Aus der Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Homey

Molekulare und zelluläre Mechanismen kutaner Infektionen mit *S. aureus* unter Therapie mit EGFR-Inhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Parinaz Ansari Pirsarai
2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf (Dekan)

Referent: Univ.-Prof. Dr. Homey
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Scheu

In Liebe und Dankbarkeit
meiner Familie gewidmet

„Es lebe, wer sich tapfer hält!“
Faust I, Vers 3370 / Mephistopheles
Johann Wolfgang von Goethe

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden EGFR-Inhibitoren (EGFR-I) wie Erlotinib (Tarceva®) und Gefitinib (Iressa®) oder Cetuximab (Erbitux®) und Panitumumab (Vectibix®) als innovative, molekular zielgerichtete Tumortherapeutika („*targeted-cancer drugs*“ oder „*Biologicals*“) in der Klinik fest etabliert. Ihr Einsatz ist aber in über 90 Prozent der Fälle mit dem Auftreten spezifischer kutaner Toxizitäten assoziiert. Diese manifestieren sich unter anderem als rosazeaforme, papulo-pustulöse Exantheme im Bereich der seborrhoischen Hautareale, vor allem im Gesicht und am Oberkörper. Kürzlich wurde erstmals eine erhöhte Frequenz von Superinfektionen dieser Hautveränderungen im Verlauf der Therapie beschrieben. Vorwiegend lässt sich hier *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) als Keim nachweisen.

Bislang sind die molekularen und zellulären Mechanismen, welche die EGFR-I assoziierten kutanen Nebenwirkungen verursachen, nicht näher erforscht. Insbesondere die Untersuchung der Genese bakterieller Superinfektion ist hierbei von Interesse für das Verständnis der Regulation antimikrobieller Abwehr an Grenzorganen, wie auch für das Management der Nebenwirkungen. So werden zwar symptombezogene, reaktive Strategien zur Behandlung der Hautveränderungen propagiert, mechanistische, pathogenese-orientierte Behandlungsansätze finden sich jedoch bis heute nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre humane Keratinozyten *in vitro* mit verschiedenen EGFR-I inkubiert. Anschließend wurden diese mit *S. aureus* infiziert und mittels quantitativer Real-Time PCR auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden (AMP) untersucht sowie Zellkulturüberstände mittels Photometrie und Auszählung Koloniebildender Einheiten (KBE) bezüglich des Bakterienwachstums analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass EGFR-I eine signifikante Suppression der Produktion kutaner antimikrobieller Peptide, vor allem von hBD-2, hBD-3 und LL-37, induzieren. Da sich das Wirkungsspektrum dieser AMP insbesondere auf den grampositiven Bereich erstreckt, bietet sich somit eine kausale Erklärung für eine erhöhte Inzidenz kutaner Infektionen mit *S. aureus* bei Patienten unter Therapie mit EGFR-I.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EGFR-I eine signifikante Dysregulation von AMP in humanen Keratinozyten induzieren. Diese Ergebnisse bieten nicht nur Ansätze für die Entwicklung pathogenese-orientierter Therapiestrategien zum Nebenwirkungsmanagement sondern unterstreichen auch die zentrale Rolle des EGFR für die Kontrolle der mikrobiellen Abwehr an Grenzorganen wie der Haut.

Abkürzungsverzeichnis

ALP	Antileukoprotease
AMP	Antimikrobielle Peptide
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches AMP
cDNA	komplementäre DNA
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
DAG	Diacylglycerol
DF	Demodex folliculorum
DNA	Desoxy-Ribunucleic-Acid (s. DNS)
DNS	Desoxy-Ribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGFR-AK	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor - Antikörper
EGFR-TK	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor - Tyrosinkinase
EGFR-I	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor - Inhibitor
EHEC	Entero-hämorrhagische E. coli
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU	Europäische Union
FBS	Fetal bovine serum / fötales Rinderserum
FDA	Food and Drug Administration / Arzneimittelzulassungsbehörde der USA)
Grb	Growth-Factor-Receptor binding Protein
hBD	Humanes ß-Defensin
HB-EGF	Heparin-binding EGF
hCAP-18	Humanes kationisches antimikrobielles Peptid 18
HNP	Humanes neutrophiles Peptid
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kDA	Kilodalton
KOF	Körperoberfläche
LPS	Lipopolysaccharid
MEK	MAP/ERK-Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute

ml	Milliliter
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
NCI	National Cancer Institute
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer / Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
OD	Optische Dichte
p	Probability
PBS	Phosphate buffered saline / Salzlösung, phosphatgepuffert
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
PGN	Peptidoglycan
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP	Phosphatidylinositol 3,4,5-Phosphat
PLC	Phospholipase C
Ps.	Pseudomonas
Raf	Rat fibrosarcoma / Proteinkinase
Ras	Rat sarcoma / monomeres G-Protein
RNA	Ribonucleic-Acid (s. RNS)
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	Rotations per minute / Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
SD	Standard deviation / Standardabweichung
SFM	Serumfreies Medium
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Std.	Stunde
S. aureus	Staphylococcus aureus
SCCHN	Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck
TCR	T-Zell-Rezeptoren
TGF	Transforming Growth Factor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TK	Tyrosinkinase
TK-I	Tyrosinkinase-Inhibitor
u.a.	unter anderem
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel

INHALT

Zusammenfassung…….. I

Abkürzungsverzeichnis……...II-III

1 Einleitung 1

1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut 1
1.1.1 Epidermis (Oberhaut) 2
1.1.2 Dermis (Corium, Lederhaut) 3
1.1.3 Subkutis (Unterhaut) 4

