemöglichkeiten

In den letzten Jahren wurde das therapeutische Armamentarium zur Behandlung der fortgeschrittenen Tumorstadien des NSCLC um einige molekulare, zielgerichtete Therapieansätze erweitert, welche spezifisch auf die Pathomechanismen des Tumors ausgerichtet sind. Bereits 1984 entwickelten Masui et al. monoklonale Antikörper, die an die extrazelluläre Domäne des EGFR binden und das Tumorwachstum von Lungen- und Vulvakarzinomzellen in Mausmodellen erheblich inhibieren (Masui et al., 1984).

Insbesondere Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge profitieren besonders – der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und das Ziel, diesen in seiner Aktivität zu hemmen, waren und sind hier Schwerpunkt der Forschungen. Es konnte herausgefunden werden, dass aktivierende „driver“-Mutationen im Gen des EGFR, die zu einer anhaltenden Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden führen, mit der Wirksamkeit von so genannten niedermolekularen EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), die an die intrazelluläre Domäne des EGFR binden, korrelieren (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Riely et al., 2006). In einer Studie von Lynch et al. des Cancer Centers Boston aus dem Jahr 2004 lagen diese Mutationen in 8 % der Tumorproben vor; Paez et al. wiesen 2004 diese Genveränderungen in 15 von 58 unselektierten Tumorproben asiatischer Patienten nach, was einer Häufigkeit von 26 % entspricht; auch bei Riely et al. zeigte sich 2006 mit 24 % ein höherer Anteil an EGFR-Mutationen als bei Lynch et al., wobei hier eine deutliche Assoziation mit einer asiatischen Herkunft festgestellt wurde.

Durch eine reversible, selektive Bindung dieser TKI – wie z.B. der 4-Anilinoquinazoline Gefitinib und Erlotinib – an die intrazelluläre, katalytische ATP-Domäne des EGFR, konkurrieren sie als kompetitiver Inhibitor um ATP und verhindern so die EGFR-Autophosphorylierung (Wakeling et al., 2002). Gefitinib wurde 2003 von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA zur Therapie von lokal fortgeschrittenen und metastasierten NSCLC bei Patienten mit Chemotherapieversagen mit cisplatin- und docetaxelbasierten Therapien zugelassen, nachdem es in zwei Phase-II-Studien eine klinisch relevante Antitumoraktivität zeigte (Fukuoka et al., 2003; Kris et al., 2003). Jedoch konnte dieses Ergebnis in der placebokontrollierten und randomisierten ISEL-Studie (**I**ressa **S**urvival **E**valuation in **L**ung **C**ancer) nicht reproduziert werden (Thatcher

et al., 2005); in der Subgruppenanalyse ließ sich hingegen ein Überlebensvorteil bei Asiaten und Niemalsrauchern finden. Die 2009 veröffentlichte IPASS-Studie (**Iressa Pan Asia Study**) zeigte, dass Gefitinib in der Erstlinientherapie bei Adenokarzinompatienten ostasiatischer Herkunft mit positivem EGFR-Mutationsstatus (Exon-19-Deletion oder L858R-Punktmutation) zu einer signifikanten Reduktion des Progressionsrisikos um 52 % im Vergleich zu einer Chemotherapie mit Carboplatin/Paclitaxel führte (Mok et al., 2009).

In der plazebokontrollierten BR21-Studie wurde durch Erlotinib nach Versagen der Erst- und Zweitlinientherapie ein Überlebensvorteil von zwei Monaten erzielt, wobei eine asiatische Herkunft, der histologische Nachweis eines Adenokarzinoms sowie Niemalsrauchen unabhängige, signifikante Prädiktoren für ein gutes Therapieansprechen waren (Shepherd et al., 2005). Neben einer Verbesserung der Lebensqualität kann durch Erlotinib die Zeit bis zum Einsetzen von typischen tumorassoziierten Symptomen wie Husten, Dyspnoe und Schmerzen verlängert werden; auch deshalb sollten TKI in der Palliativtherapie bei entsprechendem Mutationsstatus eingesetzt werden (Bezjak et al., 2006; Shepherd et al., 2005). Erlotinib wurde im November 2004 durch die FDA für die Zweit- und Drittlinientherapie von chemotherapieresistenten NSCLC zugelassen. Sharma et al. verglichen 2007 das schlechtere Abschneiden von Gefitinib in der ISEL- mit dem von Erlotinib in der BR21-Studie und stellten fest, dass zum Einen Erlotinib in der Maximaldosis (150 mg = maximal tolerierte Dosis, MTD) und Gefitinib in einer niedrigeren Dosis (250 mg bei einer MTD von 600 mg) appliziert wurde und dass es zum Anderen Unterschiede in der Patientenrekrutierung gegeben hatte (Sharma et al., 2007).

Zu den häufigsten Nebenwirkungen werden in der Packungsbeilage eine dosisabhängige Diarrhoe, das Auftreten von diversen Hautveränderungen, u.a. dem Akne-ähnlichen Exanthem „Rash“, Infektionen, Appetit- und Gewichtsverlust, Magenschmerzen, Verdauungsstörungen, Magen- oder Darmblutungen bzw. -perforationen, Depression, Müdigkeit, verschlechterte Blutwerte für die Leberfunktion und interstitielle Lungenerkrankungen angegeben.

Der papulopustulöse Hautausschlag („Rash“) kommt mindestens bei 2/3 aller Patienten vor, die mit EGFR-Inhibitoren therapiert werden, wobei die Inzidenz unter einer Therapie

mit monoklonalen Antikörpern deutlich höher ist als unter einer TKI-Behandlung. Er betrifft hauptsächlich das Gesicht, den oberen Thorax und Rücken, manifestiert sich innerhalb von zwei bis drei Tagen nach Beginn der Therapie und verschlimmert sich in den nächsten ein bis drei Wochen (Abdullah et al., 2012; Busam et al., 2001; Perez-Soler et al., 2005). Durch die Inhibierung des EGFR, der in der Signalübertragung der Haut eine Schlüsselrolle besitzt, kommt es zu einer entarteten Instandhaltung des Epitheliums; dies führt zu einer veränderten Reifung der Hautschichten, einer oberflächlichen Infiltration von Entzündungszellen in die perifollikulären, hyperkeratotischen Hautschichten sowie einer eitrigen, oberflächlichen Follikulitis. Alle diese Prozesse bewirken letztendlich eine Ausdünnung der Epidermis und somit der schützenden Barrierefunktion der Haut, was eine verstärkte Sensitivität gegenüber UV-Strahlung sowie eine verzögerte Wundheilung zur Folge haben (Abdullah et al., 2012; Busam et al., 2001; Lacouture, 2006). Die aufgeführten dermatologischen Toxizitäten können eine Dosisreduktion und eine Unterbrechung bzw. eine Beendigung der Therapie mit EGFR-Inhibitoren nötig machen (Rhee et al., 2005). Zusätzlich kann es zu einer signifikanten Verschlechterung der Lebensqualität kommen; die Patienten leiden aufgrund der Hautveränderungen unter Ängsten, Frustrationen und Depressionen und berichten von einem sozialen Rückzug (Wagner und Lacouture, 2007).

Zu weiteren Toxizitäten, die die Haut und ihre Anhangsgebilde betreffen, zählen Nagel-, Wimper-, Haarveränderungen, Bindehautentzündungen, Hornhautentzündungen, Geschwüre, Perforationen, Pruritus, Xerosis, Erytheme und Photosensibilität (Abdullah et al., 2012). Von Lacouture und Lai wurden diese Veränderungen als PRIDE-Syndrom zusammengefasst: "**P**apulopustules and/or **p**aronychia, **R**egulatory abnormalities of hair growth, **I**tching, and **D**ryness due to **E**pidermal growth factor receptor inhibitors" (Lacouture und Lai, 2006).

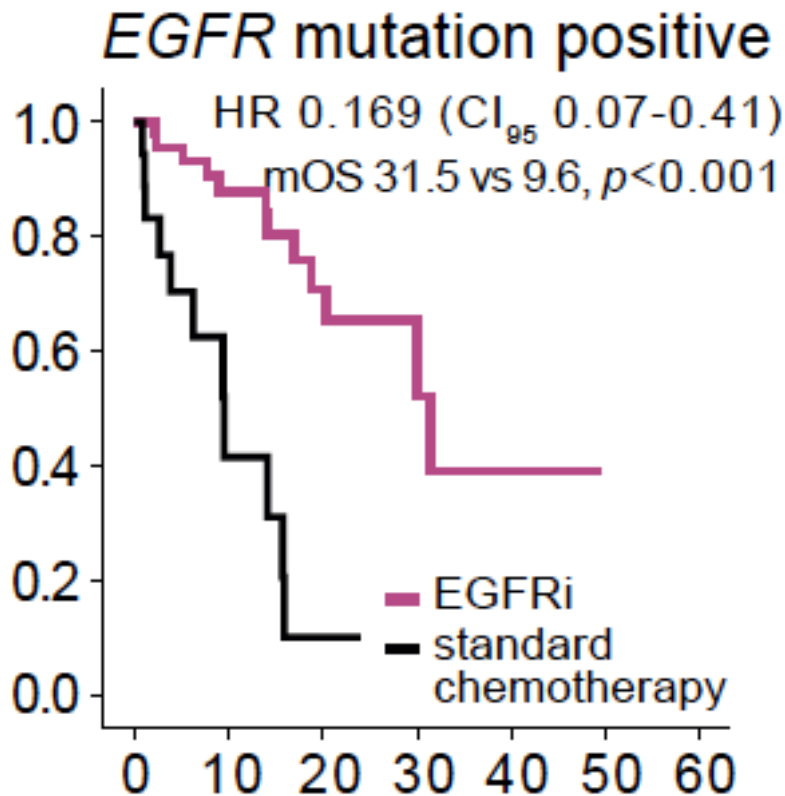
Das Auftreten dieser toxischen Hautveränderungen und auch deren Intensität belegen die Wirksamkeit der EGFR-Antagonisten; dieses Phänomen konnte in mehreren Studien für Cetuximab bei metastasierten kolorektalen Tumoren (Cunningham et al., 2004; Lenz et al., 2006) als auch für Erlotinib bei NSCLC beobachtet werden, wobei eine Zunahme der Intensität des Hautausschlages mit Rezidivfreiheit und Überlebensrate positiv korrelierte (Wacker et al., 2007). In der TOPICAL-Studie empfahlen Lee et al. 2012,

dass alle Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC Erlotinib als Erstlinientherapie erhalten sollten, denen eine Chemotherapie nicht zumutbar sei; bei den 56 % der Patienten, die unter der TKI-Behandlung einen Rash entwickelt hatten, waren das Gesamtüberleben als auch das progressionsfreie Überleben signifikant verlängert (Lee et al., 2012).

In der an 42 Kliniken in Spanien, Frankreich und Italien durchgeführten und im März 2012 veröffentlichten EURTAC-Studie (**E**uropean **R**andomised Trial of **T**arceva vs. **C**hemotherapy) an erstmals kaukasischen Patienten war Erlotinib einer platinbasierten Standard-Chemotherapie mit median 9,7 Monaten gegenüber median 5,2 Monaten hochsignifikant überlegen. Bereits 2011 wurde auf dem Kongress der „American Society of Clinical Oncology“ (ASCO) der Vorteil einer Erstlinientherapie mit einem TKI gegenüber einer Chemotherapie bei positivem Mutationsstatus bestätigt (Rosell et al., 2012).

Das „Clinical Lung Cancer Genome Project“ (CLCGP) und das „Network Genomic Medicine“ (NGM) konnten 2013 in einer prospektiven Analyse von 3.863 Patienten mit genombasierter Diagnose zeigen, dass die molekulare Diagnostik von Adenokarzinompatienten für gerichtete Therapien zu einem signifikant besseren Überleben führt (Seidel et al., 2013). Die Patienten, die aktivierende Mutationen im EGFR, welche in diesem großen Kollektiv in 7,2 % der Fälle vorlagen, besaßen und mit einem EGFR-Inhibitor therapiert wurden, überlebten länger (medianes Gesamtüberleben: 31,5 Monate) als die Patienten mit gleicher Mutation, die keine EGFR-Inhibitoren sondern lediglich eine Standardchemotherapie erhielten (medianes Gesamtüberleben: 9,6 Monate).





**Abb. 1: Therapie mit EGFR-Inhibitoren bei EGFR-mutierten Lungenkarzinomen verbessert das Überleben deutlich**

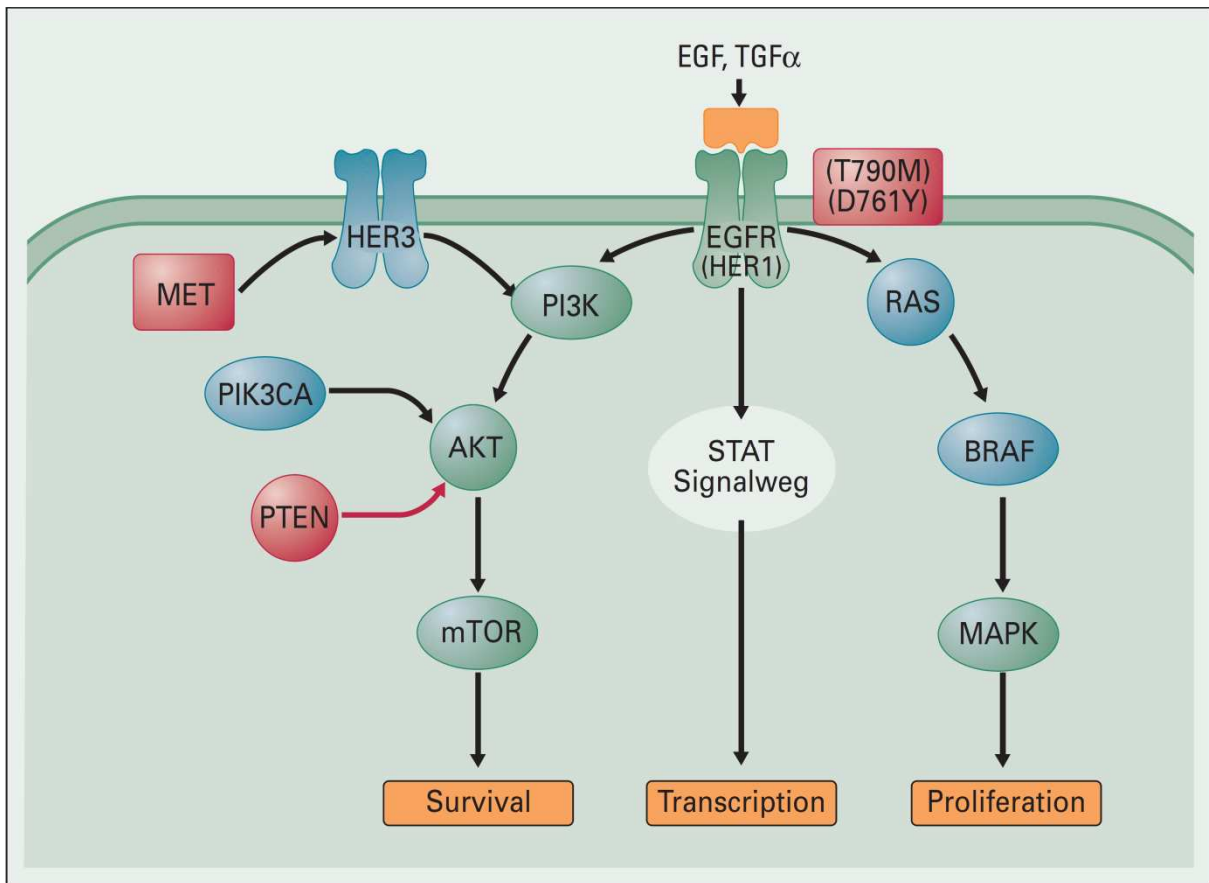
(aus (Seidel et al., 2013)) Gezeigt wird das Gesamtüberleben (mOS = median overall survival) für Patienten mit positivem EGFR-Mutationsstatus, die mit EGFR-Inhibitoren (mOS: 31,5 Monate) oder Standardchemotherapie (mOS: 9,6 Monate;  $p < 0,001$ ) therapiert wurden. Die y-Achse gibt die Wahrscheinlichkeit zu überleben (= probability of survival) und die x-Achse die Anzahl der Monate (= month) an.

Das Therapieansprechen der TKI kann jedoch durch sogenannte intrinsische und erworbene Therapieresistenzen negativ beeinflusst werden. Bei ca. 16 - 36 % aller Patienten mit NSCLC können aktivierende Mutationen des K-RAS-Gens, die zu einer EGFR-unabhängigen Aktivierung von MAPK führen und mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, bestehen (Marchetti et al., 2009; Sharma et al., 2007). Solche K-RAS-Mutationen treten besonders bei Patienten mit einer langen Raucheranamnese auf (Ahrendt et al., 2001; Rodenhuis et al., 1988). Sie betreffen meist die Codons 12 und 13 des Exons 2 und kommen nahezu nie gemeinsam mit einer EGFR-Mutation vor (Eberhard et al., 2005; Massarelli et al., 2007; Pao et al., 2005a). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass K-RAS-Mutationen mit einem Therapieversagen von Anti-

EGFR-Therapeutika wie Erlotinib und Gefintib (Eberhard et al., 2005; Han et al., 2006; Massarelli et al., 2007; Pao et al., 2005a) sowie Cetuximab und Panitumumab (Benvenuti et al., 2007; De Roock et al., 2008; Khambata-Ford et al., 2007; Lievre et al., 2006) verbunden sind.

Eine Substitution von Methionin durch Threonin an Codon 790 (T790M) in Exon 20 wird bei ca. 50 % der Patienten mit NSCLC gefunden, die zunächst positiv auf eine Therapie mit TKI angesprochen haben (Kobayashi et al., 2005; Kosaka et al., 2006; Kwak et al., 2005; Pao et al., 2005b; Sharma et al., 2007). Diese T790M-Sekundärmutation, die zum größten Teil in behandelten Tumorproben auftritt, führt zu einer Veränderung der dreidimensionalen Konformation der ATP-Bindungstasche der katalytischen Tyrosinkinasedomäne und verhindert dadurch die Bindung von TKI an den Rezeptor; somit kommt es zu einer sekundären, erworbenen Resistenz gegenüber Gefitinib bzw. Erlotinib (Kosaka et al., 2006; Pao et al., 2005b; Yun et al., 2007). Die japanische Studie von Kosaka et al. zeigte 2006, dass die T790M-Sekundärmutation besonders bei Frauen, die niemals geraucht haben und eine Deletionsmutation in Exon 19 besitzen, auftritt (Kosaka et al., 2006). Eine bedeutende Herausforderung wird es daher sein, Hemmstoffe zu entwickeln, die solche Mutationen und konsekutiven Konformationsänderungen überwinden können.

Des Weiteren könnte eine Amplifikation des MET-Protoonkogens, die zu einer EGFR-unabhängigen HER3-vermittelten Aktivierung des PI3K-Akt-Signaltransduktionsweges führt, an der erworbenen anti-EGFR-Resistenz beteiligt sein (Engelman et al., 2007).



### Abb.2: Molekulare Resistenzmechanismen des EGFR

(aus (Heukamp und Büttner, 2010)) Obwohl durch die Behandlung mit EGFR-TKI Ansprechraten von bis zu 80 % bei Patienten mit aktivierenden EGFR-Mutationen beobachtet werden, kommt es bei fast allen Patienten im Verlauf zu einem Rezidiv der Erkrankung. Hierbei spielen mehrere molekulare Resistenzmechanismen, die in Abbildung 2 zusammengefasst werden, eine Rolle:

**T790M:** Diese Sekundärmutation verhindert die Bindung von TKI an den Rezeptor, es kommt zu einer sekundären, erworbenen Resistenz gegenüber TKI. Eine Therapie mit irreversiblen 3. Generations-TKIs kann versucht werden.

**MET-Amplifikation:** Diese Amplifikation führt zu einer EGFR-unabhängigen HER3-vermittelten Aktivierung des PI3K-Akt-Signaltransduktionsweges und kann mit Crizotinib behandelt werden

Verlust des Tumorsuppressorgens **PTEN:** bisher keine Behandlungsoption

Ein weiterer, genetisch identifizierbarer Angriffspunkt von molekularen, zielgerichteten Therapeutika in Adenokarzinomen der Lunge stellen Inversionen in Chromosom 2p dar, die zu einer transformierenden EML4-ALK-Genfusion („echinoderm microtubule-associated-protein-like 4 gene“ und „anaplastic lymphoma kinase“) und somit zu einem Onkogen führen. Dieser Gendefekt kodiert eine aktivierende Tyrosinkinase, die sich mit

EGFR-Mutationen ausschließt und eine Inzidenz von ca. 5 - 11,3 % besitzt (Lin et al., 2009; Sequist et al., 2011). Patienten mit einer EML4-ALK-Translokation sind häufig junge Männer, die nie geraucht haben und auf eine Therapie mit EGFR-TKI nicht ansprechen (Shaw et al., 2009). Histologisch handelt es sich um Adenokarzinome, die im Vergleich zu denen mit EGFR-Mutation oder Wildtyp, signifikant häufiger ein ergiebiges, siegelringartiges Wachstumsmuster aufweisen; in 61 % zeigt sich vorherrschend ein solides Wachstum, wobei ein azinäres und ein bronchioalveoläres in nur 31 % bzw. 8 % auftreten (Shaw et al., 2009).

Bei einem positiven Nachweis des EML4-ALK-Fusionstranskripts können durch Crizotinib, das die daraus resultierende, aktivierende Tyrosinkinase hemmt, Ansprechraten von bis zu 57 % erzielt werden (Kwak et al., 2010). Aufgrund der positiven Datenlage kam es zu einem beschleunigten Zulassungsverfahren durch die US-amerikanische Zulassungsbehörde FDA.

Im Rahmen der Therapiestratifizierung wird im Zusammenhang mit der histopathologischen Primärdiagnostik bei Patienten mit Erstdiagnose eines Adenokarzinoms der Lunge, bei denen eine Systemtherapie in Frage kommt, eine stufenweise molekulare Diagnostik auf K-RAS, EGFR und EML4-ALK im Hinblick auf eine personalisierte Medizin durchgeführt. Hierbei sollte initial getestet werden, ob eine K-RAS-Mutation vorliegt, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist und besonders bei Patienten mit einer langen Raucheranamnese besteht (Ahrendt et al., 2001; Rodenhuis et al., 1988), da Doppelmutationen bei der häufigsten aller Mutationen (15 - 36 %), K-RAS, nur selten vorkommen (Horn und Pao, 2009; Marchetti et al., 2009).

### **1.10 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)**

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist ein transmembranärer Tyrosinkinase-Rezeptor; er gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren (EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 und HER4/ErbB4) und ist auf der Oberfläche der meisten Epithelzellen zu finden. Diese Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären, transmembranären und intrazellulären Domäne und übermitteln Signale von extrazellulären Wachstumsfaktoren – wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), dem transformierenden

Wachstumsfaktor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) oder auch Neuregulinen – an intrazelluläre Signalkaskaden. Sie sind somit für die Embryonalentwicklung, die Physiologie des Menschen aber auch bei der Pathogenese vieler Erkrankungen von entscheidender Bedeutung. So ist der EGFR bei vielen Tumorentitäten überexprimiert und/oder mutiert und überträgt wichtige karzinogene Eigenschaften, wie Zellzyklusprogression, Apoptose, Angiogenese und Metastasierung (Ciardiello und Tortora, 2001; Sobol et al., 1987).

### **1.10.1 Struktur des EGFR**

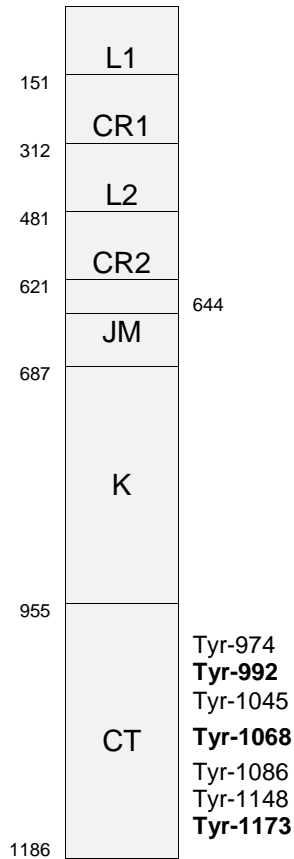
Das EGFR-Gen liegt auf Chromosom 7p12, besteht aus 28 Exonen und kodiert ein Protein aus 1186 Aminosäuren, das durch eine N-terminale Spaltung und konsekutive Insertion in die Zellmembran entsteht. Es müssen > 20 % des Rezeptors N-glykolisiert sein, bevor das Protein an die Zelloberfläche transloziert werden kann (Sliker et al., 1986).

Die extrazelluläre Domäne des EGFR fungiert als Ligandenbindungsstelle und besteht aus vier Regionen (s. Abb. 3). Die Bezeichnung „L“ bedeutet ligandenbindend, „CR“ steht für Cystein-reich. L1 und L2 werden aus  $\beta$ -Helix-Faltblättern aufgebaut und ähneln korrespondierenden Domänen des Insulin-ähnlichen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (IGFR-1), ein Ligand bindet dabei zwischen L1 und L2 (Garrett et al., 2002; Garrett et al., 1998; Ogiso et al., 2002). CR1 und CR2 besitzen mehrere kleine Module, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Eine große Schleife in CR1 interagiert mit der CR1-Domäne eines zweiten Rezeptors, wenn eine Dimerisierung stattgefunden hat.