1.2 Die menschliche Haut als Abwehrorgan 4
1.2.1 Physikalische und immunologische Barriere 4
1.2.2 Chemische Barriere 5

1.3 Antimikrobielle Peptide und Proteine des Menschen (AMP) 6
1.3.1 Humane ß-Defensine 7
1.3.1.1 Humanes ß-Defensin-1 (hBD-1) 8
1.3.1.2 Humanes ß-Defensin-2 (hBD-2) 8
1.3.1.3 Humanes ß-Defensin-3 (hBD-3) 9
1.3.2 Cathelizidin LL-37 9
1.3.3 RNAse 7 10
1.3.4 Psoriasin (S100A7) 10

1.4 Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide 11

1.5 Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) 13
1.5.1 Charakteristika des EGFR 13

1.6 EGFR-induzierte Signaltransduktion 14
1.6.1 MAPK-Signaltransduktion 15
1.6.2 STAT-Signaltransduktion 15
1.6.3 PLC-Singnaltransduktion 16
1.6.4 PI3K-Akt-Signaltransduktion 16

1.7 Bedeutung des EGFR bei Tumorgenese und –progression 17

1.8 Therapeutische Beeinflussung des EGFR: „*Targeted-cancer-therapy*“ ... 19
1.8.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren 20
1.8.2 Monoklonale Antikörper 21

1.9 Kutane Nebenwirkungen unter Therapie mit EGFR-Inhibitoren 23

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit 28

3 Material und Methoden 30

3.1 Material 30
3.1.1 Zelllinien/ Bakterien 30
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial 30
3.1.3 Reagenzien, Chemikalien, Puffer 31
3.1.4 Zellkulturmedien 32

3.1.5 Inhibitoren ... 33
3.2 Methoden ... 33
3.2.1 Zellkultur: Anzucht von Keratinozyten aus Biopsaten ... 33
3.2.2 Passagierung der Zelllinien ... 33
3.2.3 Stimulierung der Zelllinien ... 34
3.2.4 Optische Dichte Messung (OD) ... 34
3.2.5 Bestimmung der Anzahl Koloniebildender Einheiten (KBE) ... 35
3.2.6 Berechnung der zytotoxischen Aktivität ... 35
3.2.7 RNA-Extraktion aus Keratinozyten ... 35
3.2.8 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung und Qualitäts-Kontrolle ... 36
3.2.9 Reverse Transkription ... 36
3.2.10 Quantitative Realtime-PCR ... 37

4 Ergebnisse ... 38

4.1 Untersuchungen zur Wirkung von EGFR-Inhibitoren auf das Wachstum von *S. aureus* in Zellkulturüberständen ... 38
4.1.1 Darstellung Koloniebildender Einheiten (KBE) über Photometrie ... 38
4.1.1.1 Effekt von Tyrphostin AG1478 auf das Wachstum von *S. aureus* 38
4.1.1.2 Effekt von Erlotinib auf das Wachstum von *S. aureus* ... 39
4.1.1.3 Effekt von Cetuximab auf das Wachstum von *S. aureus* ... 40
4.1.1.4 Vergleich der zytotoxischen Wirkung der EGFR-Inhibitoren ... 42
4.1.2 Darstellung Koloniebildender Einheiten (KBE) über Verdünnungsreihen ... 43
4.1.2.1 KBE Medium und Tyrphostin AG 1478 (1000 nM) ... 43
4.1.2.2 KBE Medium und Erlotinib (1000 nM) ... 44
4.1.2.3 KBE Medium und Cetuximab (60 µg/ml) ... 45
4.1.3 Zusammenfassung der Wirkung von EGFR-Inhibitoren auf das Wachstum von *S. aureus* in den Überständen ... 46

4.2 Untersuchungen zur Expression von AMP unter EGFR-Inhibition in primären humanen Keratinozyten ... 49

5 Diskussion ... 51

5.1 Einfluss von EGFR-Inhibitoren auf das Wachstum von *S. aureus* in *in vitro* Modellen primärer humaner Keratinozyten und die Bedeutung der veränderten AMP Expression ... 51
5.1.1 Vergleich der Wirkung der drei untersuchten EGFR-Inhibitoren ... 51
5.1.2 Einfluss der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β ... 51
5.1.3 Selektive Blockade bestimmter AMP durch EGFR-Inhibitoren ... 52

5.2 Entwicklung eines Modells zur Pathogenese bakterieller Infektionen im Rahmen einer EGFR-Inhibitortherapie ... 54
5.2.1 Verfrühte Apoptose und Unterbindung der Proliferation ... 54
5.2.2 Inflammatorisches Milieu ... 55
5.2.3 Prädisposition durch andere Vorerkrankungen ... 56
5.2.4 Begleitende Besiedlung durch Demodex follicullorum ... 56

5.3 Klinische Relevanz der durch EGFR-Inhibition verminderten Produktion antimikrobieller Peptide auf die lokale Immunabwehr der Haut ... 58

5.3.1 AMP in Psoriasis vulgaris und atopischem Ekzem 58
5.3.2 *S. aureus* Kolonisierung vor Therapie mit EGFR-I 58
5.3.3 EGFR-I induzierte Magen-Darm-Symptome 59
5.4 Pathogenese-orientierte Therapieansätze 61
5.4.1 Antibiotika 61
5.4.2 Begleitende Anwendung von Glukokortikosteroiden 62
5.4.3 Retinoide 63
5.4.4 Endogene Antibiotika 63
5.4.5 Liganden-unabhängige Aktivierung des EGFR durch Redox-Cycler 64

6 Literaturverzeichnis 66

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut stellt das größte Schutz-, Abwehr- und Sinnesorgan des Menschen dar[1]. Sie schirmt den Körper gegen die Umwelt ab und wirkt als schützende Barriere gegenüber Mikroorganismen sowie mechanischen, thermischen und chemisch-physikalischen Faktoren. Gleichzeitig dient sie der Aufnahme sensorischer Reize. Deshalb verfügt die Haut über komplexe neuronale Verschaltungen mit zahlreichen Rezeptoren zur Berührungs-, Druck-, Temperatur- und Schmerzempfindung[2]. Dadurch ist nicht nur die Wahrnehmung der Umwelt möglich, sondern auch die Registrierung eingetretener Hautschäden.

Die Haut spielt zudem eine zentrale Rolle für die innere Homöostase, indem sie als Reservoir für Flüssigkeiten, Elektrolyte und Lipide bzw. als Absonderungsorgan bei der thermoregulatorischen Transpiration dient. Lipideinlagerungen, insbesondere in der Subkutis, bewahren vor geringfügigen Traumata und dienen zugleich der Wärmeisolation[3].

Zum Schutz gegen Infektionen, z.B. durch Viren, Bakterien oder Pilzen, liegt der physiologische pH-Wert der Epidermis mit 4,2 - 6,5 im sauren Bereich. Dieser wird durch die Spaltung von Triglyceriden mittels bakterieller Enzyme generiert und schützt als saurer Hydro-Lipid-Film („Säureschutzmantel“) die Haut vor Austrocknung, bakterieller Infektion und anderen exogen schädigenden Einflüssen [1,2].

Makroanatomisch wird die Haut von apikal nach basal in drei Schichten unterteilt: Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut oder Corium), die zusammen die Kutis bilden und Subkutis (Unterhaut). Während die Kutis als direktes Grenzorgan zur Umwelt fungiert, dient die Subkutis als flexible Verschiebe- und Übergangsschicht zu den tiefer gelegenen Sehnen und Muskeln (s. Abb. 1)[4,5].

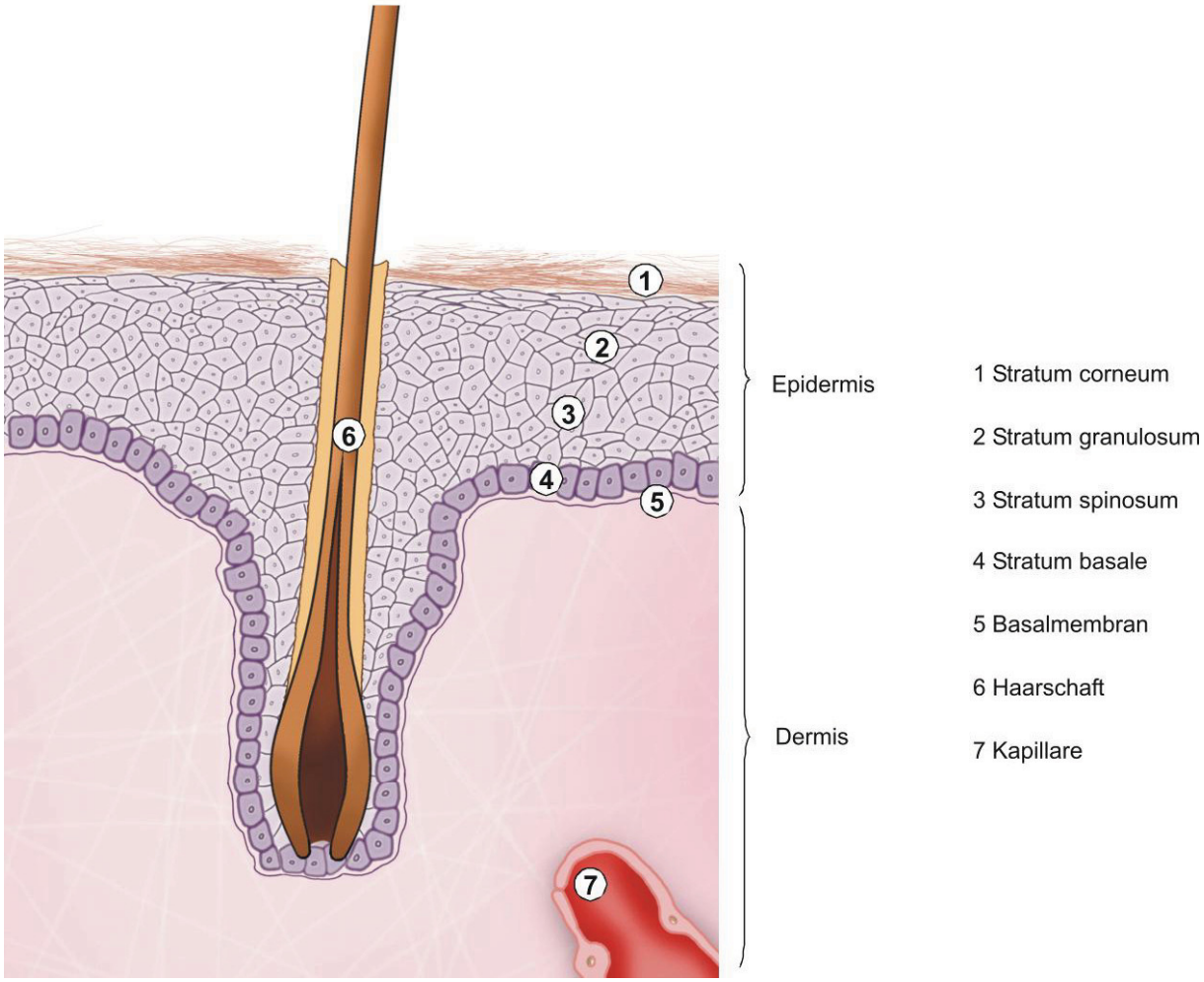


Abbildung 1: Aufbau der Dermis (Abbildung modifiziert nach Braun-Falco[1])