Die Transmembrandomäne wird durch eine  $\alpha$ -Helix aufgebaut, die zum Teil in die juxtamembranäre Domäne hineinreicht (Rigby et al., 1998); sie besitzt diverse regulatorische Eigenschaften wie z.B. die basolaterale Sortierung von EGFR-polarisierten Zellen, die ligandenabhängige Rezeptorinternalisierung und die Assoziation mit Proteinen wie Calmodulin und Eps 8 (Castagnino et al., 1995; He et al., 2002; Kil und Carlin, 2000; Li und Villalobo, 2002; Martin-Nieto und Villalobo, 1998).

Die Interzellulardomäne des EGFR wird aus einer Kinasedomäne, die analog derer anderer Tyrosinkinase ist, sowie einer regulatorischen C-terminalen Sequenz gebildet (Stamos et al., 2002). Adenosintriphosphat (ATP) bindet zwischen dem N-terminalen

Ende, einem  $\beta$ -Faltblatt und einer größeren  $\alpha$ -helikalen Schleife am Carboxyl-Terminus, das mehrere Tyrosin- und Serinreste enthält. Durch die Phosphorylierung dieser Reste wird die Funktion des EGFR über die Aktivierung diverser nachgeschalteter Signaltransduktionskaskaden bestimmt.



### Abb. 3: Schematische Darstellung des EGFR

Alle Zahlen entsprechen der Codonzahl. L1 und L2 sind die ligandenbindenden Domänen. CR1 und CR2 sind Cystein-reich. 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, – inklusive Tyr-992, Tyr-1068 und Tyr-1173, die für mein Projekt von Bedeutung waren – sind Teil des C-Terminus (CT).

#### 1.10.2 Aktivierung des EGFR durch Ligandenbindung

Durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGFR entstehen ligandeninduzierte Dimere mit anderen ErbB-Rezeptoren und die enzymatische Akti-

vität der intrazellulären Kinasedomäne wird über die transzelluläre Kommunikation des Liganden stark augmentiert (Schlessinger, 2002). Hierbei können entweder Homodimere mit einem weiteren EGFR oder Heterodimere mit ErbB2, ErbB3 oder ErbB4 gebildet werden. ErbB2 (HER2) ist als bevorzugter Bindungspartner zu nennen.

Spezielle Liganden, unter anderem der EGF und der TGF $\alpha$ , konnten für alle EGFR außer HER2 gefunden werden. Nach der Bindung eines solchen Liganden findet eine Dimerisierung des Rezeptors zur Bildung eines Homo- oder Heterodimers mit einem anderen Mitglied der EGFR-Familie statt. Diese Dimerisierung führt zu einer Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste der Interzellulardomäne sowie einer strukturellen Veränderung dieser Domäne, wobei eine trans-Übertragung des ATP- $\gamma$ -Phosphats an Tyrosinreste von anderen intrazellulären Proteinen oder der eigenen C-terminalen Domäne erfolgt. Eine Autophosphorylierung kann an den Tyrosinresten 974, 992, 1045, 1068, 1086, 1148 und 1173 (s. oben) ablaufen. Des Weiteren ist eine Aktivierung durch Src und JAK2 an den Tyrosinresten 845 und 1101 möglich. Nachdem diese Tyrosinreste phosphoryliert worden sind, dienen sie als Bindungsstellen für viele signalübertragende Botenstoffe, die wiederum multiple Signaltransduktionskaskaden in die Wege leiten können, die zu Zellwachstum, Migration, Metastasenbildung, Umgehung des Apoptosekreislaufes und Angiogenese führen; all diese Mechanismen führen zur Entstehung eines Krebsphänotyps (Arteaga, 2002). Je nach Phosphorylierungsmuster spielen hierbei insbesondere Signalwege der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) und Akt (Proteinkinase B) eine entscheidende Rolle (s. unten).

### **1.10.3 Beeinflussung des EGFR-Signalweges auf molekularer Ebene**

Die Signalweitergabe durch ErbB-Rezeptoren wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an die Extrazellulärdomäne der Rezeptoren initiiert. Die ligandeninduzierte Konformationsänderung der Extrazellulardomäne führt zu einem Zusammentreffen der zytoplasmatischen Kinasedomänen zweier Rezeptormoleküle. Die so entstandene Verbindung wurde zunächst als ausreichend betrachtet, um den autoinhibierten Zustand der Kinasedomänen aufzulösen (Bose und Zhang, 2009; Ferguson, 2008). Das Vorgehen scheint jedoch komplexer zu sein, da lediglich ein Teil der dimerisierten ErbB-Rezeptoren katalytisch aktiv ist (Gadella und Jovin, 1995; Moriki et al., 2001). Außerdem

ist es wahrscheinlich, dass die Rezeptor-Dimerisierung auch in der Abwesenheit eines Liganden kontinuierlich und reversibel abläuft (Chung et al., 2010). Durch kristallographische Studien konnte gezeigt werden, dass die katalytische Aktivität auf Dimere, die eine spezielle Anordnung der Kinasedomänen aufweisen, den sogenannten asymmetrischen Dimeren, beschränkt sein könnte (Jura et al., 2009; Qiu et al., 2008; Red Brewer et al., 2009; Zhang et al., 2006). Des Weiteren zeigten Zhang et al., dass die autoinhibierte Konformation der EGFR-Kinasedomäne der von Src und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) ähnelt und die Bildung eines asymmetrischen Dimers, bei der das C-terminale Ende einer Kinasedomäne genau wie Cyclin in aktivierten CDK/Cyclin-Komplexen agiert, zu einer EGFR-Aktivierung führt. Dieser durch zwei Kinasedomänen gebildete CDK/Cylin-ähnliche Komplex erklärt hiernach die Aktivierung der EGFR-Rezeptorfamilie durch Homo- und Heterodimerisierung, wenn die Konzentration des Rezeptors vor Ort erhöht ist (Zhang et al., 2006).

Bisher konnten jedoch keine Faktoren gefunden werden, die den Anteil der aktiven Dimere, die aus dem Gesamtbestand der dimerisierten Rezeptoren gebildet werden, bestimmen. Dieser Anteil könnte einfach von der Rate an Spontankonversionen vom symmetrischen zum asymmetrischen Dimer abhängig sein. Alternativ könnte der Bestandteil an aktiven Dimeren nicht nur durch rezeptoreigene Eigenschaften oder einem Gleichgewicht zwischen den beiden Gruppen an Dimeren festgelegt sein, sondern könnte durch zytoplasmatische aktivierende Proteine beeinflusst werden. Solche Aktivatoren würden die Zelle mit der Fähigkeit ausstatten, die Anzahl der aktiven signalgebenden Rezeptoren aus einem bestimmten Pool an ligandengebundenen Rezeptoren je nach den zellulären Erfordernissen genauestens abzustimmen. Bisher wurden jedoch keine zytoplasmatischen Aktivatoren der ErbB-Rezeptoren identifiziert. Im Folgenden werden Cytohesine als zytoplasmatische EGFR-Aktivatoren vorgestellt.

#### **1.10.4 EGFR-Mutationen und ihre molekularpathologische Bedeutung**

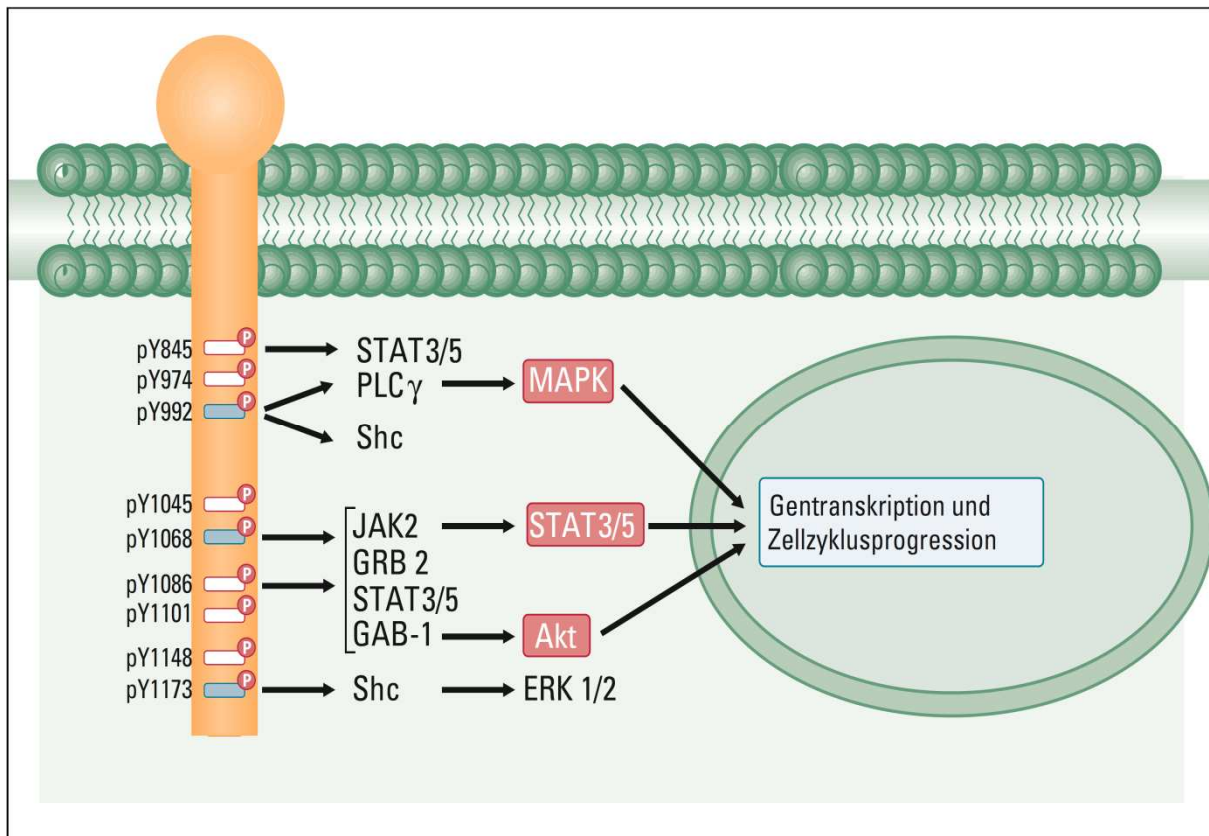
2004 konnten Lynch et al. zeigen, dass somatische Mutationen in der Tyrosinkinase-Einheit des EGFR-Gens in acht von neun Patienten, die auf eine Therapie mit dem oralen Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib ansprachen, nachweisbar waren; im Vergleich dazu konnten bei den sieben Patienten, die kein Ansprechen zeigten, solche Muta-



tionen nicht gefunden werden (Lynch et al., 2004). Des Weiteren bestätigten Lynch et al. – übereinstimmend mit Fukuoka et al., Kris et al., Kosaka et al. und Paez et al. – dass die meisten Patienten, die von einer Therapie mit TKI profitierten, Frauen waren, niemals geraucht hatten und gut bis mäßig differenzierte bronchiolo-alveoläre bzw. Adenokarzinome besaßen; zusätzlich traten EGFR-Mutationen insbesondere bei asiatischen Patienten aus Japan auf, die folglich von einer TKI-Therapie gut profitierten (Fukuoka et al., 2003; Kosaka et al., 2004; Kris et al., 2003; Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004). Mittels DNA-Sequenzierung aller Exone des EGF-Rezeptors konnten zum Einen Punktmutationen, die zu einem Austausch einer Aminosäure führen, und zum Anderen Deletionsmutationen innerhalb Exon 18 bis 21 der Tyrosinkinasedomäne um die ATP-Bindungs-Tasche entdeckt werden (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004). Verschiedene in-frame-Deletionen des Exons 19, die durch eine Deletion eines einzigen Nukleotids zwischen den Codons 746 und 750 entstehen, treten mit 45 % aller EGFR-Mutationen am häufigsten auf; am zweithäufigsten – in 40 - 45 % der Fälle – kommt es zu einem Austausch einer Aminosäure, die zu der Mutation L858R in Exon 21 als Folge einer Substitution eines Nukleotids führt (Kosaka et al., 2004; Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Sharma et al., 2007). Diese beiden Mutationsarten vermitteln über überlebenswichtige, nachgeschaltete, hyperaktivierte Signaltransduktionskaskaden (s. unten: z.B. Ras-Raf-MAPK, ERK1 und ERK2, PI3K-Akt) antiapoptotische Eigenschaften sowie onkogene Effekte des EGFR, die aus einer erhöhten Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors resultieren (Sordella et al., 2004). Zusätzlich bewirken die genannten Mutationen eine erhöhte Sensitivität des EGFR gegenüber Anilinoquinazolin-Inhibitoren wie Gefitinib oder Erlotinib; Lynch et al. gehen davon aus, dass dies aus einer Umpositionierung wichtiger Aminosäuren um die ATP-Bindungs-Tasche der Tyrosinkinasedomäne herrührt, die dadurch ihre Wechselwirkungen mit ATP und dessen kompetitiven Inhibitoren stabilisieren (Lynch et al., 2004). In einem direkten Vergleich zwischen Exon-19-Deletionsmutationen und Punktmutationen in Exon 21, wie z.B. L858R, zeigte sich, dass Exon-19-Mutationen deutlich besser auf TKI wie Gefitinib oder Erlotinib ansprachen und Patienten mit solchen Mutationen ein statistisch signifikant längeres mittleres Überleben aufwiesen (Riely et al., 2006).

## 1.11 Der EGFR und seine Downstream-Faktoren

Im Folgenden werden die wichtigsten, spezifischen Signaltransduktionskaskaden erläutert, die durch den phosphorylierten EGFR, der von intrazellulären Proteinen erkannt wird, aktiviert werden. Hierbei sind insbesondere der Akt-, der MAPK- und der STAT3-Signalweg in der Tumorgenese von Lungenkarzinomen von entscheidender Bedeutung.



### Abb. 4: EGFR und weiterleitende Signaltransduktionskaskaden

(aus (Heukamp et al., 2008)) Eine Autophosphorylierung des EGFR kann an den Tyrosinresten 974, 992, 1045, 1068, 1148 und 1173 stattfinden; durch Src und Jak2 wird der EGFR an den Tyrosinen 845 und 1101 indirekt phosphoryliert. Nachfolgend kommt es zu einer Erkennung durch intrazelluläre Proteine, welche die spezifischen Signaltransduktionskaskaden über Protein-Protein-Interaktionen aktivieren.

#### 1.11.1 Akt/Proteinkinase B

Sowohl in der Regulation des Zellzyklus als auch der Apoptose spielt der Akt-Signaltransduktionsweg eine zentrale Rolle. Über die Mediation von Wachstumsfaktoren, z.B. EGF, Hormonen und extrazellulären Komponenten, fördert er direkt die Zell-

zyklusprogression und verhindert die Apoptose. Akt beeinflusst durch die Phosphorylierung vieler zellulärer Proteine die Regulation des Zellzyklus über den programmierten Zelltod direkt, moduliert die Transkription von pro- und anti-apoptotischen Faktoren, wie z.B. p53, und verändert den Zellmetabolismus. In Tumoren der Lunge (Brognard et al., 2001), des Pankreas (Cheng et al., 1996), der Schilddrüse (Vasko et al., 2004) und des Ovars (Yuan et al., 2000) konnte eine Akt-Überaktivierung durch Amplifikation der PKB/Akt-Gene oder als Ergebnis von Mutationen einzelner Bestandteile des Signalweges gefunden werden.

Die Proteinkinase B/Akt (PKB/Akt) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die drei besonders homologe Mitglieder, die PKB $\alpha$  (Akt 1), die PKB $\beta$  (Akt 2) und die PKB $\gamma$  (Akt 3), umfasst. Der EGFR-induzierte Akt-Signalweg wird durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) initiiert, der aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>), einen sekundären Botenstoff, der für die Translokation von PKB/Akt an die Zellmembran essentiell ist, an der er durch die phosphoinositidabhängige Kinase-1 (PDK-1) phosphoryliert werden kann, generiert (Andjelkovic et al., 1997). Die PI-3K selbst wird durch eine SH2-Domäne des p85-Adaptermoleküls aktiviert, die an den Phosphotyrosinrest des EGFR bindet (Jorissen, 2003).

Die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) ist ein Tumorsuppressor und inaktiviert den Akt-Signalweg über eine Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub>. Kommt es durch eine Mutation im Gen von PTEN zu einer „loss-of-function“, ist der Akt-Signalweg überaktiviert.

Zimmer et al. zeigten, dass insbesondere die Aktivierung von PKB/Akt durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 992 von mutierten EGFR im Vergleich zum EGFR-Wildtyp signifikant hochreguliert ist (Zimmer et al., 2009).

### **1.11.2 MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinasen**

Mitogenaktivierte Proteinkinasen sind Serin/Threonin Kinasen, die als Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden wichtig für die Steuerung verschiedener Prozesse wie der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellproliferation sowie des Zelltodes sind. Es gibt diverse MAPK, die von EGFR phosphoryliert bzw. aktiviert werden, ERK1 (p44) und

ERK2 (p42) sind hier als die wichtigsten zu nennen; die folgende Darstellung beschränkt sich deshalb auf ERK1 und ERK2.

Durch eine Phosphorylierung von Tyr-1068 und Tyr-1086 des EGFR kann ein Komplex – bestehend aus dem Adaptermolekül Grb2 und dem „Ras exchange factor“ Sos – über die SH2-Domäne von Grb2 an EGFR binden (Batzer et al., 1994). Die Zusammenkunft von Grb2 und dem EGFR kann entweder direkt über Tyr-1068 und Tyr-1086 (s. oben) oder indirekt über die Verbindung von EGFR mit Shc über dessen Phosphotyrosin-Binde-Domäne (PTB), was schließlich zur Tyrosinphosphorylierung und Rekrutierung des Grb2/Sos-Komplexes an die Plasmamembran führt, von statten gehen (Sakaguchi et al., 1998). An der Zellmembran, gedockt an EGFR, initiiert Sos nun den Austausch des Ras-gebundenen Guanosin-5'-diphosphat (GDP) in Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und aktiviert dadurch die Serin/Threonin-Proteinkinase Raf-1 (Hallberg et al., 1994). Über die nachfolgende Beteiligung weiterer Kinasen werden schließlich ERK-1 und ERK-2 phosphoryliert, aktiviert und in den Nukleus transloziert, was nun die Phosphorylierung nukleärer Transkriptionsfaktoren katalysiert (Johnson und Vaillancourt, 1994). Die Aktivierung der Raf/ERK/MAPK-Kaskade durch Ras führt über einen negative-feedback-Mechanismus zur Phosphorylierung von Sos und damit zur Auflösung des Grb2/Sos-Komplexes; dadurch wird die Wirkungsdauer der Ras-Aktivierung durch den Wachstumsfaktor limitiert (Langlois et al., 1995).

Des Weiteren kann die MAPK durch den EGFR via eines Signaltransduktionsweges, in den die Proteinkinase C (PKC) involviert ist, aktiviert werden. Hierzu bindet zunächst die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) im Bereich der SH2-Domäne an den EGFR, sofern diese an Tyr-992 und Tyr-1173 autophosphoryliert ist (Chattopadhyay et al., 1999). Die aktivierte PLC $\gamma$  katalysiert daraufhin die Hydrolyse von Phosphatidyl-inositol-(4,5)-Diphosphat zu Inositol-(1,3,5)-Triphosphat (IP $_3$ ) und dem wichtigen second messenger 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP $_3$  bewirkt eine intrazelluläre Calciumerhöhung, was die Aktivität von Ca $^{2+}$ -abhängigen Enzymen beeinflusst, während DAG als Kofaktor für die Aktivierung der PKC und damit letztendlich der MAPK agiert.

Es konnte eine bedeutende Korrelation zwischen der Aktivität der MAPK und dem phosphorylierten Tyrosinrest 992 des EGFR gefunden werden (Zimmer et al., 2009).

### **1.11.3 Weitere Downstream-Signalwege des EGFR - STAT3**

Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT3) agiert im aktiven, phosphorylierten Zustand als zytoplasmatischer Transkriptionsfaktor und übermittelt als Mitglied der STAT-Protein-Familie Signale von extrazellulären Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen, wodurch Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung beeinflusst werden.

In EGFR-mutierten Adenokarzinomzellen der Lunge ist STAT3 sowohl an dem Tyrosinrest 705 (Tyr705), welches zu seiner Dimerisierung, nukleären Translokation und Bindung an DNA-Promotorregionen von z.B. Bcl-x<sub>L</sub>, Cyclin D1, c-Myc führt, als auch an dem Serinrest 727 (Ser727) phosphoryliert. Die Tyrosinphosphorylierung benötigt jedoch keine EGFR-Kinase-Aktivität, da gezeigt werden konnte, dass diese durch eine Behandlung mit Gefitinib nicht beeinflusst wird (Alvarez et al., 2006). Auch die Aktivität von src und JAK2 führt nicht zu einer Tyrosinphosphorylierung, sodass postuliert wird, dass eine bisher noch nicht identifizierte Kinase für die Phosphorylierung von STAT3 zuständig ist (Alvarez et al., 2006). Die Serinphosphorylierung (Ser727) von STAT3 in diesen Zellen benötigt hingegen EGFR sowie den durch ihn induzierten Ras-Raf-MAPK-Signalweg und wird schließlich über eine Erk1/Erk2-Aktivierung erzielt; diese Signalkaskade scheint für eine maximale Transkriptionsaktivität von STAT3 notwendig zu sein (Alvarez et al., 2006).

Die oben beschriebenen Ergebnisse wurden durch eine Forschungsarbeit des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn durch Zimmer et al. 2009 bestätigt: Hier wurde herausgefunden, dass die Aktivität von STAT3 – unabhängig von der EGFR-Kinase-Aktivität – zum karzinogenen Potential von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen beiträgt (Zimmer et al., 2009).

### **1.12 Cytohesine**

Cytohesine sind zytoplasmatische Aktivatoren des ErbB-Rezeptors, die eine Vielzahl von zellulären, regulatorischen Netzwerken kontrollieren. Die Cytohesin-Familie besteht aus vier sehr homologen Mitgliedern: Cytohesin-1, Cytohesin-2 (ARNO) und Cytohesin-3 kommen ubiquitär vor, Cytohesin-4 befindet sich nur in Zellen des Immunsystems

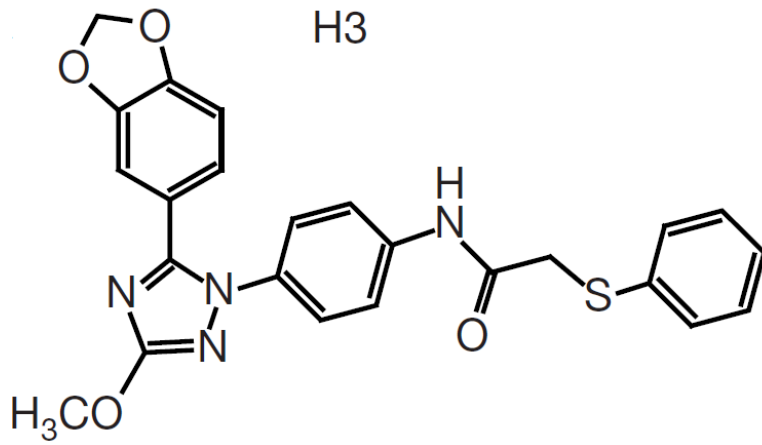
(Kolanus, 2007). Sie sind „guanine nucleotide exchange factors“ (GEF) für die ADP-Ribosylierungs-Faktoren (ARF), die zu der Familie der kleinen „Ras-like GTPases“ gehören, wobei eine Sec7-Domäne die Aktivität der GEF ausübt (Hafner et al., 2006). Genau wie im Falle anderer kleiner GTPasen hängt die ADP-Funktion besonders von der Aktivierung durch GEF ab (Bos et al., 2007). Da ARF an der Kontrolle von zytoskelettalen Prozessen, Zellmigration, dem vesikulären Transport und Signalketten beteiligt sind, spielen auch Cytohesine eine entscheidende, regulierende Rolle in diesen Prozessen (Casanova, 2007; Kolanus, 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass Cytohesine die EGFR-Aktivierung über eine direkte Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von dimerisierenden Rezeptoren sowie durch eine Erleichterung einer Konformations-Neuanordnung dieser Domänen erhöhen. Eine chemische Inhibition und ein Knock-down der Cytohesine verringern die EGFR-Aktivität, andersherum bewirkt eine Überexpression von Cytohesinen den gegenteiligen Effekt. Neben EGF beeinflussen Cytohesine also das Ausmaß der EGFR-Aktivierung stark. Während EGF ihre bekannte Aufgabe, die Autoinhibierung des ungebundenen Rezeptors zu bewirken, über die extrazelluläre Seite des Rezeptors ausüben, konnte durch eine Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Famulok des Life & Medical Sciences (LIMES) Institutes der Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in vitro gezeigt werden, dass sich Cytohesine über die zytoplasmatische Seite an der EGFR-Signalkette beteiligen bzw. diese entscheidend beeinflussen. Dies wird über eine Erhöhung der Anzahl der EGFR-Dimere, die die aktive, katalysierende Konformation aus dem Reservoir der ligandengebundenen EGFR-Dimere besitzen, sichergestellt (Bill et al., 2010).

### **1.13 Der Cytohesininhibitor SecinH3**

SecinH3 (= **Sec7-inhibitor H3**) wurde durch Hafner et al. 2006 als kleines Molekül, das als GEF-Antagonist für Cytohesine fungiert, indem es spezifisch an die Sec7-Domäne der Cytohesine 1-3 bindet, identifiziert (Hafner et al., 2006). Die Anwendung von SecinH3 an humanen Leberzellen zeigte, dass Cytohesine, die mit dem Insulinrezeptorkomplex interagieren, für die Insulinsignalkaskade notwendig sind und

dass eine Hemmung dieser durch SecinH3 schließlich zu einer hepatischen Insulinresistenz führt (Hafner et al., 2006).



**Abb. 5: Molekulare Struktur von SecinH3**

(aus (Hafner et al., 2006)) SecinH3 bindet spezifisch an die Sec7-Domäne der Cytohesine 1-3 und dient als GEF-Antagonist für Cytohesine.

### 1.14 Fragestellung

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Famulok konnte in vitro an H460-Zellen zeigen, dass ARNO/Cytohesin-1 die EGFR-Aktivierung über eine direkte Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von dimerisierenden Rezeptoren und durch die Erleichterung einer Konformations-Neuanordnung dieser Domänen erhöhen (Bill et al., 2010). Eine chemische Inhibition und ein Knockdown dieser Cytohesine verringern die EGFR-Aktivität, eine Überexpression von Cytohesinen hat den gegenteiligen Effekt zur Folge. EGF und Cytohesine beeinflussen das Ausmaß der EGFR-Aktivierung vermutlich stark. Während EGF die Autoinhibierung des ungebundenen Rezeptors über die extrazelluläre Seite des Rezeptors bewirken, konnten Bill et al. zeigen, dass sich Cytohesine über die zytoplasmatische Seite durch eine Erhöhung der Anzahl der EGFR-Dimere, die die aktive, katalysierende Konformation aus dem Reservoir der ligandengebundenen EGFR-Dimere besitzen, an der EGFR-Signalkette beteiligen (Bill et al., 2010).

Auf diesen Daten basierend ergab sich daher für mein Projekt die Fragestellung, ob Cytohesine in Adenokarzinomen der Lunge auch die Aktivierung von weiterleitenden Signalkaskaden unterhalb des EGFR beeinflussen können und ob dies als therapeutischer Angriffspunkt genutzt werden kann.

Diese Arbeit adressiert daher im Detail die folgenden experimentellen Fragestellungen:

- 1) Zeigen Adenokarzinome der Lunge eine differentielle Expression von Cytohesinen?
- 2) Korreliert die Expression von Cytohesinen mit der EGFR-Expression und/oder der EGFR-Phosphorylierung?
- 3) Gibt es eine Koexpression von Cytohesinen und pEGFR auf den gleichen Zellen?
- 4) Korreliert die Expression von Cytohesinen mit der Aktivierung von weiterführenden Signalwegen?
- 5) Lässt sich die Expression von Cytohesinen in vivo hemmen und kann dies zu einem reduzierten Tumorwachstum führen?



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Tumorproben**

Alle Tumorproben stammen aus dem Archiv der CIO (Centrum für Integrierte Onkologie)-Biobank des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn und wurden von Januar 1995 bis August 2003 archiviert. Sie wurden klinisch und pathologisch als die primäre und einzige neoplastische Läsion identifiziert und nach den WHO-Leitlinien durch mindestens zwei erfahrene Pathologen klassifiziert (Brambilla et al., 2001). Weitere Einschlusskriterien waren: Archivierung von ausreichendem Gewebe, Operationsdatum nicht vor 1995, keine neoadjuvante Radio- oder Chemotherapie.

#### **2.1.1 Routinediagnostik**

Die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome wurden im Zuge der Routinediagnostik formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Daraufhin fand eine Färbung der histologischen Schnitte nach den Standardprotokollen (z.B. Hämatoxylin-Eosin, Periodsäure-Leukofuchsin) statt. Das in Paraffin eingebettete Tumorgewebe wurde im kühlen, trockenen und dunklen Archiv gelagert und chronologisch nach dem Eingangsdatum sortiert.

#### **2.1.2 Patienteninformation**

Schließlich wurden mit Hilfe der PathoPro Datenbank des Instituts für Pathologie der Universität Bonn Personalien und allgemeine Tumordaten ermittelt. Detailliertere Patienteninformationen (z.B. Raucherstatus und berufliche Noxenexposition) wurden aus Patientenakten des Zentralarchives der chirurgischen Abteilung der Universität Bonn gewonnen.

#### **2.1.3 Patientenkollektiv**

Von mehr als 400 Adenokarzinomen der im Zeitraum von Januar 1995 bis August 2003 archivierten Lungentumorproben erfüllten lediglich 166 die bereits genannten

Einschlusskriterien, diese wurden zur weiteren Analyse vorbereitet. Aus 52 Adenokarzinomen wurde genomische DNA in geeigneter Qualität für die EGFR-Mutationsanalyse verwendet (Zimmer et al., 2009).

Zu diesem Kollektiv liegen Informationen zu Alter, Raucheranamnese, Lokalisation und Tumorstadium vor. Aus diesen Lungentumorproben wurden schließlich die ganzen Lungenschnitte zur Durchführung und Analyse der ARNO-Färbung angefertigt.

## **2.2 Tissue Micro Arrays (TMA)**

Tissue Micro Arrays (TMA) ermöglichen eine schnelle und kostengünstige Analyse einer großen Anzahl von Gewebeproben möglich. Da auf einem TMA-Block viele Gewebestanzungen verschiedener Tumorproben vereinigt werden, können simultan zahlreiche Proben untersucht und direkt hinsichtlich z.B. derselben Behandlung oder Färbung verglichen und ausgewertet werden.

### **2.2.1 Herstellung von Tissue Micro Arrays**

Zuerst wird 67 °C warmes Paraffin in eine 1,5 cm x 4 cm x 2 cm große Gussform zur Herstellung eines Paraffinblocks gegossen und für mindestens 12 Stunden bei 37 °C zum Abkühlen gelagert. Vor dem Anschneiden im Mikrotom zu einer glatten und geraden Oberfläche wird der Block kurz auf 4 °C her untergekühlt. Enthält der Block weder Risse noch Luftblasen, kann er als Matrize benutzt werden.

Nun werden zunächst die gewünschten, repräsentativen Tumorareale auf den entsprechenden HE-Schnitten markiert, um dann gezielt die Gewebezyylinder aus den dazugehörigen originalen Paraffinblöcken mittels einer Hohlzylinder zu stanzen. Diese Tumorstanzungen werden in vorgebohrte Löcher (1,5 mm Durchmesser und 10 mm Tiefe) des TMA-Blocks mittels der Hohlzylinder eingeführt. Pro Patient werden mindestens drei Tumorgewebezyylinder entnommen. Dabei wird darauf geachtet, eine Stanze aus dem Tumorzentrum, eine aus der Peripherie und eine aus dem Zwischenraum herzustellen, um eine möglichst repräsentative Darstellung des jeweiligen Tumors zu erzielen. Die Stanzen werden dann in 9er-Gruppen (3 x 3) auf dem jeweiligen TMA-Block angeordnet.

Sie haben innerhalb einer Gruppe einen Abstand von 0,5 mm Paraffin und zwischen den Gruppen von 1,5 mm.

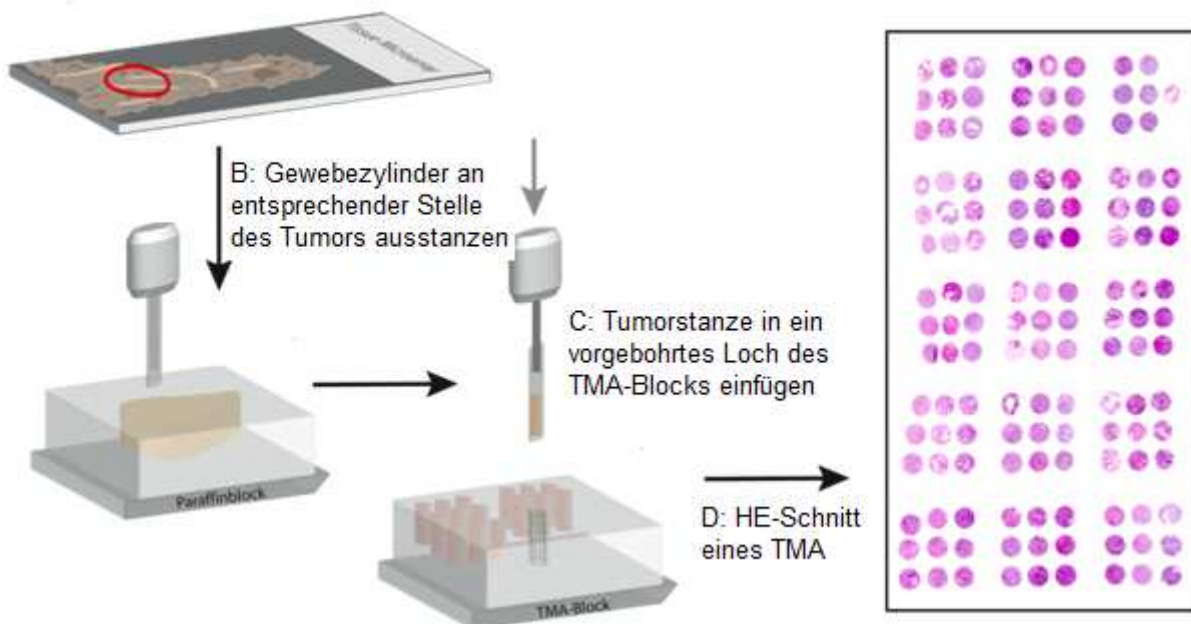
Nach der Fertigstellung eines TMA-Blockes können histologische Schnitte zur Diagnostik angefertigt bzw. zunächst immunhistochemisch gefärbt werden.

### 2.2.2 Problematik der Tissue Micro Arrays

Die Problematik der TMA besteht jedoch darin, dass nur kleine, vorher selektierte Areale der Gesamtläsion ausgewertet werden. Da die Formalinfixation von Lungengewebe schwierig ist, werden außerdem zentrale Tumoranteile nur unzureichend konserviert bzw. gefärbt. Gerade aus diesem Bereich werden aber überwiegend die Tumorstanzen entnommen, damit auch in der Tiefe des Gewebezylinders noch Material übrig bleibt.

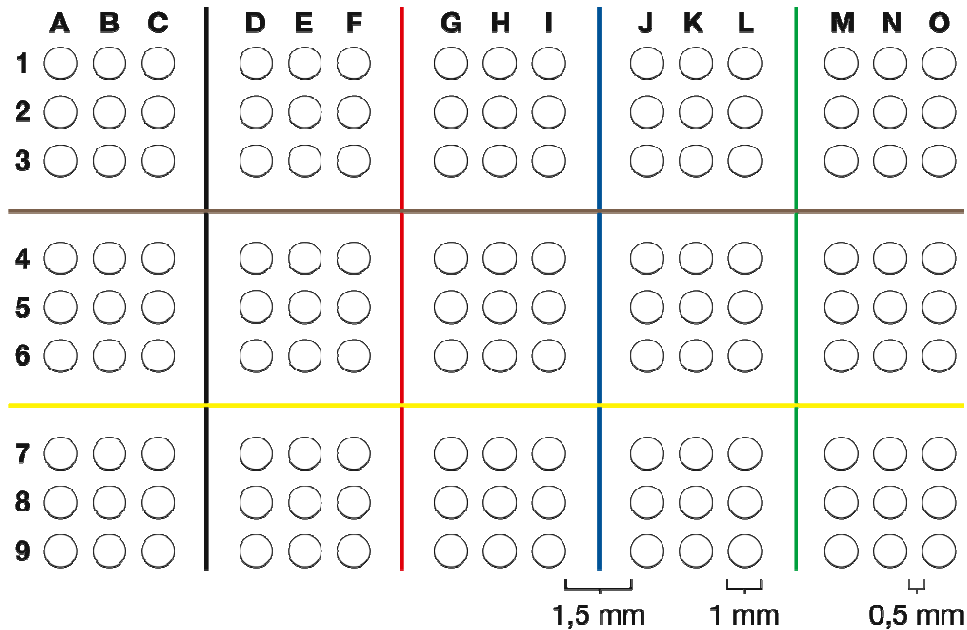
Aufgrund der Tatsache, dass die immunhistochemisch gefärbten TMA-Schnitte häufig nicht für die jeweilige Tumorprobe repräsentativ waren, wurden für meine Arbeit zusätzlich konventionelle Schnitte der Adenokarzinome, die mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt wurden, ausgewertet.

A: repräsentative Tumorareale auf HE-Schnitten markieren



**Abb. 6: Herstellung eines Tissue Micro Arrays**

Als erstes erfolgt die Markierung der gewünschten Tumorareale auf den HE-Schnitten (A), um den entsprechenden Gewebezylinder aus dem jeweiligen Paraffinblock mittels Hohlzylinder aus dem jeweiligen Paraffinblock mittels Hohlzylinder zu stanzen (B). Dann werden diese Tumorstanzen in die vorgebohrten Löcher des TMA-Blockes eingesetzt (C). Jetzt können beliebig viele histologische Schnitte vom TMA-Block hergestellt werden (D). (Abbildung adaptiert von S. Zimmer)



**Abb. 7: Layout eines Tissue Micro Arrays**

Pro Patient werden mindestens drei Tumorgewebszylinder aus dem Paraffinblock ausgestanzt und jeweils in 9er-Gruppen (3 x 3) angeordnet, um den Überblick unter dem Mikroskop zu erleichtern. Die einzelnen Stanzen werden innerhalb einer Gruppe durch 0,5 mm Paraffin getrennt, zwischen den Gruppen liegen 1,5 mm. Die Position jeder Stanze wird mit einem Buchstaben- (Spalte) und einem Zahlencode (Reihe) versehen, sodass die Zuordnung zu den Patientendaten etc. mittels einer Excel-Tabelle leicht gelingen kann. (Abbildung adaptiert von S. Zimmer)

**2.2.3 Auswertung der Tissue Micro Arrays mit dem Mirax Viewer**

Zunächst werden die TMA-Schnitte mit Hilfe des Mirax Scans, einem vollautomatischen Scanner für Objektträger der Firma Carl Zeiss, beschriftet und gescannt. Hierzu werden die Objektträger durch das Objektiv „Plan-Apochromat 20x/0,8“ mit einer Pixelauflösung von 230 nm abgetastet, wobei ein permanenter, parametrisierbarer Autofokus auch bei unebenen Schnitten für scharfe, fokussgerechte Abbildungen sorgt.

Nachfolgend lassen sich die virtuellen Schnitte bzw. die TMA durch die Zuhilfenahme der Software „Mirax Viewer“ einfach betrachten und auswerten. Insbesondere bei einer großen Menge an Blöcken bzw. Schnitten, muss zunächst eine TMA-Master-Excel-Datei mit den exakten Daten zu den jeweiligen Cores (= Stanzen pro Tumor), dem Layout der Blöcke/Schnitte als auch dem korrespondierenden Mirax-Schnitt-Namen erstellt werden. Daraufhin werden die einzelnen Stanzen/ Cores durch den Mirax Viewer erkannt und der Excel-Tabelle entsprechend richtig nummeriert – teilweise sind hierbei noch manuelle Korrekturen notwendig, wenn die Stanzen nicht ganz erfasst wurden. Auch alle weiteren Merkmale, die in der dazugehörigen Excel-Tabelle hinterlegt sind, werden nun mit den Stanzen verknüpft. Schließlich lassen sich die Cores nach einem selbstdefinierten ein- oder zweidimensionalen Schema mit Unterstützung vieler Werkzeuge, z.B. Zoom, auswerten und die gewonnenen Daten können in Excel exportiert werden.

Zur Auswertung der TMA-Stanzen der gefärbten Schnitte benutzen wir das folgende vierstufige Punkteschema: keine oder lediglich schwache Hintergrundfärbung (0), schwache, diskontinuierliche (1), moderate, aber eindeutige (2) oder starke vollständige (3) Färbung.

### **2.3 Immunhistochemie**

Mit Hilfe der Immunhistochemie lassen sich Antigene in Gewebeschnitten detektieren, indem die Schnitte Antikörpern ausgesetzt werden, die spezifische Epitope im Gewebe erkennen bzw. färben. Zur Detektion gibt es zwei Methoden: Bei der sogenannten direkten Methode bindet ein markierter Antikörper an das Antigen im Zielgewebe, wobei die Signalintensität jedoch gering ist und sie deshalb für die Anwendung bei Proben mit wenigen Antigenen nicht geeignet ist. Bei der indirekten, zweistufigen Methode bindet der primäre Antikörper das Epitop, was zu Bindung des sekundären Antikörpers an den primären führt. Dies bewirkt schließlich eine Verbesserung der Signalintensität bzw. eine Signalverstärkung, da ein primärer Antikörper mehrere sekundäre binden kann.

### **2.3.1 Antikörper**

Die folgenden Antikörper wurden von der New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) käuflich erworben. Sie werden durch eine Immunisierung von Mäusen oder Kaninchen mit synthetischen Phosphopeptiden, die in ihrer Struktur mit den spezifischen Phosphorylierungsstellen übereinstimmen, produziert.

#### *EGF Rezeptor Antikörper (Artikelnummer: 4405)*

Dieser monoklonale Kaninchenantikörper bindet den humanen EGFR am Carboxyl-terminalen Ende. Verdünnungsfaktor: 1:400.

#### *Phospho-EGFR Tyrosin-992 (Artikelnummer: 2235)*

Dieser Kaninchenantikörper ist Teil der Signalkaskade in der Zelle. Verdünnungsfaktor 1:50. Er wird in der Mikrowelle präpariert und über Nacht findet die Inkubation statt.

#### *Phospho-EGFR Tyrosin-1068 (Artikelnummer: 2236)*

Dieser Antikörper stammt von Mäusen und ist auch Teil der Signalkaskade. Verdünnungsfaktor: 1:250. Er wird ebenfalls in der Mikrowelle vorbehandelt und über Nacht inkubiert.

#### *Phospho-EGFR Tyrosin-1173 (Artikelnummer: 4407)*

Dieser monoklonale Kaninchenantikörper ist ebenfalls Bestandteil der Signalkaskade des EGFR. Verdünnungsfaktor 1:50. Er wird in der Mikrowelle präpariert und über Nacht findet die Inkubation statt.

#### *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-p44/p42 MAPK Threonin-202/Tyrosin-204 (Artikelnummer: 4376)*

Dieser monoklonale Kaninchenantikörper detektiert humane p42 und p44 MAPK (ERK1 und ERK2), wenn sie an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphoryliert sind. Hierbei gibt es keine Kreuzreaktion mit phosphorylierten JNK/SAPK oder p38 MAPK. Verdünnungsfaktor: 1:250.

*ARNO/Cytohesin-1 sc-9729 Santa Cruz*

Dieser polyklonale Ziegen-IgG-Antikörper gegen Cytohesin 1/2 (C-20) bindet an das C-terminale Ende von Cytohesinen. Verdünnungsfaktor: 1:100.

*DAKO REAL<sup>TM</sup>Link, biotinylierte Sekundärantikörper*

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

### **2.3.2 Färbung**

Nach Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin wurden aus den Gewebeproben drei bis fünf µm dünne Gewebeschnitte hergestellt und wie folgt mit den entsprechenden Antikörpern nach der indirekten, zweistufigen Methode gefärbt.

**Tab. 6: Ablauf der immunhistochemischen Färbung**

Im Folgenden wird der Ablauf der immunhistochemischen Färbung mittels der indirekten, zweistufigen Methode erläutert.

Schritt	Reagenz
Entparaffinierung	2 x 5 min Baden in Xylol, 2 x 10 min Baden in 100 % Ethanol, 2 x 10 min Baden in 95 % Ethanol, 2 x 5 min Baden in Aqua dest.
Demaskierung	Kurz Kochen in 10 mM Tris-Puffer * <sup>1</sup> (pH 10,0), 10 min Waschen knapp unterhalb des Siedepunktes, Abkühlen auf Raumtemperatur innerhalb von 30 min
Waschen	3 x 5 min Waschen in Aqua dest.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 min Inkubation in 3 % Hydrogenperoxid
Waschen	2 x 5 min Waschen in Aqua dest.
PBS	5 min Waschen in PBS * <sup>2</sup> (pH 7,4)
„Blocking Solution“	1 h Inkubation in 200 µl „Blocking Solution“ bei Raumtemperatur (= Serum von der Spezies, aus der der Antikörper stammte), Verdünnung des Primärantikörpers in der „Blocking Solution“, Bedeckung jedes Schnittes mit 150 µl des primären Antikörpers, Inkubation für 24 h bei 4 °C
PBS	5 min Waschen mit PBS
„Blocking Solution“	1:400 Verdünnung des Sekundärantikörpers in der „Blocking Solution“, Bedeckung jedes Schnittes mit 150 µl der verdünnten Lösung, Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur
Endogene Peroxidase	10 min Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Streptavidin/HRP-Komplex	1 h Inkubation mit 150 µl eines Streptavidin/HRP-Komplexes (Streptavidin/Horse-Radish-Peroxidase, Chem-Mate Detektionskit, Firma DAKO, Dänemark)
Chromogen	10 min Inkubation mit Chromogen
Hämalaun	Gegenfärbung der Schnitte mit Mayer's Hämalaun * <sup>3</sup>

\*<sup>1</sup> **Tris-Puffer:** Tris(hydroxymethyl)aminomethan (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

\*<sup>2</sup> **PBS:** englisch für phosphate buffered saline, d.h., phosphatgepufferte Salzlösung bestehend aus Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) oder Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>• 2 H<sub>2</sub>O) und Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

\*<sup>3</sup> **Mayer's Hämalaun:** bestehend aus 0,1 % Hämatoxylin, Aqua dest., Natriumiodat, Kalialaun, 0,5 % Chloralhydrat, 0,1 % Zitronensäure



### **2.3.3 Auswertung**

Die Färbeintensität aller 45 Schnitte wurde von mir und zwei weiteren Wissenschaftlern des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn (PD Dr. Lukas Carl Heukamp, PD Dr. Philip Kahl) ausgewertet und ein Durchschnittswert ermittelt. Wenn ein individueller Wert mehr als einen Punkt von denen der anderen abwich, wurde das widersprüchliche Ergebnis gemeinsam reevaluiert. Zur Auswertung wurde in Anlehnung an andere immunhistochemische Studien das folgende vierstufige Punkteschema angewandt: keine oder lediglich schwache Hintergrundfärbung (0), schwache, diskontinuierliche (1), moderate, aber eindeutige (2) oder starke vollständige (3) Färbung (Atkins et al., 2004; Selvaggi et al., 2004).

### **2.3.4 Statistische Auswertung**

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 6.0 oder SPSS 11.0 (IBM) durchgeführt. Hierzu wurden die jeweiligen Gruppen mittels einer 4 x 4 Matrix durch den zweidimensionalen exakten Test nach Fisher geprüft. Die Gültigkeit der Nullhypothesen wurde auf ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  getestet.

## **2.4 Zellkulturen**

Zur Herstellung der Zellkulturen wurden auf EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor sensitive Adenokarzinomzellen der Zelllinie PC9 verwendet. Diese wurden in dem Zellkulturmedium RPMI-1640 inkubiert, dem 10 % durch Hitze inaktiviertes fetales Kälberserum (FBS = fetal bovine serum, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin (P/S, Life Technologies) bei 37 °C in einer 5 % CO<sub>2</sub> / 95 % Luft-Atmosphäre hinzugegeben wurden. Die adhärennten Zelllinien wurden über ca. 3 Wochen in T75-Zellkulturflaschen expandiert, bis eine ausreichende Menge zur subkutanen Injektion in männliche Nacktmäuse erreicht war. Hierzu mussten die adhärennten Zellen zunächst – wie unten aufgeführt – gesplittet werden.

**Tab. 7: Splitten der adhärennten Zellen der Zellkulturen**

In der folgenden Tabelle wird dargestellt, wie die adhärennt wachsenden Zellen der Zelllinie PC9, die über ca. 3 Wochen in dem Zellkulturmedium RPMI-1640 inkubiert wurden, gesplittet werden, um sie dann subkutan in Nacktmäuse zu injizieren.