1.1.1 Epidermis (Oberhaut)

Die Epidermis des Menschen ist ein gefäßloses, vom Ektoderm abstammendes, mehrschichtig verhorntes Plattenepithel mit hoher Regenerationsfähigkeit. Je nach anatomischer Lokalisation und Beanspruchung variiert ihre Dicke zwischen 0,2 bis 0,5 mm.

Histomorphologisch erfolgt eine Einteilung der Epidermis in fünf Schichten von apikal nach basal: *Stratum corneum* (Hornschicht), *Stratum lucidum* (Glanzschicht), *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und *Stratum basale* (Basalzellschicht)[4].

Das *Stratum corneum* besteht aus mehreren Schichten abgestorbener, verhornter Zellen, den Korneozyten. Diese bilden eine widerstandsfähige Barriere zur Umwelt.

Korneozyten unterliegen einem hohen Zellumsatz und durchlaufen einen kontinuierlichen Prozess von Erneuerung, Abnutzung und späterer Abschilferung. Neue Zellen werden im *Stratum basale*, der Keimschicht der Kutis, gebildet. Sie besteht aus zur Mitose befähigten Basalzellen, die durch Proliferation für die kontinuierliche apikal gerichtete Regeneration der Epidermis sorgen. Im *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* durchlaufen die Keratinozyten ansteigende Reifegrade bzw. Entwicklungsstadien bis zu ihrer terminalen Differenzierung im *Stratum corneum*. Dort werden sie schließlich als kernlose Korneozyten abgeschilfert. Unter physiologischen Bedingungen dauert die Transitzeit (terminale epidermale Differenzierung) der Epidermis etwa vier Wochen[1-3].

Die Versorgung der Epidermis erfolgt durch Diffusion von Nährstoffen aus dem Kapillarbett der Dermis. Dominierender Zelltyp der Epidermis sind zu 85% die Keratinozyten. Ferner finden sich Pigmentzellen (Melanozyten), antigenpräsentierende Zellen (Langerhanszellen) oder auch Merkelzellen[3,4].

1.1.2 Dermis (Corium, Lederhaut)

Die Dermis ist ein gefäß- und nervenreiches Bindegewebe von 0,6 bis 3 mm Dicke. Sie verankert und versorgt die kapillarfreie Epidermis. Die Strukturproteine des dermalen Bindegewebes sind verschiedene Kollagenfasern und elastische Fasern, die die mechanische Stabilität und Flexibilität der Haut gewährleisten und zum Hautturgor beitragen[1-3].

Histologisch gliedert sich die Dermis in zwei Schichten: *Stratum papillare* (Papillenschicht) und *Stratum reticulare* (Geflechtschicht).

Versorgt wird sie durch ein komplexes arterielles, venöses und lymphatisches Gefäßsystem, das dem Austausch von Wasser, Stoffwechselprodukten, Hormonen und immunkompetenten Zellen dient.

Dominierender Zelltyp der Dermis sind Fibroblasten, die Kollagen, Elastin und andere Komponenten der extrazellulären Matrix synthetisieren. Ebenfalls enthält das Corium zahlreiche freie Nervenendigungen für die Wahrnehmung von Schmerz und Temperatur sowie Mechanorezeptoren, wie z.B. Vater-Pacini-Lamellenkörperchen, die der Vibrationsempfindung dienen[1-3].

1.1.3 Subkutis (Unterhaut)

Die an das *Stratum reticulare* des Coriums anschließende Subkutis besteht zu großen Teilen aus Fettgewebe, das als Kälteschutz, Energiespeicher und Schutzpolster dient. Das subkutane Fett ist in ein lockeres Bindegewebsnetz eingebettet. Die Subkutis wird von größeren Nervensträngen und Blutgefäßen durchzogen. Hier befinden sich auch Talg- und Schweißdrüsen, die an der Produktion des Säureschutzmantels der Epidermis beteiligt sind[1-3].

1.2 Die menschliche Haut als Abwehrorgan

1.2.1 Physikalische und immunologische Barriere

Die Haut ist mit einer Oberfläche von 1,5 bis 2 m^2 flächenmäßig das größte Organ des Menschen[3]. Sie überzieht die gesamte äußere Körperoberfläche und bildet somit die Grenzfläche zur Umwelt. Hauptfunktion der Kutis ist der Schutz des Körpers vor physikalischen und chemischen Noxen sowie dem Eindringen pathogener Erreger. Da sie als Grenzorgan ständig in Kontakt mit der lebenden Umwelt steht, ist sie von einer charakteristischen mikrobiellen Hautflora besiedelt. Physiologisch befindet sich auf der Kutis eine Bakterienflora aus apathogenen transitorischen und residenten Keimen, deren Anzahl in Abhängigkeit von der Lokalisation zwischen 10^2 bis 10^7 Mikroorganismen pro Quadratzentimeter Hautoberfläche variiert[6].