Schritt	
1)	Absaugen des Zellkulturmediums von der Zellkultur
2)	Waschen der Zellen mit 2-3 ml PBS
3)	Absaugen der Lösung
4)	Hinzugeben von 2,5 ml Trypsin
5)	Inkubation für 3 min bei 37 °C und 5 % CO <sub>2</sub>
6)	Abstoppen der Reaktion mit dem Zellkulturmedium RPMI
7)	Transferieren in ein Falcon
8)	Zentrifugieren für 3 min bei 800 rpm
9)	Vorsichtiges Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes, Stehenlassen des Pellets
10)	Wiederaufnahme des Pellets in 1 ml Zellkulturmedium
11)	Befüllen einer neuen T75-Zellkulturflasche mit 10 ml Zellkulturmedium
12)	Wiederaussäen der Zellen im Verhältnis 1:4
13)	Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop
14)	Bestimmen der Gesamtzellzahl + Einsatzmenge ( $5 \times 10^6$ PC9-Tumorzellen je Injektion)

**2.5 Xenograft-Mausmodell**

Das im Weiteren vorgestellte Xenograft-Mausmodell wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Roland Ullrich, Max Planck Institut, Köln, durchgeführt.

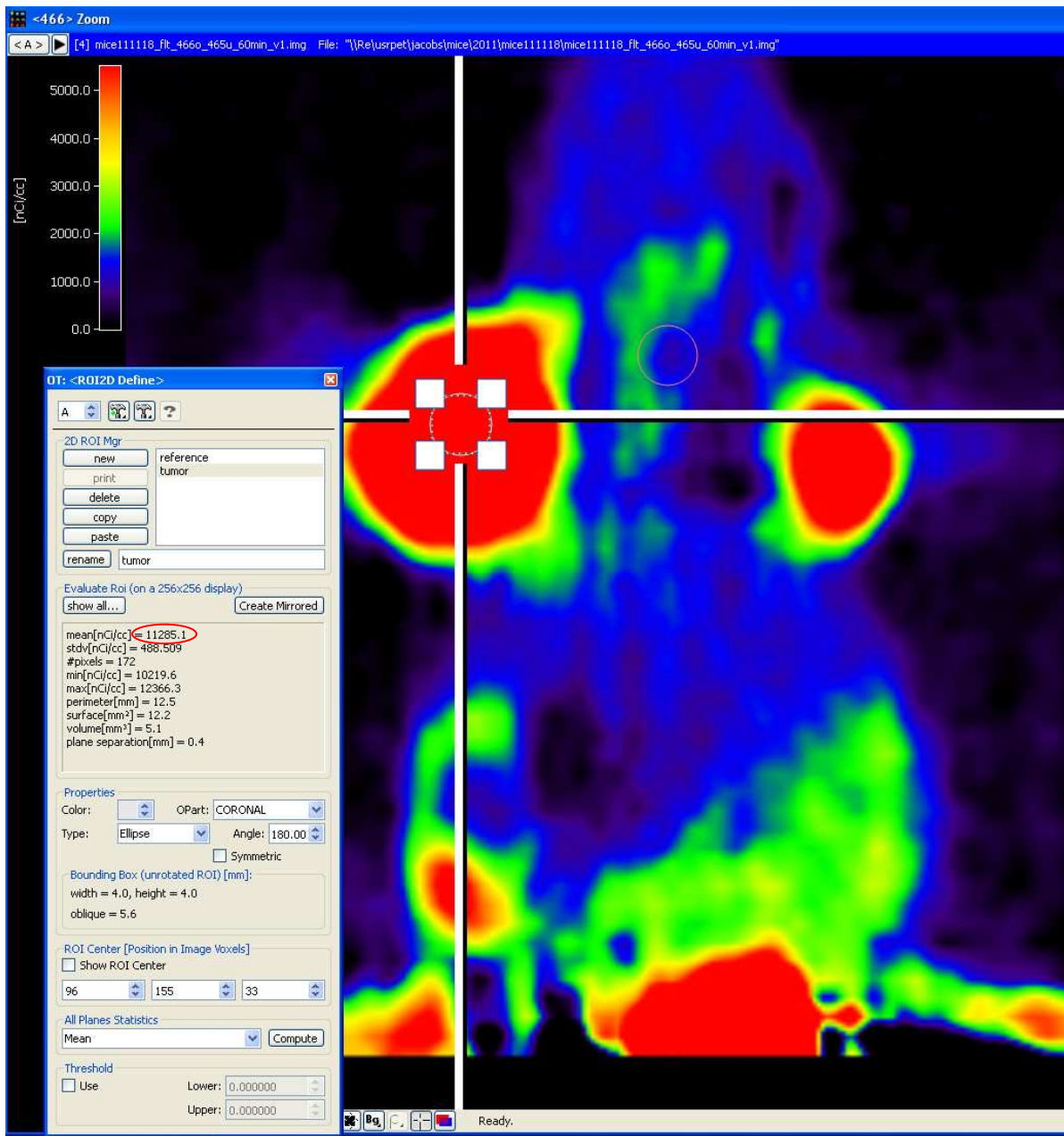
Die bestehenden deutschen Tierschutzgesetze wurden bei der Durchführung der Tierversuche beachtet; die Experimente waren zuvor von der lokalen Tierschutz-Kommission sowie der Bezirksregierung Köln genehmigt worden.

Die Tumore wurden durch subkutane Injektionen von  $5 \times 10^6$  PC9-Tumorzellen aus jeweils einzelnen Zelllinien, die in reinem RPMI gelöst waren, in 6 - 8 Wochen alte nu/nu athymische, männliche Nacktmäuse erzeugt (Ullrich et al., 2008). Nachdem ein nachweisbarer Tumor mit einem Volumen von ca.  $70 \text{ mm}^3$  entstanden war, wurden die insgesamt 10 Mäuse in zwei Gruppen randomisiert: zum Einen in eine Kontrollgruppe (DMSO = Trägerstoff) und zum Anderen in eine Therapiegruppe, die sieben Tage lang

mit SecinH3 behandelt wurde. Den letztgenannten Mäusen wurden täglich intraperitoneale Injektionen mit einem Volumen von 100 µl und einer Dosis von 2,5 mM SecinH3 gelöst in 75 % Glukoselösung (5 %)/25 % DMSO verabreicht. Die Tumorgröße wurde daraufhin durch das regelmäßige Messen der längsten Senkrechten und des größten Durchmessers bestimmt. Auf der Basis dieser beiden Daten wurde nach der folgenden Gleichung [Tumolvolumen =  $ax(b^2/2)$ ] das Tumolvolumen berechnet.

## 2.6 [<sup>18</sup>F]FLT-PET Bildgebung

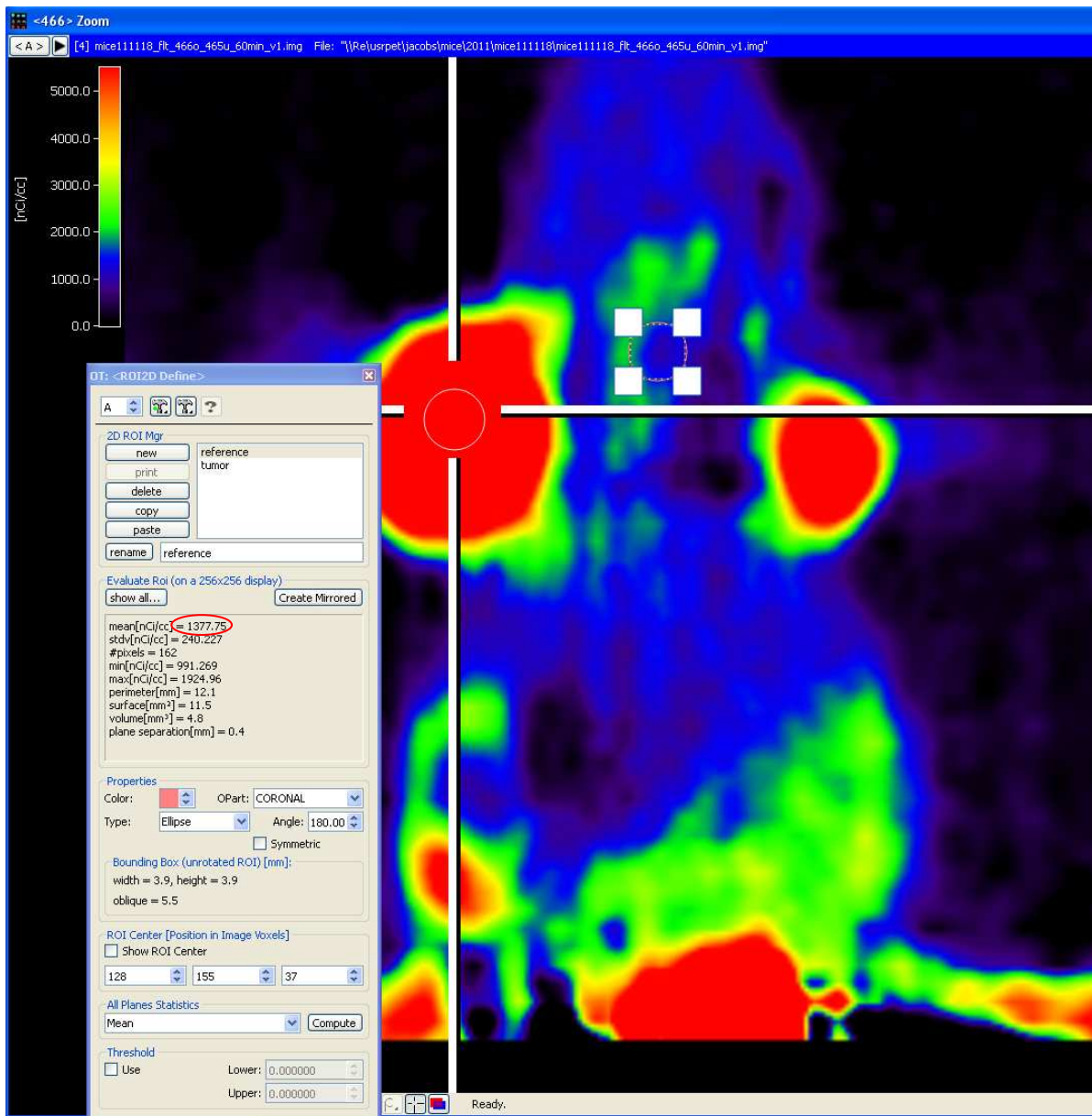
Die Mäuse mit PC9 induzierten, makroskopisch erkennbaren Tumoren wurden mittels eines FOCUS microPET-Scanners (Concord Microsystems, Inc., Knoxville, TN, USA) untersucht. Die Synthese von 3'-Deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]-Fluor-L-Thymidin ([<sup>18</sup>F]FLT) wurde – wie zuvor beschrieben – durchgeführt (Hamacher et al., 1986; Machulla et al., 2000). In einer Dosis von 200 µCi/Maus wurde nun [<sup>18</sup>F]FLT – ohne die Zugabe einer Trägersubstanz – intravenös in die Schwanzvene der Tiere appliziert. Die erste [<sup>18</sup>F]FLT-Bildgebung wurde 60 min nach der jeweiligen Injektion durchgeführt. Die Auswertung der Daten basierte auf der Analyse der „region of interest“ (ROI) des gesamten Tumors unter der Hinzunahme der hauseigenen Software VINCI des Max Planck Instituts, Köln. Hierzu wurde die maximale Voxel-Radioaktivität innerhalb des entsprechenden Tumors bemessen (s. Abbildung 4). Um das Verhältnis der Aufnahme des radioaktiven Kontrastmittels vor und nach der Therapie mit SecinH3 zu bestimmen, wurde als Referenz ein „ROI“ in das Mediastinum gelegt (s. Abbildung 5), da hier eine konstante Aufnahme von [<sup>18</sup>F]FLT beobachtet werden konnte. Die Daten wurden durch die gesamte injizierte Dosis dividiert, um einen Prozentsatz „injizierte Dosis pro Gramm“ zu erhalten (%ID/g). Die Werte wurden entsprechend des radioaktiven Zerfalls seit der Nukleotidsynthese korrigiert.



**Abb. 8: Ermittlung der „region of interest“ des jeweiligen Tumors**

Der durch die vier Quadrate umrandete Kreis markiert die „region of interest“ (ROI) zur Bestimmung der durchschnittlichen Aufnahme des Radiotracers. In dem grülich hinterlegten Kasten links erkennt man den durchschnittlichen Wert für diesen Tumor – markiert durch den ovalen, rot umrandeten Kreis: 11285 nci/cc.

(mit Dank an S. Chatterjee für die Bereitstellung der beiden Abb. 8 und 9)



**Abb. 9: Ermittlung der „region of interest“ des Referenzgewebes**

Als Referenz zur  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -Aufnahme des Tumorgewebes wird das Gewebe des Mediastinums zwischen den beiden Lungenflügeln der Maus verwendet, da hier eine konstante Aufnahme beobachtet werden kann. In diesem Beispiel beträgt der Wert für die ROI des Referenzgewebes 1378 nci/cc.

Mit Hilfe der  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -Positronen-Emissions-Tomographie (PET) lassen sich Tumorzellen finden, die im G1-Stadium des Zellzyklus arretiert sind, bevor etwaige morphologische Veränderungen feststellbar sind. Ullrich et al. konnten 2008 durch das  $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -PET eine Erlotinib-induzierte Apoptose sowie ein Zellschrumpfen im Vergleich

zum herkömmlichen 2-[<sup>18</sup>F]-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose([<sup>18</sup>F]FDG)-PET bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt detektieren und demonstrierten somit eine gut geeignete Methode zur frühzeitigen Identifizierung von Patienten, die auf die Therapie mit EGFR-TKI ansprechen (Ullrich et al., 2008).

## **2.7 Ki-67-Färbung**

Mit Hilfe des Proliferationsmarkers und Antikörpers Ki-67 wird die Expression eines nukleären Antigens, des Proteins Ki-67, nachgewiesen (Gerdes et al., 1983). Das Protein Ki-67 ist in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, G(1)-, S-, G(2)- und der Mitose-Phase, nachweisbar, in der G(0)-Phase wird das Antigen Ki-67 allerdings nicht exprimiert; daher stellt Ki-67 einen hervorragenden Marker zur Identifizierung der sogenannten Wachstumsfraktion einer bestimmten Zellansammlung dar (Scholzen und Gerdes, 2000). Der Anteil der Ki-67-positiven Tumorzellen korreliert häufig mit dem klinischen Verlauf einer Krebserkrankung; er gibt direkte Auskunft über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors (Scholzen und Gerdes, 2000).

## **2.8 TUNEL (= terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end labeling) – Methode**

Der programmierte Zelltod spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklungsbiologie und ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Zellreplikation und kontrolliertem Zelltod in sich ständig erneuerndem Gewebe. Morphologisch gesehen antworten Zellen, die auf apoptotische Signale reagieren, mit einer nukleären Chromatinkondensierung bzw. Kernpyknose, einer Abnahme des Zellvolumens, einer Verdichtung der intrazellulären Organellen, einem Erscheinen von Membranausstülpungen an der Zelloberfläche und der Bildung von so genannten apoptotic bodies, die aus nukleären Fragmenten und degenerierten Zellkomponenten bestehen (Cidlowski et al., 1996; Kerr, 1987). Die von Gavrieli et al. entwickelte TUNEL-Methode dient der in-situ-Markierung und Visualisierung von DNA-Fragmenten im Zellkern von Gewebeproben und damit der Detektierung des programmierten Zelltodes auf Zellebene (Gavrieli et al., 1992). Mittels einer Enzymreaktion werden an die Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) gekoppelte fluoreszierende Nukleotide

(dUTP) an das 3'-OH-Ende der DNA-Brüche gebunden. Mehrere Arbeitsgruppen versuchten nach Gavrieli et al., die TUNEL-Methode auf eine große Anzahl von Zellarten auszuweiten, sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität durch eine Austestung von verschiedenen Vorbehandlungen und Fixierungsmöglichkeiten, z.B. Erhitzung mittels Mikrowelle, Behandlung mit Proteinkinase K, zu optimieren sowie standardisierte Protokolle einzuführen (Labat-Moleur et al., 1998; Negoescu et al., 1996).

Zur Durchführung der TUNEL-Methode wurde in unserer Arbeit das ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Katalognummer: S 7100) verwendet.

**Tab. 8: TUNEL-Methode**

Mit Hilfe der TUNEL-Methode werden DNA-Fragmente im Zellkern markiert bzw. visualisiert. Im Folgenden wird der Ablauf dargestellt, in dem an die TdT gekoppelte fluoreszierende Nukleotide (= dUTP) an das 3'-OH-Ende der DNA-Brüche gebunden werden.

Reagenz	Schritt
Ethanol	Entparaffinierung bis 70 % Ethanol
PBS	2 x 5 min waschen
400 µl Proteinkinase K in 200 ml Aqua dest.	15 min inkubieren lassen
Aqua dest.	2 x 2 min abspülen
20 ml 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und 200 ml PBS	5 min inkubieren lassen
PBS	2 x 5 min waschen
Equilibrierungspuffer	Je Objektträger (OT) 75 µl für 10 sec.
77 µl Reaktionspuffer + 33 µl Terminale Transferase (TdT) = 110 µl – 55 µl pro OT	1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren lassen
Stop-Puffer-Lösung (6 ml ad 200 ml Aqua dest.)	10 min bei 37 °C waschen
PBS	3 x 1 min waschen
Anti-Digoxigenin-Konjugat	30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen, je OT 65 µl
PBS	4 x 2 min waschen
ACE-Substrate-Chromogen <sup>*4</sup>	3 - 6 min bei mikroskopischer Kontrolle inkubieren lassen
Aqua dest.	3 x 1 min abspülen
Hämatoxilin nach Mayer	30 sec. einwirken lassen
Leitungswasser	5 min bläuen
Eindeckmittel Aquatex	Gefärbte Präparate mit Eindeckmittel und Deckglas bedecken

<sup>\*4</sup> ACE-Substrate-Chromogen = Farbstoff

**2.9 Doppelfärbung mit pEGFR und ARNO**

Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte wurden mit den Antikörpern pEGFR und ARNO inkubiert und mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern gefärbt. Die Gegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff **4',6-Diamidin-2-phenylindol**, kurz **DAPI**, dient der Markierung der DNA und damit des Zellkerns.



**Tab. 9: Doppelfärbung mit pEGFR 1068 (Maus), ARNO C20 (Ziege) und DAPI**

Es wird gezeigt, wie die Doppelimmunfluoreszenz-Färbung gegen ARNO/Cytohesin-1 und pEGFR durchgeführt wird. Durch die DAPI-Gegenfärbung wird die DNA innerhalb des Zellkerns angefärbt.

Reagenz	Schritt
Xylol	10 min Dehydrierung
Xylol	10 min Dehydrierung
Alkohol 100 %	5 min baden
Alkohol 100 %	5 min baden
Alkohol 95 %	5 min baden
Alkohol 75 %	5 min baden
Aqua dest.	5 min abspülen
Citratpuffer	30 min (600 Watt bei 1 l Gebrauchspuffer)
Abkühlen	20 min
TBS-T (= tris buffered saline with tween)	5 min waschen
Peroxidase-Block	10 min (1 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 30 µl A. dest.), 200 – 250 µl pro Objektträger (OT)
TBS-T	3 x 5 min waschen (einmal wechseln)
Antikörper pEGFR 1068	1:25 mit Diluent verdünnen, über Nacht im Kühlschrank inkubieren lassen, ca. 100 - 150 µl pro OT
TBS-T	3 x 5 min waschen
Antikörper ARNO C20	1:50 mit Diluent verdünnen, 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen
TBS-T	3 x 5 min waschen
biotinylierter Sekundärantikörper	1:500 mit Diluent verdünnen, 1 h im Dunkeln inkubieren lassen, 100 -150 µl pro OT
TBS-T	3 x 5 min waschen
DAPI (= 6,6-diamidino-2-phenylindole-dilactate)	1:1000 mit Diluent verdünnen, 10 min inkubieren lassen
TBS-T	3 x 5 min waschen
Fluorescent Mounting Medium	OT damit eindecken

### 3. Ergebnisse

Die in der Einleitung beschriebenen Daten legen nahe, dass Cytohesine auch in Adenokarzinomen der Lunge exprimiert werden und dass dies Einfluss auf die Aktivierung von EGFR sowie der weiterleitenden Signalkaskaden hat. Somit könnten Cytohesine eine neue therapeutische Zielstruktur darstellen. Nachfolgend werde ich im Einzelnen folgende Fragestellungen untersuchen:

- 1) Zeigen Adenokarzinome der Lunge eine differentielle Expression von Cytohesinen?
- 2) Korreliert die Expression von Cytohesinen mit der EGFR-Expression und/oder der EGFR-Phosphorylierung?
- 3) Korreliert die Expression von Cytohesinen mit der Aktivierung von weiterführenden Signalwegen?
- 4) Gibt es eine Koexpression von Cytohesinen und pEGFR auf der gleichen Zelle?
- 5) Lässt sich die Expression von Cytohesinen in vivo hemmen und kann dies zu einem reduzierten Tumorwachstum führen?

Dazu wird im Folgenden zunächst demonstriert, dass hohe Expressionsniveaus von Cytohesinen in Adenokarzinomen der Lunge mit der pEGFR-Aktivierung und deren Signalkaskade korrelieren. Mittels Doppelimmunfluoreszenz-Färbung kann dabei dargelegt werden, dass Cytohesine und pEGFR auf der gleichen Zelle koexprimiert sind. Des Weiteren wird im Mausprojekt – wie von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Famulok zuvor in vitro gezeigt – dargestellt, dass das Tumorwachstum von PC9-Xenograft-Tumoren (= Adenokarzinomzellen mit einer aktivierenden Mutation des EGFR) durch den spezifischen Cytohesininhibitor SecinH3 in vivo gehemmt werden kann, welches mittels FLT-PET-Bildgebung veranschaulicht wird.

Eine posttherapeutische Analyse der resezierten PC9-Xenograft-Tumore nach der Behandlung mit SecinH3 bestätigt diese Inhibierung durch eine reduzierte Proliferationsaktivität bei der Bestimmung des Proliferationsmarkers Ki-67 bzw. durch eine erhöhte Apoptoserate bei der Durchführung der TUNEL-Färbung.

In unserer Arbeit werden Cytohesine erstmals als intrazelluläre, hemmbare EGFR-Aktivatoren beschrieben, die in Zukunft aussichtsreiche neue Angriffsziele in EGFR-abhängigen Tumoren sein könnten.

### **3.1 Cytohesine sind zytoplasmatische Aktivatoren des EGFR**

Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass Cytohesine durch eine direkte Wechselwirkung mit der zytoplasmatischen Domäne von dimerisierten EGF-Rezeptoren und eine daraus folgende, erleichterte Konformationsänderung, die zur Bildung von asymmetrischen Dimeren führt, die EGFR-Aktivierung verstärken.

Um dies *in vivo* zu bestätigen, untersuchte ich ein Patientenkollektiv von Adenokarzinomen der Lunge mittels Immunhistochemie auf die Expression von ARNO/Cytohesin-1. Zunächst wurden dazu TMA-Schnitte, die eine schnelle und insbesondere kostengünstige Analyse einer großen Anzahl von Gewebeproben möglich machen, zur weiteren immunhistochemischen Färbung hergestellt. Bei der Auswertung der TMA-Schnitte nach dem unten aufgeführten vierstufigen Schema fiel jedoch auf, dass die jeweils drei Stenzen pro Patient häufig nicht repräsentativ für das jeweilige Lungengewebe waren. Dies war insbesondere der Tatsache geschuldet, dass nur kleine Areale der Gesamtläsion, häufig aus dem Tumorzentrum, das schwächer angefärbt war, da die Formalinfixation und Anfärbung insbesondere der zentralen Tumoranteile schwieriger ist, analysiert wurden.

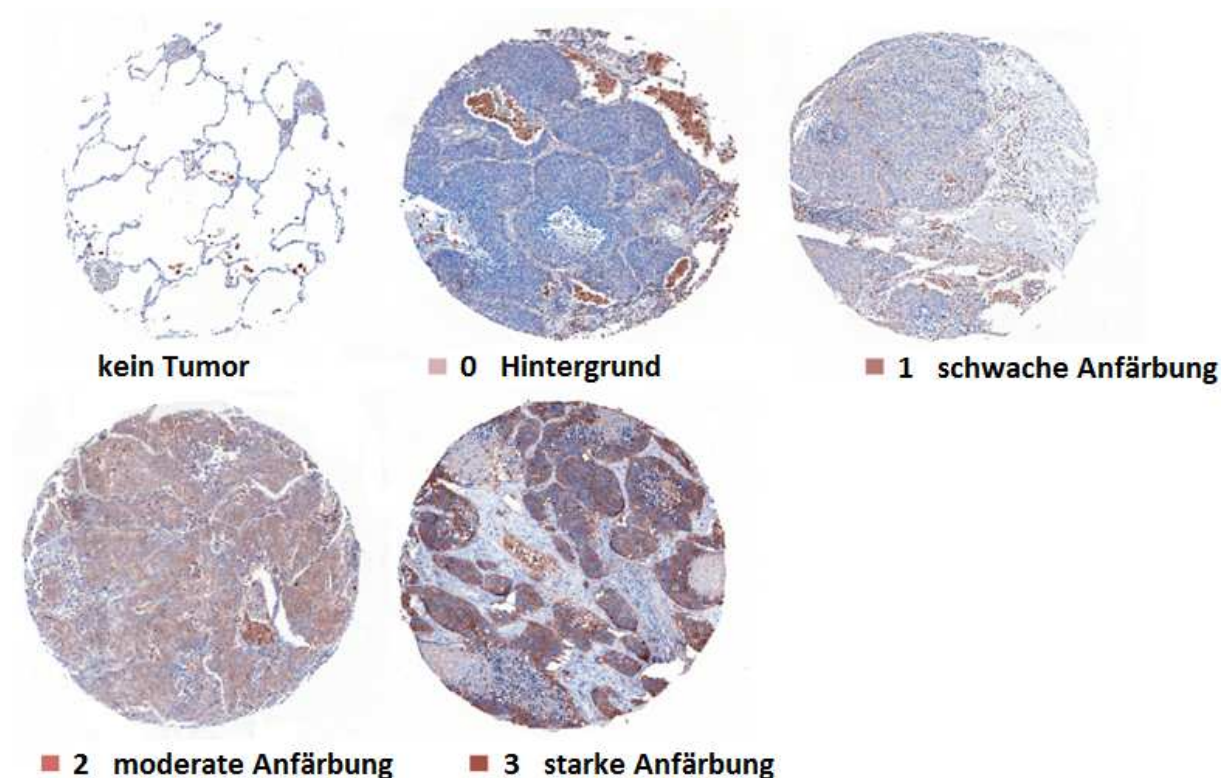
Daher wurden im nächsten Schritt ganze Schnitte von insgesamt 45 Tumorproben aus dem bekannten Patientenkollektiv und 10 Schnitte von gesunden Lungengeweben angefertigt und entsprechend immunhistochemisch gefärbt.