Trotz dieser dichten Bakterienbesiedlung und den optimalen thermischen und nährstoffreichen Bedingungen für Mikroorganismen auf der Epidermis sind Infektionen der gesunden Haut selten. Diese bemerkenswerte Resistenz der Haut gegenüber Mikroorganismen ist unter anderem auf die physikalische bzw. mechanische Barriere der Haut zurückzuführen, die durch mehrere Schichten verhornter Zellen gebildet wird.

Zusätzlich ist der menschliche Organismus durch ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem vor Fremdorganismen, denen die Überwindung der physikalischen Barriere der Haut gelungen ist, geschützt. Infektionen der Haut durch Bakterien, Viren und Pilze wie Dermatophyten provozieren eine unspezifische Entzündungsreaktion, die als angeborene Immunantwort bezeichnet wird (*innate immunity*)[1,2].

Die resultierende Entzündungsreaktion ist ein komplexer Vorgang, an dem Elemente unspezifischer, zellulärer und humoraler Immunität, sowie eine Kaskade untereinander reagierender löslicher Mediatoren, als auch Zytokine und Chemokine beteiligt sind. Antigene, die in die Haut gelangen, werden überwiegend phagozytiert, metabolisiert und in Untereinheiten zerlegt, die an den Haupthisto-kompatibilitätskomplex-(MHC) Klasse-II binden. Dieser Peptid-MHC-Komplex wandert zur Oberfläche Antigenpräsentierender Zellen (APC), wo er mit T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf T-Lymphozyten für dieses spezifische Antigen interagiert[1-3].

Als APC dienen mononukleäre Phagozyten (Monozyten, Makrophagen), dendritische Zellen und B-Lymphozyten. Die dendritische Zellpopulation der Haut setzt sich aus epidermalen Langerhans-Zellen und dermalen Dendrozyten zusammen. Die Präsentation der von ihnen phagozytierten und aufbereiteten Antigene auf MHC-Molekülen an ruhende T-Lymphozyten in regionären Lymphknoten führt zu deren Aktivierung, Teilung und Differenzierung in Phänotypen mit spezifisch angepassten Funktionen. Es wird eine klonale, zytokinbedingte Expansion differenzierter Abwehrzellen ausgelöst über die eine wirksame Immunantwort gegen das betreffende Antigen etabliert werden kann[3]. Diese spezifische Immunantwort ist zwar sehr effektiv, bedingt aber einen Zeitverlust durch die Reaktionszeit der immonologischen Abwehr für die ihm präsentierten Antigene.

Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die Haut neben der physikalisch-mechanischen Barriere durch Keratin- und Lipidschichten als äußerste Abgrenzung der Haut und der beschriebenen komplexen immunologischen Barriere auch ein anderes Abwehrsystem besitzen muss, welches eine physiologische Besiedlung der Haut mit Mikroorganismen erlaubt, aber eine Infektion verhindert.

1.2.2 Chemische Barriere

Neben der physikalischen Barriere der Haut und dem zellulären Immunsystem des Körpers besitzen Epithelien ein eigenes so genanntes „chemisches Abwehrsystem“ aus genkodierten Peptiden und Proteinen[7].

Untersuchungen an pflanzlichen und wirbellosen tierischen Organismen, die kein adaptives, spezifisches Immunsystem besitzen, haben gezeigt, dass Epithelien aktiv mithilfe einer „chemischen Barriere“ die Entstehung von Infektionen verhindern

können. Sie produzieren eine Vielzahl antimikrobiell wirksamer Eiweißmoleküle, die entweder konstitutiv produziert oder erst durch Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen erregerspezifisch gebildet werden[6]. Bei einer Verwundung wird im noch gesunden Epithel die Produktion verschiedener antimikrobieller Peptide (AMP) induziert. Daraus resultiert eine Erhöhung der Widerstandsfähigkeit der Dermis gegenüber Infektionen und ein exzessives Wachstum von pathogenen Mikroorganismen auf der Hautoberfläche wird verhindert[7].

Der Nachweis dieser leukozytenunabhängigen chemischen Hautbarriere erfolgte im Menschen erstmals durch die Isolierung hoher Konzentrationen antimikrobieller Peptide aus Extrakten läsionaler Schuppen von Patienten mit *Psoriasis vulgaris*[8]. Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang es das erste humane induzierbare antimikrobielle Peptid „humanes ß-Defensin-2“ (hBD-2) und später hBD-3 zu extrahieren und zu klonieren[8,9].

1.3 Antimikrobielle Peptide und Proteine des Menschen (AMP)

Antimikrobielle Peptide wurden in unterschiedlichen Organismen des Pflanzen- und Tierreiches beschrieben. Aufgrund ihrer Strukturbesonderheiten und ihres breiten Wirkspektrums gegen Bakterien, Pilze und Protozoen wurde angenommen, dass die alleinige Funktion dieser Peptide das unspezifische Abtöten eingedrungener Mikroorganismen sei. In Organismen mit einem schwach entwickelten Immunsystem, wie z.B. Pflanzen oder Insekten, scheinen antimikrobielle Peptide mit ihrem breiten Wirkspektrum eine suffiziente Abwehr gegenüber Krankheitserregern zu gewährleisten. In höheren Wirbeltieren und im Menschen, die ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem besitzen, werden antimikrobielle Peptide lediglich als eine erste Barriere gegen eingedrungene Mikroorganismen angesehen, um die Zeit bis zur Aktivierung der spezifischen Immunantwort zu überbrücken. Hierbei erscheint die Synthese kleiner Peptide energetisch günstiger und weniger aufwändig als die Produktion von spezifischen Antikörpern. Allerdings weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass antimikrobielle Peptide weitergehende Funktionen haben und sowohl einen wichtigen Teil der angeborenen Immunabwehr als auch ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen (s. Kap. 1.4).

Gesunde Epithelien der Haut und Schleimhäute produzieren permanent eine Vielzahl antimikrobieller Peptide wie z.B. Lysozym, Antileukoprotease (ALP), humanes ß-Defensin-1 (hBD-1) und Dermcidin 6. Im Jahre 1987 wurde erstmals beschrieben, dass Keratinozyten Lysozym, ein primär gegen grampositive Bakterien gerichtetes Protein, das auch im Speichel enthalten ist, konstitutiv produzieren. Ferner werden in der gesunden Haut der Proteaseinhibitor ALP und die sekretorische Phospholipase A2, die auch als staphylozider Faktor in Tränenflüssigkeit nachweisbar ist, von Keratinozyten konstitutiv generiert[6].

Im Gegensatz hierzu werden andere humane Defensine erst nach Kontakt der Epidermis mit Bakterien oder Pilzen gebildet. Erst bei einer Verletzung des *Stratum corneum* als physikalische Barriere der Haut geraten Bakterien oder Pilze über spezifische Erkennungsstrukturen in Kontakt mit lebenden Keratinozyten, woraufhin eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die zu einer massiven Produktion induzierbarer antimikrobieller Peptide führt (beim Menschen: hBD-2, hBD-3, Cathelizidin LL-37 u.a.). Gleichzeitig bewirken chemotaktische Eigenschaften dieser Peptide die Rekrutierung von Immunzellen wie z.B. T-Lymphozyten und dendritische Zellen.

1.3.1 Humane ß-Defensine

Humane ß-Defensine sind AMP, die hauptsächlich in den Epithelzellen der Haut, der Atemwege, des Urogenitaltraktes und des Gastrointestinaltraktes produziert werden [7,10].

In der Primärsequenz der ß-Defensine sind sechs Cysteine enthalten, die drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Hierbei sind die Cysteine C1-C5, C2-C4 und C3-C6 verbunden[18]. Als kleine argininreiche, kationische Peptide mit einem Molekulargewicht von 3,5 bis 6 kDa kommen sie in allen tierischen Organismen und höheren Pflanzen vor. Sie dienen der Abwehr von mikrobiellen Erregern, vor allem Bakterien, aber auch Pilzen. Sie bilden einen großen Anteil der Proteine (etwa 30%) in den Granula der neutrophilen Granulozyten[7].

Die ersten als humane ß-Defensine bezeichneten Peptide waren hBD-1 und hBD-2. Nachfolgend gelang es zwei weitere humane ß-Defensine, hBD-3 und hBD-4, als

antimikrobiell aktive Peptide zu identifizieren[7,8,26]. Für humane ß-Defensine werden bisher sechs Funktionen bei der Immunantwort postuliert[27,29]:

1) Antimikrobielle Aktivität
2) Chemotaktische Funktion für unreife dendritische Zellen
3) Chemotaktische Funktion für Makrophagen/Monozyten
4) Chemotaktische Funktion für Gedächtniszellen
5) Aktivierung von Mastzellen
6) Direkte Bindung von LPS

1.3.1.1 Humanes ß-Defensin-1 (hBD-1)

Im Jahre 1995 gelang es erstmals ein Peptid aus dem Plasma von dialysepflichtigen Patienten zu isolieren, das als humanes ß-Defensin-1 (hBD-1) bezeichnet wurde[10]. HBD-1 ist ein basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 3,9 kDa, das aus 36 Aminosäuren aufgebaut ist[7].

HBD-1 wird in vergleichsweise großen Mengen von Epithelien des Urogenitaltraktes gebildet, so dass im Urin Konzentrationen von 50-300 µg/l messbar sind[10]. In geringeren Mengen wird es auch in der Haut produziert.

Für seine Wirksamkeit wir ein hoher zytotoxischer Effekt gegenüber *Escherichia coli* (*E. coli*) und anderen verschiedenartigen Bakterien und Pilzen postuliert[11]. Hierbei erstreckt sich das Wirkungsspektrum selektiv auf die auf den Epithelien physiologisch vorhandene Mikroflora[7].

Die Synthese von hBD-1 erfolgt permanent. Es wird also konstitutiv exprimiert und nicht erst durch inflammatorische Stimuli wie Bakterien, Hefen oder Zytokine induziert[7].

1.3.1.2 Humanes ß-Defensin-2 (hBD-2)

Das humane ß-Defensin-2 (hBD-2) wurde erstmalig 1997 aus menschlicher Haut isoliert und zwar aus den Schuppenextrakten von Patienten mit *Psoriasis vulgaris*[8]. Es handelt sich um ein basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 4 kDa und 41 Aminosäureresten mit einer großen Anzahl der Aminosäuren Arginin und Lysin[8].

HBD-2 kommt in gesunder Haut nur in geringen Mengen vor und wird in Keratinozyten durch proinflammatorische Zytokine wie TNF-α oder IL-1β induziert.

HBD-2 unterscheidet sich von anderen humanen antimikrobiellen Peptiden durch seine hohe bakterizide Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien wie *E. coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) und Hefen wie *Candida albicans*[8]. Eine Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), zeigte sich lediglich in der Hemmung des Wachstums[7,8].