Um als erstes herauszufinden, ob Cytohesine vermehrt in Adenokarzinomzellen der Lunge exprimiert sind, wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Ziegen-IgG-Antikörper gegen Cytohesin 1/2 (C-20), der an das C-terminale Ende von Cytohesinen bindet, gefärbt.

Die Färbeintensität wurde nach folgendem vierstufigen Punkteschema durch mich und zwei weitere unabhängige Pathologen bewertet: keine oder lediglich schwache Hinter-

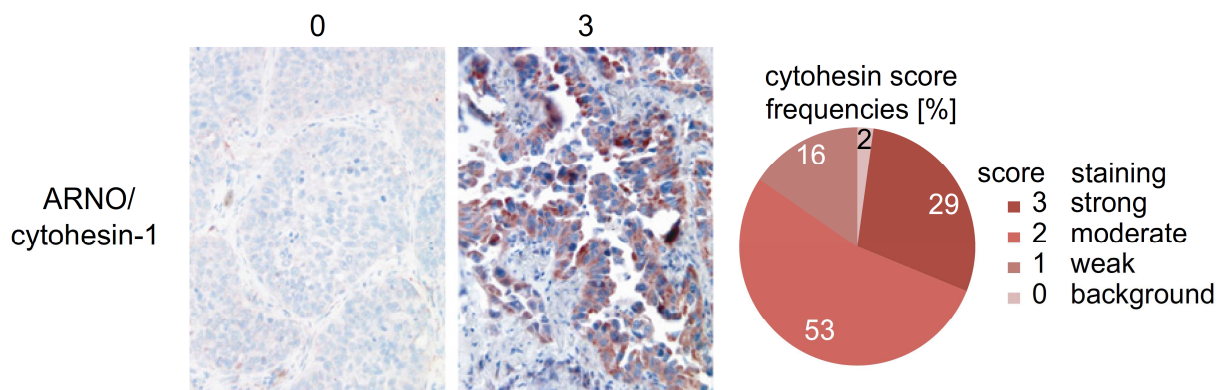
grundfärbung (0), schwache, diskontinuierliche (1), moderate, aber eindeutige (2) oder starke vollständige (3) Färbung (Abb. 10). Aus den drei unabhängigen Datensätzen wurde ein Mittelwert berechnet (= siehe „average ARNO“ in der Tab. 10: „Patientenkollektiv mit allen Färbungen und Ergebnissen“ im Anhang).

Während normales Lungengewebe nur eine leichte Hintergrund (0) oder allenfalls schwache Färbung (1) zeigte, kam es bei 82 % der Karzinomgewebe zu einer moderaten (2) oder starken (3) Anfärbung von ARNO/Cytohesin-1 (Abb. 10 und 11). Dies weist daraufhin, dass Cytohesin-1 in einem großen Anteil von Adenokarzinomen der Lunge überexprimiert wird und möglicherweise mit der Aktivierung der weiterführenden Signalwege korrelieren könnte.



**Abb. 10: Adenokarzinomzellen der Lunge zeigen eine Überexpression von Cytohesinen**

2 % der Karzinomgewebe zeigten lediglich eine Hintergrundanfärbung (0), 16 % eine schwache Anfärbung (1). Bei 82 % der Karzinomgewebe kam es zu einer moderaten (2) oder starken (3) Anfärbung von ARNO/Cytohesin-1. Die genauen Ergebnisse sind der Tab. 10: „Patientenkollektiv mit allen Färbungen und Ergebnissen“ im Anhang zu entnehmen.



**Abb. 11: Adenokarzinomzellen der Lunge zeigen eine Überexpression von Cytohesinen**

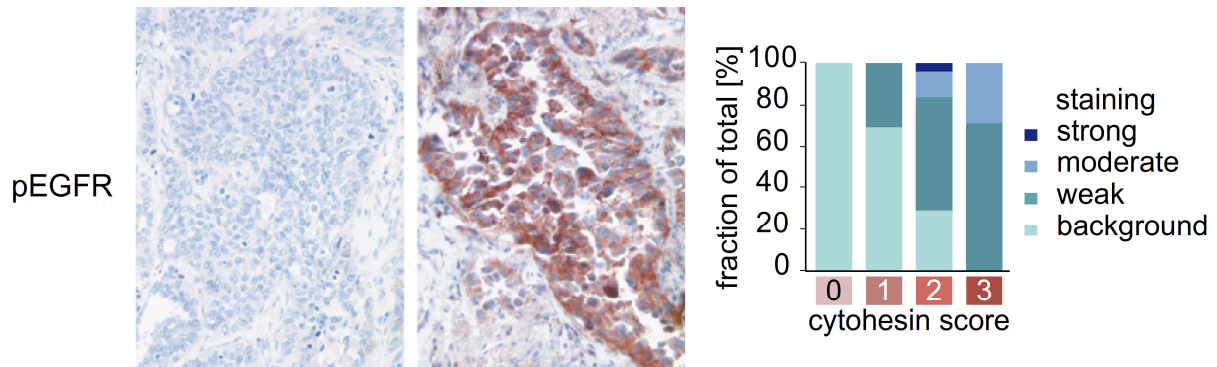
(aus (Bill, ..., Meffert et al., 2010)) Gezeigt werden Adenokarzinome mit Hintergrundanfärbung (0) links und starker Anfärbung (3) für ARNO/Cytohesin-1 rechts. Das Kreisdiagramm stellt die Anteile von Hintergrund- (= background), schwacher (= weak), moderater (= moderate) und starker (= strong) Anfärbung für ARNO/Cytohesin-1 in den ausgewerteten Schnitten mit n = 45 dar.

### 3.2 Die Überexpression von Cytohesinen korreliert mit pEGFR

In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cytohesinen zu einer gesteigerten Autophosphorylierung von EGFR führt. In immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern, die gegen die phosphorylierten Tyrosinreste 992, 1068 und 1173 des EGFR gerichtet waren, zeigte sich nun in meiner Arbeit auch in vivo an Adenokarzinomzellen der Lunge, dass es eine hochsignifikante Korrelation ( $p = 0,002$ , exakter Test nach Fisher) zwischen der Expressionsrate von ARNO/Cytohesin-1 und der Höhe von Autophosphorylierungen des EGFR sowie der phosphorylierten / aktivierten Signalwege gibt (Abb. 12). Es wurde der Mittelwert aus den ausgewerteten Daten für Tyr-992, Tyr-1068 und Tyr-1173 bestimmt (= siehe „average pEGFR“ in der Tab. 10: „Patientenkollektiv mit allen Färbungen und Ergebnissen“ im Anhang). Der Tab. 11 „ARNO/Cytohesin-1 gegen pEGFR“ sind die einzelnen Prozentzahlen der ARNO-Mittelwerte gegen die pEGFR-Mittelwerte zu entnehmen, die die Daten für das unten aufgeführte Balkendiagramm in Abb. 12 lieferten.

Eine Korrelation zwischen der Expression von ARNO/Cytohesin-1 und einem phosphorylierungsunspezifischen pan-EGFR konnte nicht nachgewiesen werden ( $p = 0,581$ , exakter Test nach Fisher).

Dies legt dar, dass ARNO/Cytohesin-1 nicht mit der Überexpression des EGF-Rezeptors sondern nur mit dem phosphorylierten Anteil des EGFR korreliert. Umgekehrt bedeutet dies, dass ARNO/Cytohesin-1 einen direkten Einfluss auf pEGFR, aber nicht auf die Expression des EGFR hat.



**Abb. 12: Hohe Expressionsraten von ARNO/Cytohesin-1 korrelieren mit einer gesteigerten Autophosphorylierung des EGFR (= pEGFR)**

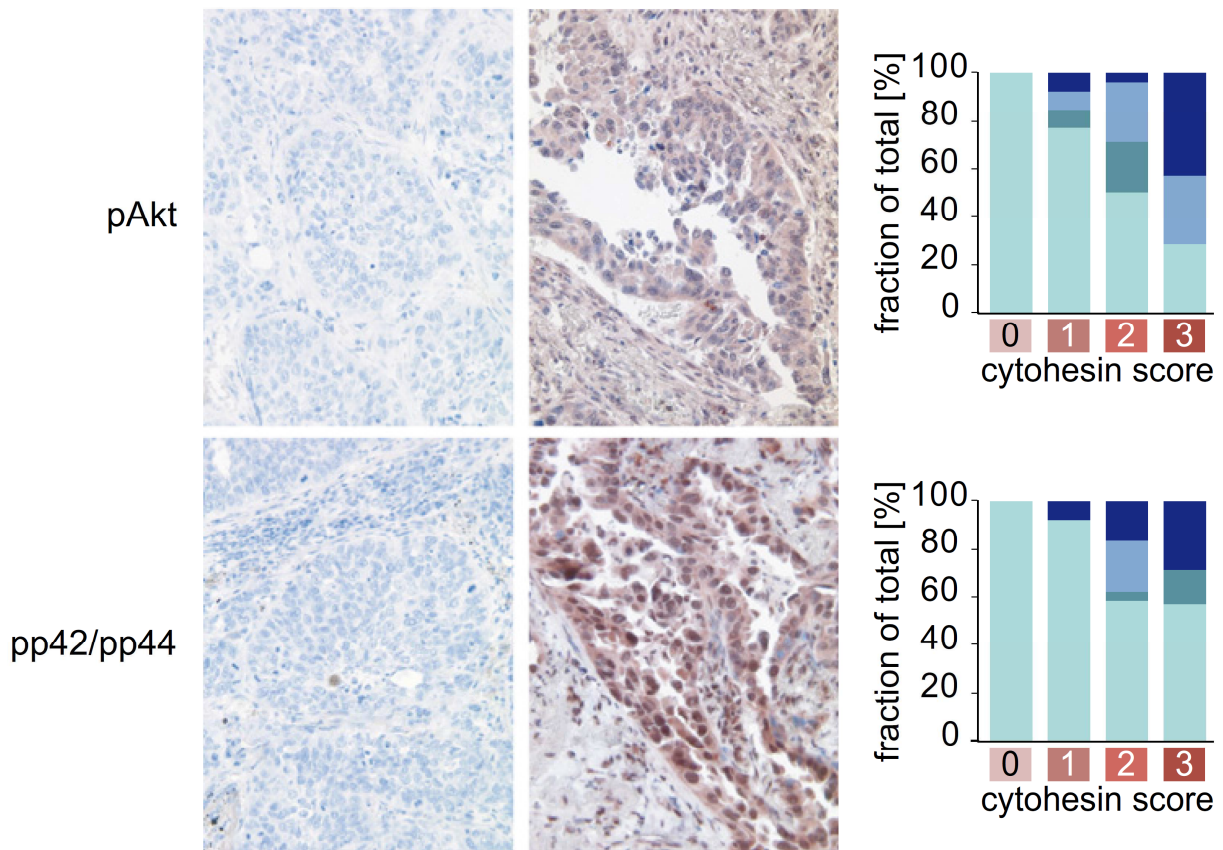
(aus (Bill, ..., Meffert et al., 2010)) Gewebeschnitte von resezierten, menschlichen Adenokarzinomen der Lunge wurden auf pEGFR gefärbt. Dargestellt werden links eine Hintergrundfärbung (0) und rechts eine starke Anfärbung (3) für pEGFR. Das Balkendiagramm ganz rechts veranschaulicht den Phosphorylierungslevel für pEGFR in Korrelation zu dem Cytohesin-Wert ( $p = 0,002$  für pEGFR;  $n = 45$ ), wobei die Farbskala ebenfalls dem vierstufigen Schema, welches bereits oben erläutert wurde, entspricht: background = Hintergrundfärbung, weak = schwache, diskontinuierliche Anfärbung, moderate = moderate, aber eindeutige Anfärbung, strong = starke vollständige Anfärbung. Die genauen Prozentzahlen sind der Tab. 11: „ARNO/Cytohesin-1 gegen pEGFR“ im Anhang zu entnehmen.

### 3.3 Die Überexpression von Cytohesinen korreliert mit dem Akt- und Erk1/Erk2-Signalweg

Da gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von Cytohesinen mit der EFGR-Phosphorylierung korreliert, stellte sich nun die Frage, ob eine Überexpression von Cytohesinen auch die Aktivierung entscheidender, weiterführender Signalwege, wie z.B. pAkt und pp44/pp42, beeinflusst. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen mit monoklonalen Kaninchenantikörpern, die an Akt bzw. Erk1/Erk2 binden, wenn diese phosphoryliert, d.h., aktiviert sind, durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von Akt und p44/42 (Erk1/Erk2) in hohem, signifikanten Maße mit einer erhöhten Expression von ARNO/Cytohesin-1 ( $p = 0,002$

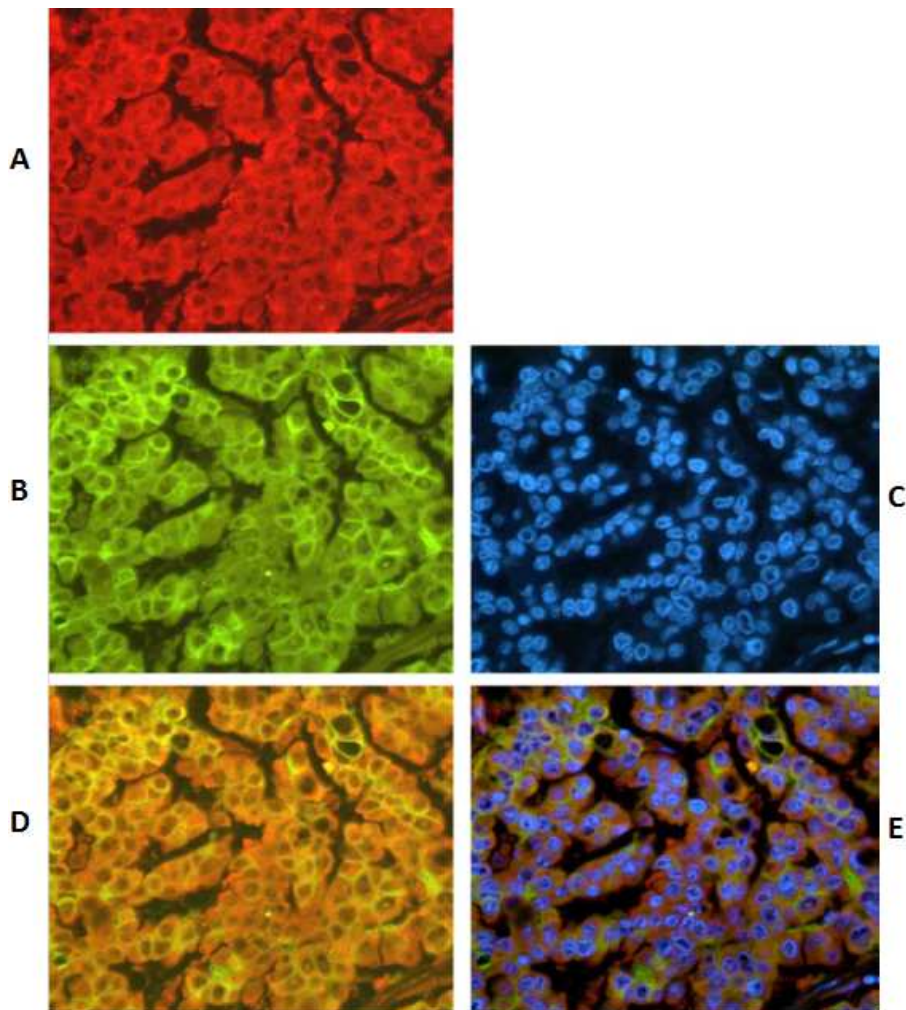
bzw.  $p = 0,025$ , exakter Test nach Fisher; siehe Tab. 12 und 13: „ARNO/Cytohesin-1 gegen pAkt bzw. pp42/pp44“ im Anhang) einhergeht (Abb. 13). Diese Daten deuten darauf hin, dass auch die downstream-Signalwege des EGF-Rezeptors über eine gesteigerte Aktivierung von ARNO/Cytohesin-1 angeregt werden und somit die EGFR-Signalkaskade über die beiden hauptsächlichem Arme fortgesetzt wird.



**Abb. 13: Hohe Expressionsraten von ARNO/Cytohesin-1 korrelieren mit einer erhöhten Signalwirkung des EGFR in menschlichen Adenokarzinomen der Lunge** (aus (Bill, ..., Meffert et al., 2010)) Die Gewebeschnitte der resezierten, menschlichen Adenokarzinome der Lunge wurden außerdem auf pAkt und pp42/pp44 gefärbt. Dargestellt werden links eine Hintergrundfärbung (0) und rechts eine starke Anfärbung (3) für die jeweiligen Proteine. Die Diagramme ganz rechts veranschaulichen den Phosphorylierungslevel für pAkt und pp42/pp44 in Korrelation zu dem Cytohesin-Wert. ( $p = 0,002$  für pAkt,  $p = 0,025$  für pp42/pp44;  $n = 45$ ), wobei die oben erwähnte Farbskala angewandt wurde. Die genauen Ergebnisse sind den Tab. 12 und 13 „ARNO/Cytohesin-1 gegen pAkt bzw. pp42/pp44“ im Anhang zu entnehmen.

### 3.4 Koexpression von Cytohesinen und pEGFR auf der gleichen Zelle

Um zu beweisen, dass die Expression von pEGFR und ARNO eine wirkliche Koexpression auf der gleichen Zelle darstellt und nicht eine Expression von pEGFR und ARNO auf zwei unabhängigen Zellpopulationen ist, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt. Hier zeigte sich in der Anfärbung des gleichen histologischen Schnittes eines resezierten Adenokarzinoms der Lunge mit einem Cytohesin-spezifischen Antikörper (rot, A) und einem pEGFR-spezifischen Antikörper (grün, B), dass die gleichen Zellen sowohl ARNO als auch pEGFR koexprimieren (D). Mittels der DAPI-Gegenfärbung wird die DNA innerhalb des Zellkerns angefärbt (blau, C und E). Belegt wird dieses Ergebnis schließlich durch die Fusionsfärbung (gelb, D), in der beide vorherigen Färbungen übereinander gelegt werden. Diese Daten sind ein starkes Indiz dafür, dass ARNO und pEGFR nicht nur auf der gleichen Zellpopulation sondern auch lokal auf den Zellmembran kolokalisieren.





**Abb. 14: Koexpression von pEGFR und ARNO/Cytohesin-1 in menschlichen Adenokarzinomen der Lunge**

(aus (Bill, ..., Meffert et al., 2010)) Dargestellt wird eine Doppelimmunfluoreszenz-Färbung eines Adenokarzinoms der Lunge, die zeigt, dass ARNO/Cytohesin-1 und pEGFR auf den selben Zellen kolokalisieren. Zunächst wurde eine Doppelfärbung gegen ARNO/Cythesin-1 (rot, A) und pEGFR (grün, B) durchgeführt, im Weiteren wurde mit DAPI (blau, C) gegengefärbt. Bei Bild D werden die ARNO/Cytohesin-1- und die pEGFR-Färbung übereinander gelegt, bei E zusätzlich noch die DAPI-Färbung.

**3.5 SecinH3 reduziert das Wachstum von EGFR-abhängigen Bronchialkarzinomzellen**

Die starke Expression von ARNO/Cytohesin-1 in Adenokarzinomzellen der Lunge deutet darauf hin, dass Cytohesine über eine verstärkte EGFR-Signalkaskade das Wachstum von Tumorzellen fördern und somit ein möglicher Angriffspunkt in der Entstehung von NSCLC sein können. In vitro konnte diese Vermutung durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Famulok bestätigt werden: die Proliferationsrate der EGFR-abhängigen Lungenkrebs-Zelllinie PC9 wurde in der Anwesenheit und Abwesenheit von SecinH3, einem kleinen Molekül, das als GEF-Antagonist für Cytohesine fungiert, indem es spezifisch an die Sec7-Domäne der Cytohesine bindet, bestimmt, wobei die Inhibierung von ARNO/Cytohesin-1 zu einer deutlichen Reduktion des Wachstums von PC9-Zellen führte.

Daher postulierten wir, dass SecinH3 in vivo im Xenograft-Mausmodell das Tumorstadium von einer EGFR-mutierten Adenokarzinom-Zelllinie (PC9) reduzieren könnte.

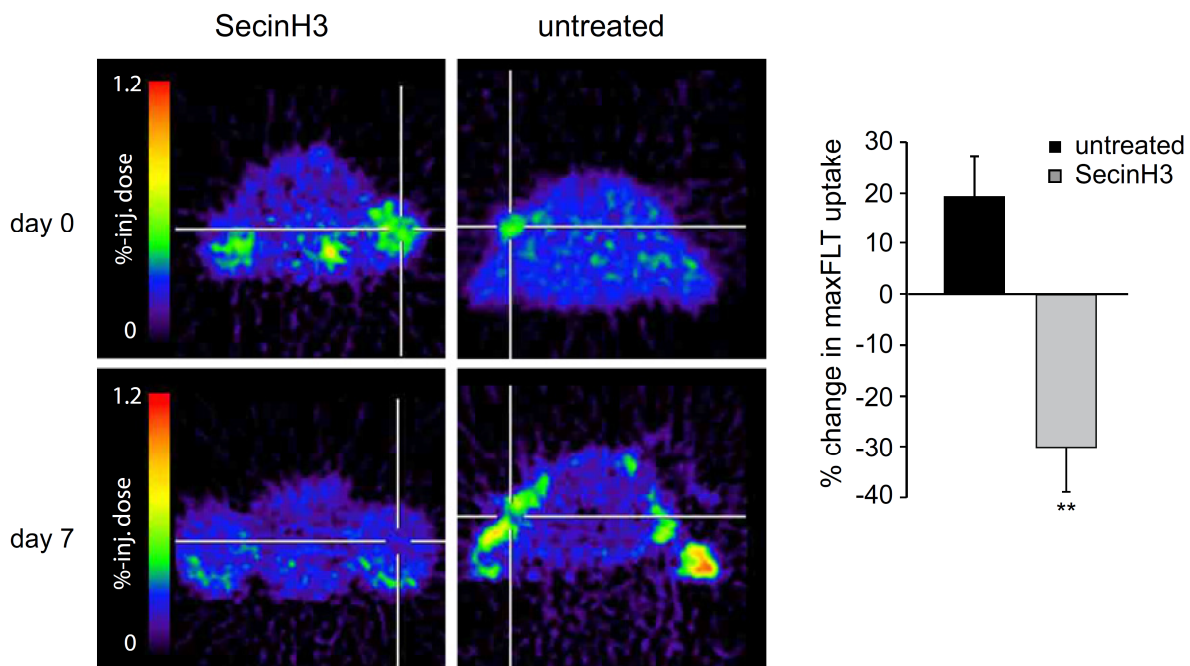
Die folgenden Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Roland Ullrich, die sich auf in-vivo-Bildgebung und Tier-PET-Analysen spezialisiert hat, durchgeführt.

Zur Herstellung der adhären wachsenden Zellkulturen wurden auf EGFR-TKI sensitive Adenokarzinomzellen der Zelllinie PC9 mit einer aktivierenden Mutation des EGFR-Gens verwendet. Die adhären Zelllinien wurden über ca. 3 Wochen in T75-Zellkulturflaschen expandiert, bis eine ausreichende Menge zur subkutanen Injektion in zehn männliche Nacktmäuse erreicht wurde. Die Tumore wurden durch subkutane Injektionen von  $5 \times 10^6$  PC9-Tumorzellen in 6 - 8 Wochen alte nu/nu athymische,

männliche Mäuse erzeugt (Ullrich et al., 2008). Nachdem ein tastbarer bzw. sichtbarer Tumor entstanden war, wurden die zehn Mäuse in zwei Gruppen randomisiert (n = 7), eine Kontrollgruppe, die mit DMSO alleine behandelt wurde, und eine weitere Gruppe, die sieben Tage lang mit SecinH3 gelöst in DMSO therapiert wurde. Den letztgenannten Mäusen wurden täglich intraperitoneale Injektionen mit einem Volumen von 100 µl und einer Dosis von 2,5 mM SecinH3 verabreicht.

Die Tumore wurden an Tag 0 und Tag 7 in vivo auf Proliferationsaktivität mittels FLT-PET-Bildgebung untersucht.

In einer Dosis von 200 µCi/Maus wurde [<sup>18</sup>F]FLT intravenös in die Schwanzvene der Tiere appliziert und nach 60 min eine [<sup>18</sup>F]FLT-Bildgebung durchgeführt. Schließlich wurde die maximale Voxel-Radioaktivität innerhalb des entsprechenden Tumors in der ROI bestimmt. Um das Verhältnis der Aufnahme des radioaktiven Kontrastmittels vor und nach der Therapie mit SecinH3 zu bestimmen, wurde als Referenz ein ROI in das Mediastinum gelegt, da hier eine konstante Aufnahme von [<sup>18</sup>F]FLT beobachtet werden konnte (s. Abbildung 4 und 5, Material und Methoden). Die Daten wurden durch die gesamte injizierte Dosis dividiert, um einen Prozentsatz „injizierte Dosis pro Gramm“ zu erhalten (%ID/g).



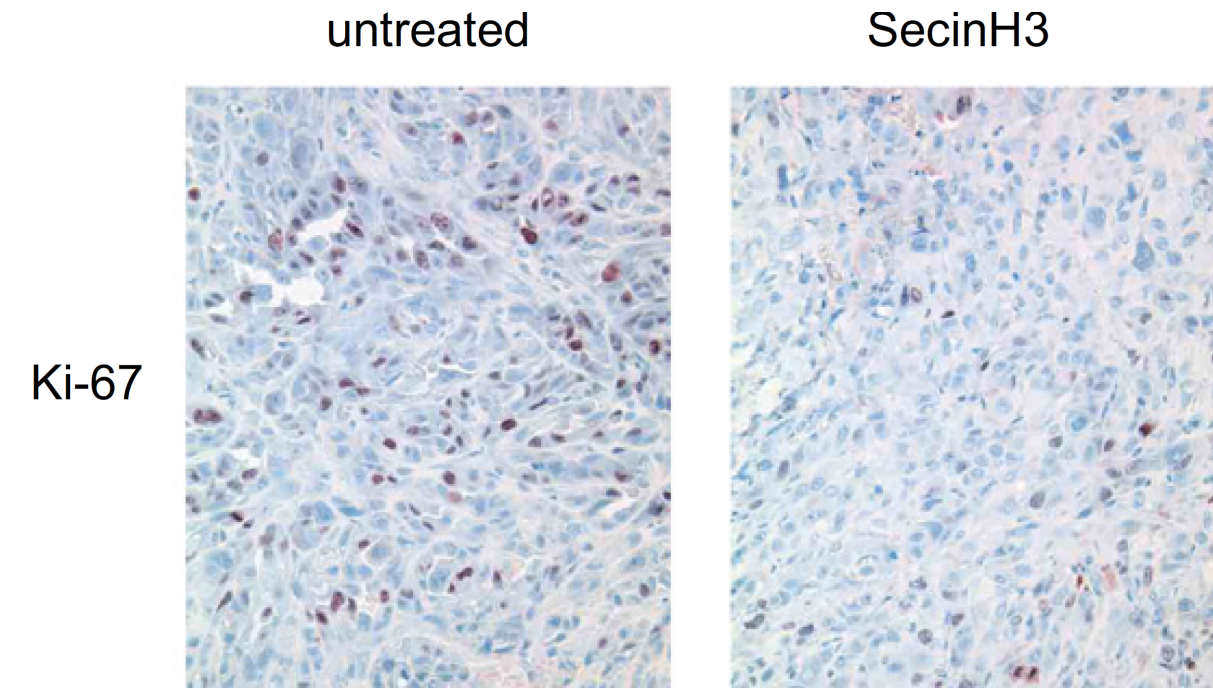
**Abb. 15a+b: [<sup>18</sup>F]FLT PET beweist Ansprechen auf Behandlung mit SecinH3**

(aus (Bill, ..., Meffert et al., 2010)) Gezeigt wird eine charakteristische [<sup>18</sup>F]FLT-PET-Darstellung von Mäusen mit PC9 induzierten Tumoren vor und nach einer siebentägigen Behandlung mit SecinH3 oder einer Kontrollsubstanz (DMSO) \*\*p < 0,01, n = 7. Wird das Tumorwachstum nicht durch SecinH3 bekämpft, nimmt das Tumolvolumen in der unbehandelten Maus (= untreated) deutlich zu (s. unteres linkes Bild). Dementsprechend verändert sich die maximale FLT-Aufnahme in der unbehandelten Maus im Vergleich zu der mit SecinH3 therapierten Maus deutlich (ca. + 19 % im Vergleich zu - 30 %).

Die Tiere wurden nach dem Experiment geopfert, die subkutanen Tumore entnommen und für 24 Stunden in PBS gepuffertem Formalin (4 %) fixiert. Die mit SecinH3 behandelten Tumore stellten sich im Vergleich mit denen der Kontrollgruppe deutlich kleiner dar, zeigten histologisch jedoch keine wesentlichen regressiven Veränderungen. Daher sahen wir uns die Proliferationsaktivität und die Apoptoserate der beiden Gruppen im Weiteren vergleichend an.

**3.6 PC9-Xenograft-Tumore zeigen reduzierte Proliferationsaktivität unter SecinH3-Therapie (Ki-67)**

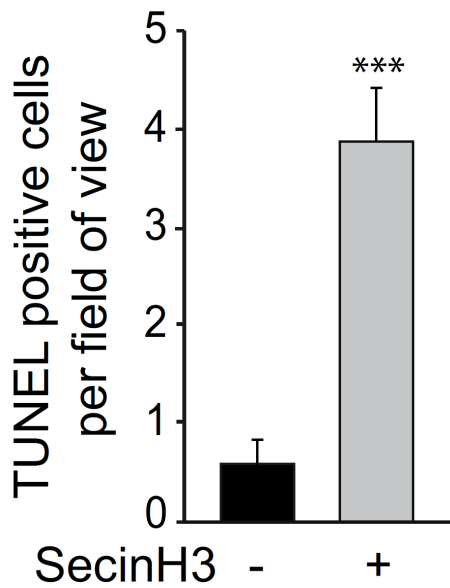
Um die Proliferationsaktivität der mit SecinH3 behandelten Tumore abschätzen zu können, wurden die in Formalin fixierten paraffineingebetteten Tumore mit einem Antikörper gegen das Antigen Ki-67 gefärbt, der während des Zellzyklus in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert wird, und daher direkt Auskunft über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors gibt. Hier kam ein deutlicher Unterschied zwischen den unbehandelten Tumoren mit einer typischen, hohen Proliferationsaktivität im Vergleich zu den mit SecinH3 therapierten Tumoren mit einer reduzierten Wachstumsrate zur Darstellung.



**Abb. 16: SecinH3 reduziert das Wachstum von PC9-Xenograft-Tumoren** (aus (Bill, ..., Meffert et al., 2010)) Es wird eine gegen das Antigen Ki-67 gerichtete Färbung der PC9-Xenograft-Tumore in Nacktmäusen nach der Behandlung mit SecinH3 (rechts) bzw. einer Kontrollsubstanz (DMSO - links) für sieben Tage gezeigt.

### **3.7 PC9-Xenograft-Tumore besitzen eine erhöhte Apoptoserate nach SecinH3-Behandlung**

Um zu untermauern, dass eine Therapie mit SecinH3 bei Adenokarzinomzellen der Lunge mit einer aktivierenden EGFR-Mutation effektiv ist und eine Tumorregression induziert, führten wir zusätzlich eine Färbung nach der TUNEL-Methode zur Detektion von apoptotischen Tumorzellen an den in Formalin fixierten paraffineingebetteten Tumoren durch. In dem Diagramm kommt die Anzahl an TUNEL-positiven Tumorzellen pro Gesichtsfeld (x 100) zur Darstellung. Pro Tumor bzw. Behandlungsgruppe (n = 7) wurden zehn repräsentative Gesichtsfelder (x 100) (HPF = high power fields) ausgewertet. Die mit SecinH3 behandelten Tumore wiesen durchschnittlich 35 TUNEL positive Zellen pro 10 HPF auf, während die Kontrolltiere, die nur mit Lösungsmittel (DMSO) behandelt worden waren, nur 11 TUNEL positive Zellen pro 10 HPF zeigten (p < 0,001, T-test).



**Abb. 17: SecinH3 bewirkt Apoptose in PC9-Xenograft-Tumoren**

(aus (Bill, ..., Meffert et al., 2010)) Dargestellt wird das Ergebnis einer TUNEL-Färbung von PC9-Xenograft-Tumoren in Nacktmäusen nach der Behandlung mit SecinH3 oder einer Kontrollsubstanz (DMSO) für sieben Tage. Das Diagramm zeigt die Anzahl von TUNEL-positiven Zellen pro high power Mikroskopierfeld. Pro Behandlungsgruppe wurden 10 repräsentative Felder ausgewertet. \*\*\* $p < 0,001$ . Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Durchschnitts.

## 4. Diskussion

Das Bronchialkarzinom bildet trotz kontinuierlicher Verbesserung der diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten die häufigste tumorbedingte Todesursache in den westlichen Industrienationen und hat damit erhebliche sozioökonomische Folgen. Weltweit ist es die häufigste Krebsart. Jedes Jahr kommen ca. 1,61 Millionen neue Fälle hinzu, dies entspricht 13 % aller Krebsfälle. In Deutschland ist das Bronchialkarzinom mit über 42.000 Sterbefällen im Jahr 2008 die vierthäufigste Todesursache und die häufigste Krebstodesursache (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2012).

In den letzten 30 Jahren hat sich das Gesamtüberleben von unter einem Jahr bei Patienten mit Bronchialkarzinom in einem Stadium III bis IV so gut wie nicht verbessert. Erst in den vergangenen Jahren wurde das therapeutische Armamentarium zur Behandlung der fortgeschrittenen Tumorstadien des NSCLC um einige molekulare, zielgerichtete Therapieansätze erweitert, die spezifisch auf die Pathomechanismen des Tumors ausgerichtet sind. Nur bei diesen gerichteten Ansätzen konnte eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens in molekular definierten Subgruppen erreicht werden (Seidel et al., 2013).

Insbesondere für Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge, das EML4-ALK-Tanslokationen oder aktivierende Mutationen des EGFR aufweist, liegen inzwischen zugelassene gerichtete Therapieoptionen vor. Aktivierende Mutationen des EGFR finden sich in ca. 15 % der Adenokarzinome der Lunge, sie korrelieren mit der Wirksamkeit von so genannten niedermolekularen EGFR-TKI, die an die intrazelluläre Domäne des EGFR binden (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Riely et al., 2006).

Durch eine reversible, selektive Bindung dieser TKI – wie z.B. der 4-Anilinoquinazoline Gefitinib und Erlotinib – an die intrazelluläre, katalytische ATP-Domäne des EGFR, konkurrieren sie als kompetitiver Inhibitor um ATP und verhindern so die EGFR-Autophosphorylierung (Wakeling et al., 2002).

Das Therapieansprechen der TKI kann durch sogenannte intrinsische und erworbene Therapieresistenzen negativ beeinflusst werden. Bei ca. 16 - 36 % aller Patienten mit NSCLC können aktivierende Mutationen des K-RAS-Gens bestehen, die zu einer

EGFR-unabhängigen Aktivierung von MAPK führen und mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Marchetti et al., 2009; Sharma et al., 2007).

Eine Substitution von Methionin durch Threonin an Codon 790 (T790M) in Exon 20 wird bei ca. 50 % der Patienten mit NSCLC gefunden, die zunächst positiv auf eine Therapie mit TKI angesprochen haben, und führt zur einer erworbenen Resistenz gegenüber z.B. Gefitinib und Erlotinib (Kobayashi et al., 2005; Kosaka et al., 2006; Kwak et al., 2005; Pao et al., 2005b; Sharma et al., 2007).

Trotz aller Fortschritte der gegen den EGFR gerichteten Therapien ist die Biologie des EGFR-Signalweges noch nicht vollständig erforscht. So sprechen z.B. ca. 20 % der Patienten mit aktivierenden EGFR-Mutationen nicht auf eine Inhibierung des Rezeptors durch TKI an, ohne dass es hierfür bisher eine biochemische Erklärung gab. Eine Vielzahl von Wechselwirkungen beeinflusst die Signalwirkung des EGFR positiv oder negativ. Jedoch war bisher keine regulativ wirkende zytoplasmatische Komponente bekannt, deren Aktivität direkte Auswirkung auf den Prozess der ligandeninduzierten Rezeptorphosphorylierung hatte (Shilo, 2010).

Die Dimerisierung des EGFR sowie die Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne scheinen der kristallographischen, biochemischen und biophysikalischen Datenlage zu Folge klar geregelte und vollständig ausgeglichene Prozesse zu sein, wobei weitestgehend unklar bleibt, wie diese Balance erreicht wird. Das ursprüngliche Modell der EGFR-Aktivierung sah vor, dass die Aktivierung der EGFR-Kinase durch eine fortlaufende Informationsweitergabe von der extrazellulären zur intrazellulären Domäne, die über eine EGF-abhängige Dimerisierung der extrazellulären zu einer der zytoplasmatischen Seite führte, zu Stande kam (Yarden und Schlessinger, 1987). Dieser Vorgang der Auflösung des autoinhibierten Zustandes der Kinasedomäne scheint jedoch komplexer zu sein. Die alleinige Dimerisierung des EGFR reicht zur Aktivierung nicht aus. Zudem ist lediglich ein Teil der dimerisierten ErbB-Rezeptoren katalytisch aktiv (Gadella und Jovin, 1995; Moriki et al., 2001). Schließlich konnten Chung et al. zeigen, dass die Rezeptor-Dimerisierung auch in der Abwesenheit eines Liganden kontinuierlich und reversibel abläuft (Chung et al., 2010). In den letzten Jahren wurden mehrere kristallographische Studien durchgeführt, deren Ergebnisse vermuten lassen, dass lediglich eine Untergruppe der Dimere – die asymmetrische Dimere genannt werden – eine bestimmte

Konformation annehmen können und katalytisch aktiv sind (Jura et al., 2009; Red Brewer et al., 2009; Zhang et al., 2006). Nach Red Brewer et al. gibt es eine Domäne innerhalb der zytoplasmatischen juxtamembranären Region des EGFR, die eine stabilisierende Wirkung auf die Dimere hat sowie eine aktivierende Rolle auf die Tyrosinkinase ausübt; diese kann in Lungenkarzinomen mit Einfluss auf die Aktivität des EGFR mutiert sein (Red Brewer et al., 2009). Die Bindung eines Liganden, wie z.B. des EGF, an die blockierende extrazelluläre Domäne bewirkt eine Lösung der inhibierenden Verbindung zwischen der juxtamembranären Region und der Kinasedomäne, sodass eine Dimerisierung zwischen den beiden juxtamembranären Domänen stattfinden kann, die wiederum den Dimer der Kinasedomäne stabilisiert (Jura et al., 2009). Schließlich zeigten Zhang et al., dass die Kinasedomäne in einem autoinhibierten Zustand besteht, dessen allosterische Aktivierung die Bildung eines asymmetrischen Dimers benötigt, bei dem das C-terminale Ende einer Tyrosinkinasedomäne an die N-terminale Sequenz seines Dimerisierungspartners andockt und über diese Konformationsänderung den aktiven Zustand stabilisiert (Zhang et al., 2006).

Zusammenfassend sieht das heutige Modell vor, dass die Aktivierung der EGFR-Kinase auf der intrinsischen Fähigkeit beruht, aktive, asymmetrische Dimere zu bilden, sobald der autoinhibierte Zustand der Kinasedomäne aufgelöst wird (Bose und Zhang, 2009; Ferguson, 2008). Der einzige Aktivator, der in diesem Modell benötigt wird, ist der Ligand EGF, der an die Ektodomäne des Rezeptors bindet und dadurch eine strukturelle Neuordnung bewirkt bzw. stabilisiert, die die Kinasedomäne aus ihrem autoinhibierten Zustand löst.

Während der EGF seine Funktion, die Autoinhibierung des ungebundenen Rezeptors aufzulösen, von der extrazellulären Seite ausübt, konnten wir zeigen, dass Cytohesine von der zytoplasmatischen Seite her wirken und die EGFR-Signalkaskade abstimmen. Dies geschieht durch eine Erhöhung der Anzahl von ligandengebundenen EGFR-Dimeren, die die katalytisch aktive Konformation besitzen.

Gemeinsam mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Michael Famulok, LIMES-Institut der Universität Bonn, und Dr. Roland Ullrich, Max Planck Institut an der medizinischen Fakultät der Universität Köln, konnten Cytohesine als Aktivatoren des EGFR ermittelt werden, die die Rezeptoraktivierung durch eine direkte Wechselwirkung mit der



zytoplasmatischen Domäne von dimerisierten EGF-Rezeptoren erhöhen und damit eine Konformationsneuanordnung erleichtern (Bill et al., 2010; Shilo, 2010). Mittels immunhistochemischer Färbungen von Adenokarzinomen der Lunge konnte ich zeigen, dass eine erhöhte Expression von Cytohesinen mit einer gesteigerten EGFR-Aktivierung und Signalwirkung korreliert. Des Weiteren führt eine chemische Inhibierung dieser Cytohesine durch SecinH3 zu einer Reduktion des Wachstums von EGFR-abhängigen Adenokarzinomzellen der Lunge in vitro und in Mausmodellen in vivo. Diese Ergebnisse zeigen, dass Cytohesine eine zentrale Rolle in der Regulation des EGFR Signalwegs spielen und somit eine potentielle Zielstruktur für gerichtete Therapien darstellen. Des Weiteren könnte eine Überexpression von Cytohesinen eine Erklärung für die primäre Resistenz von EGFR-mutierten Tumoren sein, die nicht auf eine gegen den EGFR gerichtete Therapie ansprechen.

Abgesehen von Dok-7 wurden bisher keine anderen zytoplasmatischen Aktivatoren für Rezeptortyrosinkinasen beschrieben. Das zytoplasmatische Adapterprotein Dok-7 ist für die Bildung der neuromuskulären Synapse unentbehrlich; durch die Dimerisierung zum Teil autophosphorylierter und damit aktivierter Monomere steigert es die Aktivität der muskelspezifischen Rezeptorkinase MuSK (= muscle-specific kinase) (Bergamin et al., 2010; Inoue et al., 2009). Cytohesine hingegen beeinflussen weder die Dimerisierung des Rezeptors noch benötigen sie eine Autophosphorylierung des EGFRs für die Bindung; sie agieren als allosterische Aktivatoren der Rezeptordimere (Bill et al., 2010).

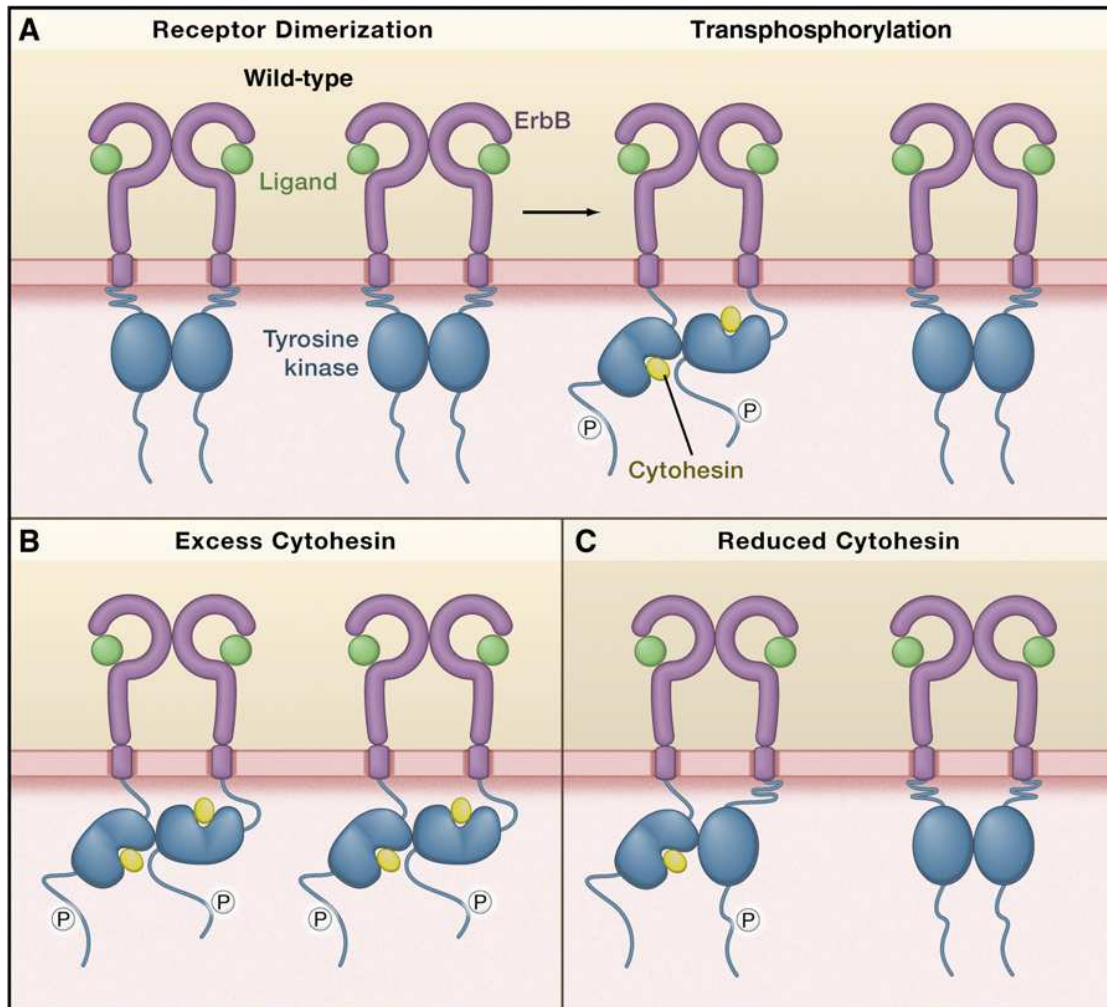
Die starke Expression von ARNO/Cytohesin-1 in Tumorgewebe lässt darauf schließen, dass Cytohesine in Zukunft ein weiteres Angriffsziel in der Therapie der NSCLC darstellen werden. Hierfür beweisend ist die von uns bestimmte posttherapeutische Proliferationsrate mit und ohne SecinH3-Therapie mittels der immunhistochemischen Färbung mit Ki-67 sowie die Durchführung der TUNEL-Färbung.

Aus unseren Ergebnissen lässt sich folgern, dass eine Erweiterung des aktuellen Modells der EGFR-Aktivierung unter der Hinzunahme von Cytohesinen als EGFR-Aktivatoren durchgeführt werden sollte. Cytohesine wirken positiv regulierend, indem sie die strukturelle Neuanordnung erleichtern, die erforderlich ist, um den Rezeptordimer in seine aktive Form zu überführen.

Der EGFR ist jedoch trotz der zytoplasmatischen Cytohesine weiter abhängig von der Aktivität von Liganden, da die Autoinhibierung, die durch die extrazelluläre Domäne auf die Kinasedomäne übertragen wird, nur durch die Bindung eines Liganden gelöst werden kann (Zhu et al., 2003). Eine Dysregulierung von zytoplasmatischen EGFR-Aktivatoren wie ARNO/Cytohesin-1 könnte jedoch zu einer unkontrollierten Signalwirkung des EGFR führen. Dies ist eine charakteristische Eigenschaft vieler Krebsarten u.a. des Adenokarzinoms der Lunge (Gazdar, 2009). Die Mehrzahl der Lungentumore, die auf eine Therapie mit TKI anspricht, hat einen hochregulierten oder mutierten EGFR-Status (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004). Dennoch konnten Sharma und Settleman darlegen, dass ca. 18 % der Patienten, die ein partielles Ansprechen auf eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren zeigen, keine der üblicherweise nachgewiesenen Mutationen des EGFR besitzen. Dies deutet darauf hin, dass es zusätzliche molekulare Faktoren geben muss, die das klinische Ansprechen auf TKI in einem Teil der NSCLC bestimmen (Sharma und Settleman, 2009). Bisher konnte nicht herausgefunden werden, wie diese EGFR-abhängigen Tumorzellen eine ausreichende Signalaktivität des EGFR aufrecht erhalten können. Die Ergebnisse unserer Arbeit liefern hier eine mögliche Erklärung für die Abhängigkeit dieser Krebszellen vom EGFR: Die Überexpression von ARNO/Cytohesin-1 ist mit einem hochregulierten, aktivierten Signalweg von EGF in Adenokarzinomzellen der Lunge assoziiert. Des Weiteren belegen unsere Ergebnisse, dass die Proliferation der EGFR-abhängigen Tumorzellen durch eine Inhibierung der Cytohesine entscheidend reduziert wird. Somit werden in unserer Arbeit Cytohesine als eine neuartige Substanzklasse von intrazellulären EGFR-Aktivatoren vorgestellt, die eine große pathophysiologische Bedeutung als neues Angriffsziel bei der Behandlung der ErbB-Rezeptor-abhängigen Krebsarten mit kleinen, molekularen, zielgerichteten Therapeutika, die nicht auf den Rezeptor selbst, sondern auf seine Aktivatoren gerichtet sind, besitzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit – gemeinsam mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Michael Famulok, LIMES-Institut der Universität Bonn, und Dr. Roland Ulrich, Max Planck Institut an der medizinischen Fakultät der Universität Köln, - wurden 2010 durch Shilo kommentiert und mittels der unten aufgeführten Graphik vereinfacht dargestellt. Shilo betont insbesondere, dass mit unserer Studie eine neue Möglichkeit für die signal-

empfangende Zelle gefunden wurde, ihr Rezeptortyrosinkinase-Signal bereits früh – auf Höhe der Rezeptorphosphorylierung – im Signalprozess abzuändern (Shilo, 2010).