1.3.1.3 Humanes ß-Defensin-3 (hBD-3)

HBD-3 wurde im Jahre 2000 von Harder et al. in läsionaler Haut von *Psoriasis vulgaris* Patienten entdeckt[9]. Das 5,12 kDa große Peptid konnte in Keratinozyten und in den Epithelzellen der Mundhöhle und des Respirationstraktes nachgewiesen werden. Dieses ß-Defensin weist sowohl eine bakterizide Wirkung gegen gramnegative Bakterien, wie *Ps. aeruginosa* und *E. coli*, als auch gegen grampositive Erreger wie *S. aureus* und *Streptococcus pyogenes* auf und wirkt ebenfalls gegen Hefen wie *Candida albicans*[9]. HBD-3 ist somit das potenteste, bislang bekannte körpereigene antimikrobielle Peptid. Die Produktion des Peptids wird wie im Falle von hBD-2 durch inflammatorische Prozesse oder den Kontakt mit Bakterien induziert und lässt sich in gesunder Haut kaum nachweisen[9].

1.3.2 Cathelizidin LL-37

Cathelizidine sind in Säugetieren weit verbreitet. Im Menschen wurde bisher als einziges Cathelizidin das antimikrobielle Peptid LL-37 (4493 Da) nachgewiesen, das nach seiner Sequenz von 37 Aminosäuren benannt wurde. LL-37 ist im Gegensatz zu den oben beschriebenen Defensinen ein lineares α-helikales Peptid ohne Cysteine und weist folglich keine Disulfidbrücken in seiner Sekundärstruktur auf. Es wird durch Proteinase 3 aus dem Propeptid „*human cationic antimicrobial peptide 18“* (hCAP-18) abgespalten[12].

LL-37/hCAP-18 sind multifunktionelle Moleküle, die vor allem in Epithelzellen diverser Organe des Gastrointestinal- und Respirationstraktes sowie im Hoden, im Knochenmark und in der Haut gebildet werden[13,14]. Darüber hinaus werden sie in neutrophilen Granulozyten, Monozyten, T- und B-Lymphozyten exprimiert[15]. Für Cathelizidine werden nach bisherigem Stand der Forschung vier Funktionen bei der Immunantwort postuliert[16,17]:

1) Antimikrobielle Aktivität
2) Direkte Bindung und Neutralisation von LPS
3) Chemotaktische Funktion für T-Zellen und phagozytierende Zellen
4) Degranulation von Mastzellen

1.3.3 RNAse 7

Untersuchungen aus *Stratum corneum* Extrakten hautgesunder Probanden hinsichtlich antimikrobiell aktiver Faktoren führten zur Entdeckung der RNAse 7[18]. Dieses antimikrobielle Peptid hat ein breites Wirkspektrum gegen Mikroorganismen der physiologischen Hautflora. *In vitro* Versuche demonstrierten eine dosisabhängige zytotoxische Aktivität der RNAse 7 gegen Bakterien wie *E.coli*, *Ps. aeruginosa* und *S. aureus*. Mit einem Molekulargewicht von ca. 14 kDa zeigt es strukturelle Ähnlichkeit zu humanen Ribonukleasen[18]. RNAse 7 ist besonders wirksam gegen vancomycinresistente *Enterococcus faecium* (letale Dosis 90% < 30 nM). Zusätzlich zur konstitutiven Expression wurde kürzlich herausgefunden, dass RNAse 7 mRNA in kultivierten primären Keratinozyten durch IL-1ß, IFN-γ und durch Bakterien induzierbar ist. RNAse 7 stellt somit innerhalb der Gruppe der AMP eine weitere Klasse der epithelialen Abwehr dar[19].

1.3.4 Psoriasin (S100A7)

S100A7 ist ein kalziumbindendes Protein aus der Familie der S100 Proteine[18]. Die gegenwärtige Nomenklatur der S100 Proteinfamilie stützt sich im Wesentlichen auf die Organisationsstruktur ihrer Gene in einem *Cluster* auf Chromosom 21. Gene dieses *Clusters* werden terminal mit A gekennzeichnet und gemäß ihrer Position in Leserichtung des kodierenden DNA Stranges fortlaufend nummeriert (S100A1, S100A2, etc.)[20].

Das 11-kDa große, Metallionen-bindende S100 Peptid „Psoriasin“ (S100A7) wurde erst kürzlich als ein hochwirksames antimikrobielles Peptid der gesunden menschlichen Haut beschrieben, welches insbesondere das Wachstum des gramnegativen Bakteriums *E. coli* hemmt[21]. Neben Mediatoren wie TNF-α kann dieses antimikrobielle Peptid in der Haut vor allem durch Bakterien induziert werden. Im Gegensatz zu humanen ß-Defensinen, welche über die Formation von

spannungsregulierten Poren auf der äußeren Bakterienmembran die Zerstörung der Lipidmembran bewirken, wirkt Psoriasin über den Entzug des für das Überleben von Bakterien essenziellen Zinks und erweist sich dabei als hocheffektiv[21].

1.4 Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide

Der Wirkungsmechanismus der AMP bei der Abtötung oder Inaktivierung von Zielzellen, wie etwa grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie Pilzen und Viren, wurde in den letzten Jahren näher untersucht[22-27].

AMP bestehen aus kationischen und hydrophoben Aminosäureresten. Durch ihre positive Ladung interagieren sie elektrostatisch mit der negativ geladenen anionischen glykosylierten Oberfläche der Erregermembran[6,18]. Wie ein Peptid-Teppich (*carpet-like*) schichten sich die antimikrobiellen Peptide über die Erregermembran und beeinträchtigen ab einem bestimmten Konzentrationsverhältnis von Peptid zu Lipid die Fluidität und Permeabilität der Biomembran so stark, dass es zur kompletten Auflösung der Membran in einzelne Mizellen kommt[18,22,23].