**Abb. 18: Cytohesinlevel regulieren die Phosphorylierung des ErbB-Dimers (aus (Shilo, 2010))**

(A) Nach der Bindung eines Liganden bilden die Rezeptortyrosinkinasen des ErbB-Rezeptors Dimere. Um die Kinasedomäne zu aktivieren und eine Transphosphorylierung zu bewirken, müssen Änderungen der Konformation, die die Entstehung von asymmetrischen Dimeren induzieren, stattfinden. Eine direkte Bindung von Cytohesinen an die zytosolische Domäne vereinfacht diese Konformationsänderung.

(B) Eine Überexpression von Cytohesinen, die in einigen Adenokarzinomen der Lunge auftritt, erhöht die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors.

(C) Eine Reduzierung der Cytohesinlevel, z.B. als Folge einer Behandlung mit dem spezifischen Cytohesininhibitor SecinH3, führt zu einer Verringerung der Rezeptorphosphorylierung,

## 5. Zusammenfassung

In der Behandlung fortgeschrittener – insbesondere solider – Tumorentitäten hat sich im letzten Jahrzehnt eine entscheidende Entwicklung weg von Standard-Radio-Chemotherapie-Regimen hin zu einer personalisierten Medizin, die auf die genetischen Eigenschaften der einzelnen Tumorzelle ausgerichtet ist, abgezeichnet. Im Rahmen der aktuellen Forschung bei Bronchialkarzinomen spielen hierbei u.a. Wachstumsfaktor-rezeptoren eine bedeutende Rolle. Gemeinsam mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Michael Famulok, LIMES-Institut der Universität Bonn, und Dr. Roland Ullrich, Max Planck Institut an der medizinischen Fakultät der Universität Köln, konnten Cytohesine erstmalig als regulativ wirkende zytoplasmatische Aktivatoren des EGFR ermittelt werden, die die Rezeptoraktivierung durch eine direkte Wechselwirkung mit der zytoplasmatischen Domäne von dimerisierten EGF-Rezeptoren erhöhen und damit eine Konformationsneuanordnung – je nach dem jeweiligen Bedarf der einzelnen Zelle – erleichtern.

Mittels immunhistochemischer Färbungen von Adenokarzinomzellen der Lunge konnten in meiner Arbeit die zuvor in vitro gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden: Die Tumorzellen zeigten eine Überexpression von ARNO/Cytohesin-1; des Weiteren korrelierten diese erhöhten Expressionsraten mit einer gesteigerten Autophosphorylierung des EGFR (pEGFR). Schließlich zeigte sich bei der immunhistochemischen Anfärbung mit Antikörpern, die gegen pAkt und pp42/pp44 gerichtet sind, dass die durch die Überexpression von ARNO/Cytohesin-1 vermittelte Aktivitätssteigerung des pEGFR auch über zwei der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden fortgeleitet wird. Um zu demonstrieren, dass dabei pEGFR und ARNO/Cytohesin-1 auf denselben Zellen kolokalisiert sind, wurde zusätzlich eine Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von Adenokarzinomzellen der Lunge, durchgeführt.

Im Folgenden konnte im Mausmodell demonstriert werden, dass sich ARNO/Cytohesin-1 durch SecinH3, einen GEF-Antagonist gegen Cytohesine, inhibieren lässt. Hierzu wurde in Zellkulturen die Zelllinie PC9 expandiert, die athymischen männlichen Nacktmäusen subkutan injiziert wurde. Eine Hälfte der Mäuse wurde durch intraperitoneale Injektionen mit SecinH3 behandelt. Mittels FLT-PET-Bildgebung wurden die Tumorgrößen der therapierten und nicht-therapierten Mäuse verglichen; hier zeigte sich nach der

Behandlung mit SecinH3 eine deutliche Verkleinerung der jeweiligen Tumore. Bei einer posttherapeutischen Analyse des Ki-67-Proliferationsindex ließ sich eine reduzierte Wachstumsrate der Tumorzellen nachweisen. Schlussendlich ließ sich mittels der TUNEL-Methode zur Detektion von apoptotischen Tumorzellen ebenfalls ein Therapieansprechen auf SecinH3 demonstrieren.

Unsere Ergebnisse belegen, dass Cytohesine eine neuartige Substanzklasse intrazellulärer EGFR-Aktivatoren darstellen, die bei einer Überexpression zu einer unkontrollierten Signalwirkung des EGFR führen können. In Zukunft könnten sie eine große pathophysiologische Bedeutung als neue Angriffsziele bei der Behandlung der EGFR-abhängigen Tumorzellen mit zielgerichteten Therapeutika, die nicht auf den Rezeptor selbst, sondern auf seine Aktivatoren gerichtet sind, besitzen.

## 6. Anhang

Tab. 10: Patientenkollektiv mit allen Färbungen und Ergebnissen

N	GJ	w/m	Histo	G	TNM	G Nr.	Lokalisation	EGFR	Tyr-992	Tyr-1068	Tyr-1173	average pEGFR	Arno1	Arno 2	Arno 3	average Arno	Akt	pp42/pp44	Stat3
1	1928	m	pluriform, drüsig, plattenepithelial	niedrig	pT3, pN1	G3	re. Lunge	3	2	0	0	0,67	2	1	2	1,67	0	0	3
2	1940	m	Adeno-Ca	mittel			re. Ober-/Mittellappen	3	2	1	1	1,33	2	2	3	2,33	1	2	3
3	1924	m	Adeno-Ca	mittel			re. Unterlappen, direkt subpleural	0	1	0	0	0,33	1	1	1	1,00	1	0	3
4	1935	m	Adeno-Ca	niedrig	pT3, pN1; R1	G3	re. Oberlappen	3	0	1	0	0,33	1	1	1	1,00	0	0	2
5	1934	m	Adeno-Ca	mittel-hoch	pT2, pN1		re. Oberlappen, zentral	1	2	0	1	1,00	1	1	2	1,33	2	0	2
6	1909	m	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär	mittel	pT2		re. Unterlappen	1	1	1	0	0,67	2	1	2	1,67	0	0	1
7	1930	f	Adeno-Ca	niedrig	pT2, pN0	G3	li. Unterlappen peripher	0	0	0	0	0,00	1	1	1	1,00	0	0	0
8	1918	f	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär	mittel	pT1, pN0	G2	re. Mittellappen	0	0	0	0	0,00	1	1	1	1,00	0	0	2
9	1933	m	Adeno-Ca	mittel	pT2, pN0		re. Oberlappen	0	0	0	0	0,00	1	1	1	1,00	0	0	2
10	1941	f?	Adeno-Ca	mittel	pT1, pN2	G2	li. Oberlappen, zentral	2	3	0	2	1,67	2	2	3	2,33	2	0	2
11	1929	f	Adeno-Ca	niedrig	pT1, pN0; R0		li. Oberlappen	2	2	0	0	0,67	1	1	2	1,33	3	0	0
12	1947	m	schleimbildendes Ca	mittel-niedrig	pT1, pN1	G2-G3	re. Oberlappen peripher	3	2	3	3	2,67	2	2	2	2,00	3	2	2
13	1947	f	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär	mittel	pT2, pN0	G2	re. Oberlappen peripher	0	0	0	0	0,00	2	2	3	2,33	1	0	0
14	1939	m	Adeno-Ca, überwiegend solide	niedrig	pT2, pN2		li. Lunge peripher	1	0	0	0	0,00	2	2	3	2,33	0	0	1
15	1927	m	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär/azinär	mittel-niedrig	pT2, pN1	G2-G3		3	2	0	3	1,67	2	3	3	2,67	3	3	2
16	1935	f	solides/drüsiges Ca	niedrig	pT1	G3		3	3	0	0	1,00	2	2	3	2,33	2	2	2
17	1919	f	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär	hoch	pT2		re. Mittellappen	1	0	3	1	1,33	2	3	3	2,67	2	3	3

N	GJ	w/m	Histo	G	TNM	G Nr.	Lokalisation	EGFR	Tyr-992	Tyr-1068	Tyr-1173	average pEGFR	Arno1	Arno 2	Arno 3	average Arno	Akt	pp42/pp44	Stat3
18	1925	f	Adeno-Ca, überwiegend solide	niedrig	pT1, pN1	G3	re. Oberlappen	2	2	0	2	1,33	2	2	2	2,00	1	2	1
19	1925	f	Adeno-Ca, squamös	mittel	pT2, pN1	G2	re. Unterlappen	2	0	1	1	0,67	2	3	3	2,67	2	0	0
20	1937	m	Adeno-Ca	niedrig	pT3, pN1	G3	li. Lunge, zentral	3	0	0	0	0,00	1	0	0	0,33	0	0	0
21	1935	m	Adeno-Ca	niedrig	pT2, pN2	G2-G3	re. Unterlappen, zentral	2	2	3	0	1,67	1	2	2	1,67	2	0	3
22	1930	m	Adeno-Ca	mittel-niedrig	pT2, pN0	G2-G3	re. Unterlappen	2	1	0	0	0,33	2	2	2	2,00	1	0	3
23	1927	f	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär	mittel	pT2, pN0	G2	re. Oberlappen, latero-dorsal	1	0	3	0	1,00	2	2	1	1,67	0	0	2
24	1926	m	Adeno-Ca	mittel-niedrig	pT2, pN2	G2-G3	re. Unterlappen	2	1	1	1	1,00	2	2	2	2,00	1	0	2
25	1930	f	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär	mittel	pT2, pN0	G2	re. Unter-/Mittellappen	3	2	1	2	1,67	2	2	2	2,00	0	3	2
26	1939	f	Adeno-Ca	mittel-niedrig	pT2, pN1	G2-G3	re. Oberlappen	2	0	3	0	1,00	1	2	1	1,33	0	0	0
27	1948	f	Adeno-Ca, solide	niedrig	pT1, pN0	G3	re. Oberlappen	0	1	0	0	0,33	2	3	2	2,33	2	1	2
28	1937	m	Adeno-Ca	niedrig	pT2, pN1	G3	re. Lunge, alle drei Lappen	1	3	0	1	1,33	2	2	2	2,00	0	0	1
29	1944	m	Adeno-Ca	niedrig	pT1, pN0	G3	re. Oberlappen	3	0	0	0	0,00	2	2	2	2,00	2	2	0
30	1932	m	Adeno-Ca, papillär	mittel-hoch	pT2	G1	re. Oberlappen	3	2	0	1	1,00	2	2	2	2,00	2	3	3
31	1943	f	Adeno-Ca	niedrig	pT2, pN2	G3	re. Oberlappen	1	0	0	0	0,00	1	1	1	1,00	0	0	2
32	1935	m	Adeno-Ca	niedrig	pT1	G3	re. Unterlappen	3	0	0	0	0,00	2	1	1	1,33	0	3	0
33	1943	m	Adeno-Ca	niedrig	pT2	G3	li. Oberlappen	1	2	0	2	1,33	2	2	2	2,00	0	3	3
34	1941	m	Adeno-Ca	niedrig	pT1	G3	re. Oberlappen	0	0	0	0	0,00	3	2	2	2,33	0	0	2
35	1938	m	Adeno-Ca	niedrig	pT2, pN0	G2-G3	re. Oberlappen	2	0	0	0	0,00	1	1	1	1,00	0	0	0
36	1958	?	Adeno-Ca, papillär	niedrig	pT3, pN2		li. Lunge, zentral	2	0	0	0	0,00	1	1	1	1,00	0	0	2
37	1944	f	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär	mittel	pT2, pN2, M1	G2	re. Ober-/Mittellappen	2	0	0	2	0,67	3	3	3	3,00	0	0	3
38	1938	f	Adeno-Ca, papillär	mittel	pT2, pN0, R0	G2	re. Oberlappen	2	2	0	2	1,33	2	3	3	2,67	3	1	2

N	GJ	w/m	Histo	G	TNM	G Nr.	Lokalisation	EGFR	Tyr-992	Tyr-1068	Tyr-1173	average pEGFR	Arno1	Arno 2	Arno 3	average Arno	Akt	pp42/pp44	Stat3
39	1942	f	Adeno-Ca, teils drüsig, teils solide		pT1			2	1	0	2	1,00	2	2	2	2,00	0	3	0
40	1948	f	Adeno-Ca	niedrig	pT2, pN1, M1, R1	G3	li. Oberlappen	2	0	2	2	1,33	2	3	3	2,67	3	0	2
41	1938	f	Adeno-Ca, bronchiolo-alveolär	mittel	pT2, pN1	G2	re. Oberlappen	3	0	3	0	1,00	1	2	2	1,67	0	0	3
42	1933	m	Adeno-Ca	mittel	pT3, pN0, L1	G2	re. Oberlappen	3	0	3	0	1,00	1	1	2	1,33	0	0	0
43	1935	m	Adeno-Ca, papillär	mittel	pT2, pN0, R0	G2	re. Unterlappen	2	0	0	0	0,00	2	3	2	2,33	0	0	3
44	1934	m	Adeno-Ca	mittel-niedrig	pT2, pN1, R0	G2-G3	li. Unterlappen	3	0	3	0	1,00	1	2	2	1,67	0	0	2
45	1934	f	Adeno-Ca	mittel	pT2, pN1, R0	G2	re. Unterlappen	3	2	2	3	2,33	3	2	3	2,67	0	0	3

Tab. 11: ARNO/Cytohesin-1 gegen pEGFR

ARNO \ pEGFR	0	1	2	3
0	100 %	/	/	/
1	69 %	31 %	/	/
2	29 %	54 %	13 %	4 %
3	/	71 %	29 %	/



**Tab. 12: ARNO/Cytohesin-1 gegen pAkt**

ARNO \ pAkt	0	1	2	3
0	100 %	/	/	/
1	77 %	8 %	8 %	8 %
2	50 %	21 %	25 %	4 %
3	29 %	/	29 %	43 %

**Tab. 13: ARNO/Cytohesin-1 gegen pp42/pp44**

ARNO \ pp42/pp44	0	1	2	3
0	100 %	/	/	/
1	92 %	/	/	8 %
2	58 %	4 %	21 %	17 %
3	57 %	14 %	/	29 %

## 7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### Tabellen:

- 1) Lungenkrebs – die wichtigsten epidemiologischen Zahlen für Deutschland
- 2) Histologische Klassifizierung des Bronchialkarzinoms
- 3) TNM-Klassifikation nach IASLC (UICC 7. Auflage)
- 4) Stadieneinteilung nach IASLC (UICC 7. Auflage)
- 5) Klassifikation des Stadiums IIIA nach Robinson et al., 2007
- 6) Ablauf der immunhistochemischen Färbung
- 7) Splitten der adhärenen Zellen der Zellkulturen
- 8) TUNEL-Methode
- 9) Doppelfärbung mit pEGFR 1068 (Maus), ARNO C20 (Ziege) und DAPI
- 10) Patientenkollektiv mit allen Färbungen und Ergebnissen
- 11) ARNO/Cytohesin-1 gegen pEGFR
- 12) ARNO/Cytohesin-1 gegen pAkt
- 13) ARNO/Cytohesin-1 gegen pp42/pp44

### Abbildungen:

- 1) Therapie mit EGFR-Inhibitoren bei EGFR-mutierten Lungenkarzinomen verbessert das Überleben deutlich
- 2) Molekulare Resistenzmechanismen des EGFR
- 3) Schematische Darstellung des EGFR
- 4) EGFR und weiterleitende Signaltransduktionskaskaden
- 5) Molekulare Struktur von Secin H3
- 6) Herstellung eines Tissue Micro Arrays
- 7) Layout eines Tissue Micro Arrays
- 8) Ermittlung der „region of interest“ des jeweiligen Tumors
- 9) Ermittlung der „region of interest“ des Referenzgewebes
- 10) Adenokarzinomzellen der Lunge zeigen eine Überexpression von Cytohesinen

- 11) Adenokarzinomzellen der Lunge zeigen eine Überexpression von Cytohesinen
- 12) Hohe Expressionsraten von ARNO/Cytohesin-1 korrelieren mit einer gesteigerten Autophosphorylierung des EGFR (= pEGFR)
- 13) Hohe Expressionsraten von ARNO/Cytohesin-1 korrelieren mit einer erhöhten Signalwirkung des EGFR in menschlichen Adenokarzinomen der Lunge
- 14) Koexpression von pEGFR und ARNO/Cytohesin-1 in menschlichen Adenokarzinomen der Lunge
- 15) [<sup>18</sup>F]FLT PET beweist Ansprechen auf Behandlung mit SecinH3
- 16) SecinH3 reduziert das Wachstum von PC9-Xenograft-Tumoren
- 17) SecinH3 bewirkt Apoptose in PC9-Xenograft-Tumoren
- 18) Cytohesinlevel regulieren die Phosphorylierung des ErbB-Dimers (aus (Shilo, 2010))

## 8. Literaturverzeichnis

Abdullah SE, Haigentz M Jr, Piperdi B. Dermatologic Toxicities from Monoclonal Antibodies and Tyrosine Kinase Inhibitors against EGFR: Pathophysiology and Management. *Chemother Res Pract* 2012; 351210: 1-10

Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, Zhu Yr YR, Sanchez-Cespedes M, Yang SC, Haasler GB, Kajdacsy-Balla A, Demeure MJ, 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

Albain KS, Crowley JJ, LeBlanc M, Livingston RB. Determinants of improved outcome in small-cell lung cancer: an analysis of the 2,580-patient Southwest Oncology Group data base. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1563-1574

Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT, 3rd, Shepherd FA, Smith C, Chen Y, Livingston RB, Feins RH, Gandara DR, Fry WA, Darling G, Johnson DH, Green MR, Miller RC, Ley J, Sause WT, Cox JD. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *Lancet* 2009; 374: 379-386

Alvarez JV, Greulich H, Sellers WR, Meyerson M, 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

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

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J, International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative G. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 351-360

Arriagada R, Dunant A, Pignon JP, Bergman B, Chabowski M, Grunenwald D, Kozlowski M, Le Pechoux C, Pirker R, Pinel MI, Tarayre M, Le Chevalier T. Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant Cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 35-42

Arriagada R, Le Chevalier T, Riviere A, Chomy P, Monnet I, Bardet E, Santos-Miranda JA, Le Pehoux C, Tarayre M, Benhamou S, Laplanche A. Patterns of failure after prophylactic cranial irradiation in small-cell lung cancer: analysis of 505 randomized patients. *Ann Oncol* 2002; 13: 748-754

Arteaga CL. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* 2002; 29: 3-9

Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 893-901

Auperin A, Arriagada R, Pignon JP, Le Pechoux C, Gregor A, Stephens RJ, Kristjansen PE, Johnson BE, Ueoka H, Wagner H, Aisner J. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 476-484

Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, Fain P, Schwartz AG, You M, Franklin W, Klein C, Gazdar A, Rothschild H, Mandal D, Coons T, Slusser J, Lee J, Gaba C, Kupert E, Perez A, Zhou X, Zeng D, Liu Q, Zhang Q, Seminara D, Minna J, Anderson MW. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 460-474

Batzer AG, Rotin D, Urena JM, Skolnik EY, Schlessinger J. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5192-5201

Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, 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

Berenson JR. Recommendations for zoledronic acid treatment of patients with bone metastases. *Oncologist* 2005; 10: 52-62

Bergamin E, Hallock PT, Burden SJ, Hubbard SR. The cytoplasmic adaptor protein Dok7 activates the receptor tyrosine kinase MuSK via dimerization. *Mol Cell* 2010; 39: 100-109

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, Shepherd FA. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR. 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

Bill A, Schmitz A, Albertoni B, Song JN, Heukamp LC, Walrafen D, Thorwirth F, Verveer PJ, Zimmer S, Meffert L, Schreiber A, Chatterjee S, Thomas RK, Ullrich RT, Lang T, Famulok M. Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell* 2010; 143: 201-211

Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 2007; 129: 865-877

Bose R, Zhang X. The ErbB kinase domain: structural perspectives into kinase activation and inhibition. *Exp Cell Res* 2009; 315: 649-658

Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001; 18: 1059-1068

Bremnes RM, Sundstrom S, Aasebo U, Kaasa S, Hatlevoll R, Aamdal S, Norwegian Lung Cancer Study G. The value of prognostic factors in small cell lung cancer: results from a randomised multicenter study with minimum 5 year follow-up. *Lung Cancer* 2003; 39: 303-313

Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001; 61: 3986-3997

Busam KJ, Capodiecì P, Motzer R, Kiehn T, Phelan D, Halpern AC. Cutaneous side-effects in cancer patients treated with the antiepidermal growth factor receptor antibody C225. *Br J Dermatol* 2001; 144: 1169-1176

Butz M. Dokumentation des Berufskrankheiten-Geschehens in Deutschland - Beruflich verursachte Krebserkrankungen: eine Darstellung der im Zeitraum 1978 bis 2003 anerkannten Berufskrankheiten. Sankt Augustin: Hauptverband der Gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG), 8., überarb und erg. Aufl., 2005

Casanova JE. Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* 2007; 8: 1476-1485

Castagnino P, Biesova Z, Wong WT, Fazioli F, Gill GN, Di Fiore PP. Direct binding of eps8 to the juxtamembrane domain of EGFR is phosphotyrosine- and SH2-independent. *Oncogene* 1995; 10: 723-729

Cerny T, Blair V, Anderson H, Bramwell V, Thatcher N. Pretreatment prognostic factors and scoring system in 407 small-cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 1987; 39: 146-149

Chattopadhyay A, Vecchi M, Ji Q, Mernaugh R, Carpenter G. The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 26091-26097

Chen YC, Chen JH, Richard K, Chen PY, Christiani DC. Lung adenocarcinoma and human papillomavirus infection. *Cancer* 2004; 101: 1428-1436

Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 3636-3641

Chung I, Akita R, Vandlen R, Toomre D, Schlessinger J, Mellman I. Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature* 2010; 464: 783-787

Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970

Cidlowski JA, King KL, Evans-Storms RB, Montague JW, Bortner CD, Hughes FM Jr. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51: 457-490; discussion 490-451

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345

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, 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

Krebs in Deutschland 2007/2008. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2012

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, 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, Janne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316: 1039-1043

Ferguson KM. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 2008; 37: 353-373

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, 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). *J Clin Oncol* 2003; 21: 2237-2246

Gadella TW, Jr., Jovin TM. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol* 1995; 129: 1543-1558

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, 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, Ward CW. Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature* 1998; 394: 395-399

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501

Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009; 28 Suppl 1: S24-S31

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20

Giuliani L, Favalli C, Syrjanen K, Ciotti M. Human papillomavirus infections in lung cancer. Detection of E6 and E7 transcripts and review of the literature. *Anticancer Res* 2007; 27: 2697-2704

Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lubbe AS, Reinhold T, Spath-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeboller H, Bocking A, Bohle RM, Bruske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gutz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heussel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hubner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Muller KM, Muller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rube C, Schmittel A, Schonfeld N, Schutte W, Serke M, Stamatidis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. *Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin. Pneumologie* 2010; 64 Suppl 2: S23-S155

Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L. International Association for the Study of Lung Cancer International Staging C, Participating I. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 706-714

Greiner RH, Gruber G. Percutaneous radiotherapy--indications for and differentiation from surgical treatment of metastases. *Ther Umsch* 2001; 58: 746-750



Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, Goldstraw P. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 694-705

Hafner M, Schmitz A, Grune I, Srivatsan SG, Paul B, Kolanus W, Quast T, Kremmer E, Bauer I, Famulok M. Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature* 2006; 444: 941-944

Hallberg B, Rayter SI, Downward J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem* 1994; 269: 3913-3916

Hamacher K, Coenen HH, Stocklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med* 1986; 27: 235-238

Han SW, Kim TY, Jeon YK, Hwang PG, Im SA, Lee KH, Kim JH, Kim DW, Heo DS, Kim NK, Chung DH, 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, 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

Heukamp LC, Büttner R. Molekulardiagnostik des Lungenkarzinoms zur Therapiestratifizierung. *Onkopipeline* 2010; 3: 87-93

Heukamp LC, Zimmer S, Kahl P, Merkelbach-Bruse S, Buettner R. Molekulardiagnostik von Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors und Aktivierung nachgeschalteter Signalwege in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen. *Onkopipeline* 2008; 1: 101-108

Ho JC, Wong MP, Lam WK. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Respirology* 2006; 11: 539-545

Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4232-4235

Huber R. Tumoren der Lunge und des Mediastinums: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. München: Zuckschwerdt, 7., überarb. Aufl., 2006

Inoue A, Setoguchi K, Matsubara Y, Okada K, Sato N, Iwakura Y, Higuchi O, Yamanashi Y. Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Sci Signal* 2009; 2: ra7

Johnson GL, Vaillancourt RR. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 230-238

Johnson PW, Joel SP, Love S, Butcher M, Pandian MR, Squires L, Wrigley PF, Slevin ML. Tumour markers for prediction of survival and monitoring of remission in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1993; 67: 760-766

Jorissen R. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research* 2003; 284: 31-53

Jura N, Endres NF, Engel K, Deindl S, Das R, Lamers MH, Wemmer DE, Zhang X, Kuriyan J. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* 2009; 137: 1293-1307

Kerr JFR WA, Currie AR, Bishop CF. Apoptosis, Perspectives on Mammalian Cell Death. Oxford University Press, Oxford, 1987

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, 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, Carlin C. EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments. *J Cell Physiol* 2000; 185: 47-60

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

Kolanus W. Guanine nucleotide exchange factors of the cytohesin family and their roles in signal transduction. *Immunol Rev* 2007; 218: 102-113

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 2004; 64: 8919-8923

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, Tada H, Kuwano H, 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

Kreuter M, Herth FJF, Eberhardt R. Diagnostik des Bronchialkarzinoms. *Der Pneumologe* 2008; 5: 187-198

Kreuzer M, Kreienbrock L, Gerken M, Heinrich J, Bruske-Hohlfeld I, Muller KM, Wichmann HE. Risk factors for lung cancer in young adults. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 1028-1037

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, 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

Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693-1703

Kwak EL, Sordella R, Bell DW, Godin-Heymann N, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Driscoll DR, Fidias P, Lynch TJ, Rabindran SK, McGinnis JP, Wissner A, Sharma SV, Isselbacher KJ, Settleman J, Haber DA. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 7665-7670

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 327-334

Lacouture ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 803-812

Lacouture ME, Lai SE. The PRIDE (Papulopustules and/or paronychia, Regulatory abnormalities of hair growth, Itching, and Dryness due to Epidermal growth factor receptor inhibitors) syndrome. *Br J Dermatol* 2006; 155: 852-854

Langlois WJ, Sasaoka T, Saltiel AR, Olefsky JM. Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *J Biol Chem* 1995; 270: 25320-25323

Lee SM, Khan I, Upadhyay S, Lewanski C, Falk S, Skales G, Marshall E, Woll PJ, Hatton M, Lal R, Jones R, Toy E, Chao D, Middleton G, Bulley S, Ngai Y, Rudd R, Hackshaw A, Boshoff C. First-line erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer unsuitable for chemotherapy (TOPICAL): a double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 1161-1170

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, 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

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

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, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer *Cancer Res.* 2006; 66: 3992-3995

Lin E, Li L, Guan Y, Soriano R, Rivers CS, Mohan S, Pandita A, Tang J, Modrusan Z. Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1466-1476

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139

Maassen W, Greschuchna D, Martinez I. The role of surgery in the treatment of small cell carcinoma of the lung. *Recent Results Cancer Res* 1985; 97: 107-115

Machulla H, Blocher A, Kuntzsch M, Piert M, Wei R, Grierson J. Simplified labeling approach for synthesizing 3-deoxy-3-[F-18]fluorothymidine ([F-18]FLT). *J Radiochem Nucl Chem* 2000; 243: 843– 846

Mao Y, Pan S, Wen SW, Johnson KC. Canadian Cancer Registries Epidemiology Research G. Physical activity and the risk of lung cancer in Canada. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 564-575

Marchetti A, Milella M, Felicioni L, Cappuzzo F, Irtelli L, Del Grammastro M, Sciarrotta M, Malatesta S, Nuzzo C, Finocchiaro G, Perrucci B, Carlone D, Gelibter AJ, Ceribelli A, Mezzetti A, Iacobelli S, Cognetti F, Buttitta F. Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones. *Neoplasia* 2009; 11: 1084-1092

Martin-Nieto J, Villalobo A. The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry* 1998; 37: 227-236

Mascaux C, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lafitte JJ, Lemaitre F, Meert AP, Vermylen P, Sculier JP, European Lung Cancer Working P. A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis. *Lung Cancer* 2000; 30: 23-36

Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, Bekele BN, Herbst RS, 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

Mast G, Zimmermann F. *Kopf-Hals-Malignome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. München: Zuckschwerdt, 4. Aufl.: 2009

Masui H, Kawamoto T, Sato JD, Wolf B, Sato G, 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

McNeill A. Tobacco use and effects on health. Tobacco or health in the European Union – past, present und future. Prepared by the Aspect Consortium, European Commission. Luxemburg: Office für Official Publication of the European Communities, 2004: 25-68

Meert AP, Paesmans M, Berghmans T, Martin B, Mascaux C, Vallot F, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP. Prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *BMC Cancer* 2001; 1: 5

Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Shirakusa T, Tsuchiya E, Ishikawa Y. Early-stage lung adenocarcinomas with a micropapillary pattern, a distinct pathologic marker for a significantly poor prognosis. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 101-109

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947-957

Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* 2001; 311: 1011-1026

Müller KM, Wiethage T. Pathology, classification, and staging of malignant lung tumors. *Radiologe* 2004; 44: 415-426

Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 959-968

O'Brien ME, Ciuleanu TE, Tsekov H, Shparyk Y, Cucevia B, Juhasz G, Thatcher N, Ross GA, Dane GC, Crofts T. Phase III trial comparing supportive care alone with supportive care with oral topotecan in patients with relapsed small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5441-5447

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, 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,

Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13306-13311

Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005a; 2: 57-61

Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005b; 2: 225-235

Perez-Soler R, Delord JP, Halpern A, Kelly K, Krueger J, Sureda BM, von Pawel J, Temel J, Siena S, Soulieres D, Saltz L, Leyden J. HER1/EGFR inhibitor-associated rash: future directions for management and investigation outcomes from the HER1/EGFR inhibitor rash management forum. *Oncologist* 2005; 10: 345-356

Petersen I. The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108: 525-531

Postmus PE, Brambilla E, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Patz EF, Jr., Yokomise H, International Association for the Study of Lung Cancer International Staging C, Cancer R, Biostatistics, Observers to the C, Participating I. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the M descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 686-693

Postmus PE, Haaxma-Reiche H, Smit EF, Groen HJ, Karnicka H, Lewinski T, van Meerbeeck J, Clerico M, Gregor A, Curran D, Sahmoud T, Kirkpatrick A, Giaccone G. Treatment of brain metastases of small-cell lung cancer: comparing teniposide and teniposide with whole-brain radiotherapy--a phase III study of the European Organization for the Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3400-3408

Pujol JL, Carestia L, Daures JP. Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent. *Br J Cancer* 2000; 83: 8-15

Qiu C, Tarrant MK, Choi SH, Sathyamurthy A, Bose R, Banjade S, Pal A, Bornmann WG, Lemmon MA, Cole PA, Leahy DJ. Mechanism of activation and inhibition of the HER4/ErbB4 kinase Structure. 2008; 16: 460-467

Rawson NS, Peto J. An overview of prognostic factors in small cell lung cancer. A report from the Subcommittee for the Management of Lung Cancer of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research. *Br J Cancer* 1990; 61: 597-604

Red Brewer M, Choi SH, Alvarado D, Moravcevic K, Pozzi A, Lemmon MA, Carpenter G. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell* 2009; 34: 641-651

Rhee J, Oishi K, Garey J, Kim E. Management of rash and other toxicities in patients treated with epidermal growth factor receptor-targeted agents. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5 Suppl 2: S101-S106

Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 839-844

Ries L, Elsner M, Kosary C. Cancer statistics review 1975–2002. Bethesda: MD National Cancer Institute, 2005

Rigby AC, Grant CW, Shaw GS. Solution and solid state conformation of the human EGF receptor transmembrane region. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1371: 241-253

Robinson LA, Wagner H, Jr., Ruckdeschel JC, American College of Chest P. Treatment of stage IIIA non-small cell lung cancer. *Chest* 2003; 123: S202-S220

Robinson LA, Ruckdeschel JC, Wagner H, Jr., Stevens CW, American College of Chest P. Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132: S243-S265

Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC, 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, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, Longo F, Moran T, Insa A, De Marinis F, Corre R, Bover I, Illiano A, Dansin E, de Castro J, Milella M, Reguart N, Altavilla G, Jimenez U, Provencio M, Moreno MA, Terrasa J, Munoz-Langa J, Valdivia J, Isla D, Domine M, Molinier O, Mazieres J, Baize N, Garcia-Campelo R, Robinet G, Rodriguez-Abreu D, Lopez-Vivanco G, Gebbia V, Ferrera-Delgado L, Bombaron P, Bernabe R, Bearz A, Artal A, Cortesi E, Rolfo C, Sanchez-Ronco M, Drozdowskyj A, Queralt C, de Aguirre I, Ramirez JL, Sanchez JJ, Molina MA, Taron M, Paz-Ares L, Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Francais de P-C, Associazione Italiana Oncologia T. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 239-246

Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyan S, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, Pawlicki M, de Souza P, Zheng M, Urbanowitz G, Reitsma D, Seaman JJ. Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastases in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial--the Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3150-3157

Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B. *Encyclopedia of human nutrition*. San Diego - London: Academic, 1999

Sagman U, Maki E, Evans WK, Warr D, Shepherd FA, Sculier JP, Haddad R, Payne D, Pringle JF, Yeoh JL, Ciampi A, DeBoer G, McKinney S, Ginsberg R, Feld R. Small-cell carcinoma of the lung: derivation of a prognostic staging system. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1639-1649

Sakaguchi K, Okabayashi Y, Kido Y, Kimura S, Matsumura Y, Inushima K, Kasuga M. Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 536-543

Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; 110: 669-672

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322

Schwartz AG, Yang P, Swanson GM. Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 554-562

Seeber S. *Therapiekonzepte Onkologie*. Berlin: Springer, 2., vollst. überarb. und erw. Aufl., 1995

Seidel D, Zander T, Heukamp LC, Peifer M, Bos M, Fernández-Cuesta L, Leenders F, Lu X, Ansén S, Gardizi M, Nguyen C, Berg J, Russell P, Wainer Z, Schildhaus HU, Rogers TM, Solomon B, Pao W, Carter SL, Getz G, Hayes D, Wilkerson MD, Thunnissen E, Travis WD, Perner S, Wright G, Brambilla E, Büttner R, Wolf J, Thomas RK, Gabler F, Wilkening I, Müller C, Dahmen I, Menon R, König K, Albus K, Merkelbach-Bruse S, Fassunke J, Schmitz K, Kuenstlinger H, Kleine MA, Binot E, Querings S, Altmüller J, Bäßmann I, Nürnberg P, Schneider PM, Bogus M, Büttner R, Perner S, Russell P, Thunnissen E, Travis WD, Brambilla E, Soltermann A, Moch H, Brustugun OT, Solberg S, Lund-Iversen M, Helland Å, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Chen Y, Groen H, Timens W, Sietsma H, Clement JH, Weder W, Sängler J, Stoelben E, Ludwig C, Engel-Riedel W, Smit E, Heideman DA, Snijders PJ, Nogova L, Sos ML, Mattonet C, Töpelt K, Scheffler M, Goekkurt E, Kappes R, Krüger S, Kambartel K, Behringer D, Schulte W, Galetke W, Randerath W, Heldwein M, Schlesinger A, Serke M, Hekmat K, Frank KF, Schnell R, Reiser M, Hünerlitürkoglu AN, Schmitz S, Meffert L, Ko YD, Litt-Lampe M, Gerigk U, Fricke R, Besse B, Brambilla C, Lantuejoul S, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Cappuzzo F, Ligorio C, Damiani S, Field JK, Hyde R, Validire P, Girard P, Muscarella LA, Fazio VM, Hallek M, Soria JC, Carter SL, Getz G, Hayes D, Wilkerson MD, Achter V, Lang U, Seidel D, Zander T, Heukamp LC, Peifer M, Bos M, Pao W,



Travis WD, Brambilla E, Büttner R, Wolf J, Thomas RK, Büttner R, Wolf J, Thomas RK. Clinical Lung Cancer Genome P, Network Genomic M. A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci Transl Med* 2013; 5: 1-13

Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giuli P, Borasio P, Mossetti C, Ardisson F, Lausi P, Scagliotti GV. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 28-32

Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, Lennes IT, Digumarthy S, Waltman BA, Bast E, Tammireddy S, Morrissey L, Muzikansky A, Goldberg SB, Gainor J, Channick CL, Wain JC, Gaissert H, Donahue DM, Muniappan A, Wright C, Willers H, Mathisen DJ, Choi NC, Baselga J, Lynch TJ, Ellisen LW, Mino-Kenudson M, Lanuti M, Borger DR, Iafrate AJ, Engelman JA, Dias-Santagata D. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol* 2011; 22: 2616-2624

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 169-181

Sharma SV, Settleman J. ErbBs in lung cancer. *Exp Cell Res*. 2009; 315: 557-571

Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, Solomon B, Stubbs H, Admane S, McDermott U, Settleman J, Kobayashi S, Mark EJ, Rodig SJ, Chirieac LR, Kwak EL, Lynch TJ, Iafrate AJ. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4247-4253

Shepherd FA, Ginsberg RJ, Feld R, Evans WK, Johansen E. Surgical treatment for limited small-cell lung cancer. The University of Toronto Lung Oncology Group experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101: 385-393

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, Seymour L, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 123-132

Shilo BZ. Insider influence on ErbB activity. *Cell* 2010; 143: 181-182

Simonato L, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta P, Brennan P, Darby SC, Forastiere F, Fortes C, Gaborieau V, Gerken M, Gonzales CA, Jockel KH, Kreuzer M, Merletti F, Nyberg F, Pershagen G, Pohlmann H, Rosch F, Whitley E, Wichmann HE, Zambon P. Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int J Cancer* 2001; 91: 876-887

Singh S, Parulekar W, Murray N, Feld R, Evans WK, Tu D, Shepherd FA. Influence of sex on toxicity and treatment outcome in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 850-856

Slieker LJ, Martensen TM, 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

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010

Sobol RE, Astarita RW, Hofeditz C, Masui H, Fairshter R, Royston I, Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor expression in human lung carcinomas defined by a monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 403-407

Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004; 305: 1163-1167

Sorensen S, Helweg-Larsen S, Mouridsen H, Hansen HH. Effect of high-dose dexamethasone in carcinomatous metastatic spinal cord compression treated with radiotherapy: a randomised trial. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 22-27

Spiegelman D, Maurer LH, Ware JH, Perry MC, Chahinian AP, Comis R, Eaton W, Zimmer B, Green M. Prognostic factors in small-cell carcinoma of the lung: an analysis of 1,521 patients. *J Clin Oncol* 1989; 7: 344-354

Stamos J, Sliwkowski MX, 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

Stayner L, Bena J, Sasco AJ, Smith R, Steenland K, Kreuzer M, Straif K. Lung cancer risk and workplace exposure to environmental tobacco smoke. *Am J Public Health* 2007; 97: 545-551

Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007; 25: 561-570

Takada M, Fukuoka M, Kawahara M, Sugiura T, Yokoyama A, Yokota S, Nishiwaki Y, Watanabe K, Noda K, Tamura T, Fukuda H, Saijo N. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with cisplatin and etoposide for limited-stage small-cell lung cancer: results of the Japan Clinical Oncology Group Study 9104. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3054-3060

Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, Thongprasert S, Tan EH, Pemberton K, Archer V, 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

Travis WD. Pathology of lung cancer. Clin Chest Med 2011; 32: 669-692

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 2011; 6: 244-285

Travis WD, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer., International Association for the Study of Lung Cancer., International Academy of Pathology. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon; Oxford: IARC Press, Oxford University Press, 2004

Tsuchiya R, Suzuki K, Ichinose Y, Watanabe Y, Yasumitsu T, Ishizuka N, Kato H. Phase II trial of postoperative adjuvant cisplatin and etoposide in patients with completely resected stage I-IIIa small cell lung cancer: the Japan Clinical Oncology Lung Cancer Study Group Trial (JCOG9101). J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 129: 977-983

Tsutsumida H, Nomoto M, Goto M, Kitajima S, Kubota I, Hirotsu Y, Wakimoto J, Hollingsworth MA, Yonezawa S. A micropapillary pattern is predictive of a poor prognosis in lung adenocarcinoma, and reduced surfactant apoprotein A expression in the micropapillary pattern is an excellent indicator of a poor prognosis. Mod Pathol 2007; 20: 638-647

Ullrich RT, Zander T, Neumaier B, Koker M, Shimamura T, Waerzeggers Y, Borgman CL, Tawadros S, Li H, Sos ML, Backes H, Shapiro GI, Wolf J, Jacobs AH, Thomas RK, Winkler A. Early detection of erlotinib treatment response in NSCLC by 3'-deoxy-3'-[F]-fluoro-L-thymidine ([F]FLT) positron emission tomography (PET). PLoS One 2008; 3: 1-6

Ulsperger E, Karrer K, Denck H. Multimodality treatment for small cell bronchial carcinoma. Preliminary results of a prospective, multicenter trial. The ISC-Lung Cancer Study Group. Eur J Cardiothorac Surg 1991; 5: 306-310

Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, Miyakawa M, Isozaki O, Murakami H, Tsushima T, Burman KD, De Micco C, Ringel MD. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. J Med Genet 2004; 41: 161-170

Videtic GM, Stitt LW, Dar AR, Kocha WI, Tomiak AT, Truong PT, Vincent MD, Yu EW. Continued cigarette smoking by patients receiving concurrent chemoradiotherapy for limited-stage small-cell lung cancer is associated with decreased survival. J Clin Oncol 2003; 21: 1544-1549

Wacker B, Nagrani T, Weinberg J, Witt K, Clark G, 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

Waddell TK, Shepherd FA. Should aggressive surgery ever be part of the management of small cell lung cancer? *Thorac Surg Clin* 2004; 14: 271-281

Wagner LI, Lacouture ME. Dermatologic toxicities associated with EGFR inhibitors: the clinical psychologist's perspective. Impact on health-related quality of life and implications for clinical management of psychological sequelae. *Oncology (Williston Park)* 2007; 21: 34-36

Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ, Gibson KH. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002; 62: 5749-5754

Wichmann HE, Molik B, Pott F, Jöckel KH. Luftverunreinigungen und Lungenkrebs – Ergebnisse einer Pilotstudie. Umweltbundesamt Berlin: Erich Schmidt, 1991

Will C, Schewe C, Petersen I. Incidence of HPV in primary and metastatic squamous cell carcinomas of the aerodigestive tract: implications for the establishment of clonal relationships. *Histopathology* 2006a; 48: 605-607

Will C, Schewe C, Schluns K, Petersen I. HPV typing and CGH analysis for the differentiation of primary and metastatic squamous cell carcinomas of the aerodigestive tract. *Cell Oncol* 2006b; 28: 97-105

Wolf M, Holle R, Hans K, Drings P, Havemann K. Analysis of prognostic factors in 766 patients with small cell lung cancer (SCLC): the role of sex as a predictor for survival. *Br J Cancer* 1991a; 63: 986-992

Wolf M, Pritsch M, Drings P, Hans K, Schroeder M, Flechtner H, Heim M, Hruska D, Mende S, Becker H, Dannhauser J, Lohmoller R, Gropp C, Gassel WD, Holle R, Havemann K. Cyclic-alternating versus response-oriented chemotherapy in small-cell lung cancer: a German multicenter randomized trial of 321 patients. *J Clin Oncol* 1991b; 9: 614-624

Wong R, Wiffen PJ. Bisphosphonates for the relief of pain secondary to bone metastases. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 2

Yarden Y, Schlessinger J. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* 1987; 26: 1434-1442

Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, Park BJ, Rusch VW, Travis WD. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma:

prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol* 2011; 24: 653-664

Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, Wang G, Ma X, Jiang C, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ. Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 2000; 19: 2324-2330

Yun CH, Boggon TJ, Li Y, Woo MS, Greulich H, Meyerson M, 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

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006; 125: 1137-1149

Zhou W, Heist RS, Liu G, Park S, Neuberger DS, Asomaning K, Wain JC, Lynch TJ, Christiani DC. Smoking cessation before diagnosis and survival in early stage non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2006; 53: 375-380

Zhu HJ, Iaria J, Orchard S, Walker F, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: association of extracellular domain negatively regulates intracellular kinase activation in the absence of ligand. *Growth Factors* 2003; 21: 15-30

Zimmer S, Kahl P, Buhl TM, Steiner S, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Buettner R, Heukamp LC. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer influence downstream Akt, MAPK and Stat3 signaling. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 723-730

## **9. Danksagung**

Zuallererst schulde ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Lukas Carl Heukamp, der mich während der gesamten Promotionszeit begleitet hat und mir bei Fragen stets zur Seite stand, großen Dank. Besonders bedanken möchte ich mich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine konstruktiven Anregungen, die mir letztendlich die Fertigstellung der Arbeit in dieser Form ermöglichten. Daneben möchte ich Herrn Prof. Dr. Büttner, Direktor des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Köln, für die Bereitstellung des sehr interessanten Promotionsthemas danken.

Herrn Prof. Dr. Glen Kristiansen, Direktor des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Bonn, bin ich für die unkomplizierte Übernahme meiner Doktorarbeit dankbar.

Zudem danke ich dem Zweitgutachter, Herrn Prof. Dr. Nicolas Wernert, für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Bonn bzw. Köln, insbesondere denen der Arbeitsgruppe von PD Dr. Lukas Carl Heukamp, Frau Dr. Katharina König, Frau Ursula Rommerscheidt-Fuss und Frau Alexandra Florin, bin ich für die sehr freundliche und angenehme Zusammenarbeit dankbar.

Besonders möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich während der Promotionszeit stets unterstützt und mich bei Zweifeln immer wieder bestärkt haben. Hier sind insbesondere Frau Sabine Hageböck, Frau Claudia Graf-Meffert, Frau Esther Sieberz und Herr Florian Kessler zu erwähnen, die meine Dissertation Korrektur gelesen und mir vor allem in der letzten Phase der Arbeit sehr geholfen haben.

Meinem Ehemann Tobias danke ich unendlich für seine immer liebevolle und motivierende Unterstützung während der gesamten Entstehung dieser Arbeit.

Schließlich bin ich meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben, mich in jeder Lebensphase bedingungslos unterstützen und fördern, mir immer wieder Mut machen, mich motivieren und in mich vertrauen, zutiefst dankbar.

## 10. Lebenslauf

## Publikationen

Bill A, Schmitz A, Albertoni B, Song JN, Heukamp LC, Walrafen D, Thorwirth F, Verveer PJ, Zimmer S, **Meffert L**, Schreiber A, Chatterjee S, Thomas RK, Ullrich RT, Lang T, Famulok M. Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell* 2010; 143: 201-211

Seidel D, Zander T, Heukamp LC, Peifer M, Bos M, Fernández-Cuesta L, Leenders F, Lu X, Ansén S, Gardizi M, Nguyen C, Berg J, Russell P, Wainer Z, Schildhaus HU, Rogers TM, Solomon B, Pao W, Carter SL, Getz G, Hayes D, Wilkerson MD, Thunnissen E, Travis WD, Perner S, Wright G, Brambilla E, Büttner R, Wolf J, Thomas RK, Gabler F, Wilkening I, Müller C, Dahmen I, Menon R, König K, Albus K, Merkelbach-Bruse S, Fassunke J, Schmitz K, Kuenstlinger H, Kleine MA, Binot E, Querings S, Altmüller J, Bäßmann I, Nürnberg P, Schneider PM, Bogus M, Büttner R, Perner S, Russell P, Thunnissen E, Travis WD, Brambilla E, Soltermann A, Moch H, Brustugun OT, Solberg S, Lund-Iversen M, Helland Å, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Chen Y, Groen H, Timens W, Sietsma H, Clement JH, Weder W, Sängler J, Stoelben E, Ludwig C, Engel-Riedel W, Smit E, Heideman DA, Snijders PJ, Nogova L, Sos ML, Mattonet C, Töpelt K, Scheffler M, Goekkurt E, Kappes R, Krüger S, Kambartel K, Behringer D, Schulte W, Galetke W, Randerath W, Heldwein M, Schlesinger A, Serke M, Hekmat K, Frank KF, Schnell R, Reiser M, Hünerlitürkoglu AN, Schmitz S, **Meffert L**, Ko YD, Litt-Lampe M, Gerigk U, Fricke R, Besse B, Brambilla C, Lantuejoul S, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Cappuzzo F, Ligorio C, Damiani S, Field JK, Hyde R, Validire P, Girard P, Muscarella LA, Fazio VM, Hallek M, Soria JC, Carter SL, Getz G, Hayes D, Wilkerson MD, Achter V, Lang U, Seidel D, Zander T, Heukamp LC, Peifer M, Bos M, Pao W, Travis WD, Brambilla E, Büttner R, Wolf J, Thomas RK, Büttner R, Wolf J, Thomas RK. Clinical Lung Cancer Genome P, Network Genomic M. A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci Transl Med* 2013; 5: 1-13