Bezüglich des Mechanismus der Zerstörung der Erregermembran werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben: Zum einen die Formation transienter Poren (*toroid-pore-mechanism*), zum anderen die ringförmige Anordnung transmembranärer Poren (*barral-stave-mechanism*) in der Erregermembran.

Beim *toroid-pore*-Mechanismus nehmen die Peptide im Rahmen der Interaktion mit der geladenen und hydrophoben Biomembran eine alpha-helikale Struktur an, die zunächst parallel zur Membran ausgerichtet ist. Die hydrophoben Reste der gebundenen Peptide verdrängen die polaren Köpfe der Phosphorlipide und verursachen einen Bruch in der hydrophoben Region der Lipiddoppelschicht, was die Membranoberfläche destabilisiert. Ab einem bestimmten Konzentrationsverhältnis von Peptid zu Lipid assoziieren die Peptide zu *Cluster*, orientieren sich senkrecht zur Membran und formen transiente Poren[6]. Das Cathelizidin LL-37 wirkt über diesen Mechanismus[24].

Beim *barral-stave*-Mechanismus bilden die AMP durch ringförmige Anordnung eine transmembranäre Pore, indem sie ihre apolaren Reste der hydrophoben Lipidmembran zuwenden und mit ihren polaren Resten einen hydrophilen Kanal formen[23]. Diese Pore kann aus einem Komplex mehrerer aggregierter Monomere

bestehen. Im Gegensatz zum vorher beschriebenen *toroid-pore*-Mechanismus findet hierbei eine Interkalierung der Peptide mit den Lipiden statt.

Für die Defensine wird die Permeabilisierung der Lipidmembran durch eine aus sechs bis acht Dimeren gebildete Pore angenommen. Defensine wirken demnach über den hier als letzten beschriebenen Mechanismus, dem *barral-stave*-Mechanismus. Durch Formation von spannungsregulierten Ionenkanälen auf den negativ geladenen Phospholipid-Gruppen der äußeren Bakterienzellmembran wird eine Porenbildung induziert, die zur Zerstörung der Zellmembran des Mikroorganismus und nachfolgendem Tod der Zielzelle durch Osmose führt [25,26,27].

Über die direkte antimikrobielle Wirkung hinaus besitzen antimikrobielle Peptide noch weitere Funktionen. Im Jahre 1999 gelang es Yang und Mitarbeiter eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem durch AMP zu eruieren. Sie zeigten, dass sowohl Cathelizidine und auch Defensine chemotaktische Eigenschaften bevorzugt auf phagozytierende Zellen (Neutrophile Granulozyten, Monozyten) und T-Lymphozyten besitzen[28].

Neben der oberflächlichen Auflagerung einzelner Defensinmonomere auf der Membran von Mikroorganismen (*carpet-like*) soll es zur Ausbildung von Defensin-Antigen-Komplexen kommen, die dem Immunsystem präsentiert werden[17,27]. Defensine können durch die Defensin-Antigen-Komplexbildung bei akuter Infektion oder Entzündung immunkompetente Zellen rekrutieren und so zu einer schnelleren Aktivierung der adaptiven Immunabwehr führen.

Das Cathelizidin LL-37 fungiert ebenfalls als Mediator bei akuter Infektion oder Entzündung, indem es chemotaktisch die Zytokinexpression stimuliert und dadurch sowohl T-Zellen als auch phagozytierende Zellen aktiviert[17,29,30].

Man vermutet, dass es zeitgleich mit dem Eindringen von Mikroorganismen in die Haut zu einer durch Cathelizidine und Defensine induzierten Chemotaxis von phagozytierenden Zellen wie z.B. neutrophilen Granulozyten kommt[30].

Zusammenfassend stimulieren Defensine als auch Cathelizidine die Zytokinexpression vieler Immunzellen und rekrutieren als chemotaktische Faktoren weitere Effektoren der spezifischen und unspezifischen Abwehr. Damit stellen sie eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem her[15,17,29].

1.5 Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

1.5.1 Charakteristika des EGFR

Der EGFR ist Teil einer Unterfamilie von vier eng verwandten transmembranen Rezeptoren: EGFR (HER1/erbB-1), HER-2 (erbB-2/neu), HER-3 (erbB-3) und HER-4 (erbB-4). Als 170 kDa großes und aus 1186 Aminosäuren bestehendes membranständiges Glykoprotein lässt es sich in drei funktionelle Bereiche einteilen: eine extrazelluläre ligandenbindende Domäne (N-Terminus), eine hydrophobe transmembranäre Domäne und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität (C-Terminus)[31].

Eine Reihe von EGFR-Liganden können die Dimerisierung und Aktivierung der Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie induzieren. Der bedeutsamste von ihnen ist der epidermale Wachstumsfaktor (EGF; 53 Aminosäuren, 6.4 kDa). Außerdem fungieren der Transformierende Wachstumsfaktor alpha (TGF-α; *transforming growth factor-α*), Amphiregulin, Betacellulin, HB-EGF (*heparin binding epidermal growth factor*), Epiregulin und Neureguline (NRG) als Liganden[31,32]. Diese Liganden weisen für die verschiedenen EGFR-Subtypen unterschiedliche Präferenzen auf. Während EGF, TGF-α und Amphiregulin nur an den EGFR (ErbB1), und Neureguline nur an ErbB3 und ErbB4 binden, sind Betacellulin, Epiregulin und HB-EGF ausschließliche Liganden von ErbB4 und ErbB1. Für ErbB2 konnte bisher noch kein Ligand identifiziert werden (vgl. Abb. 2 und Abb. 3).

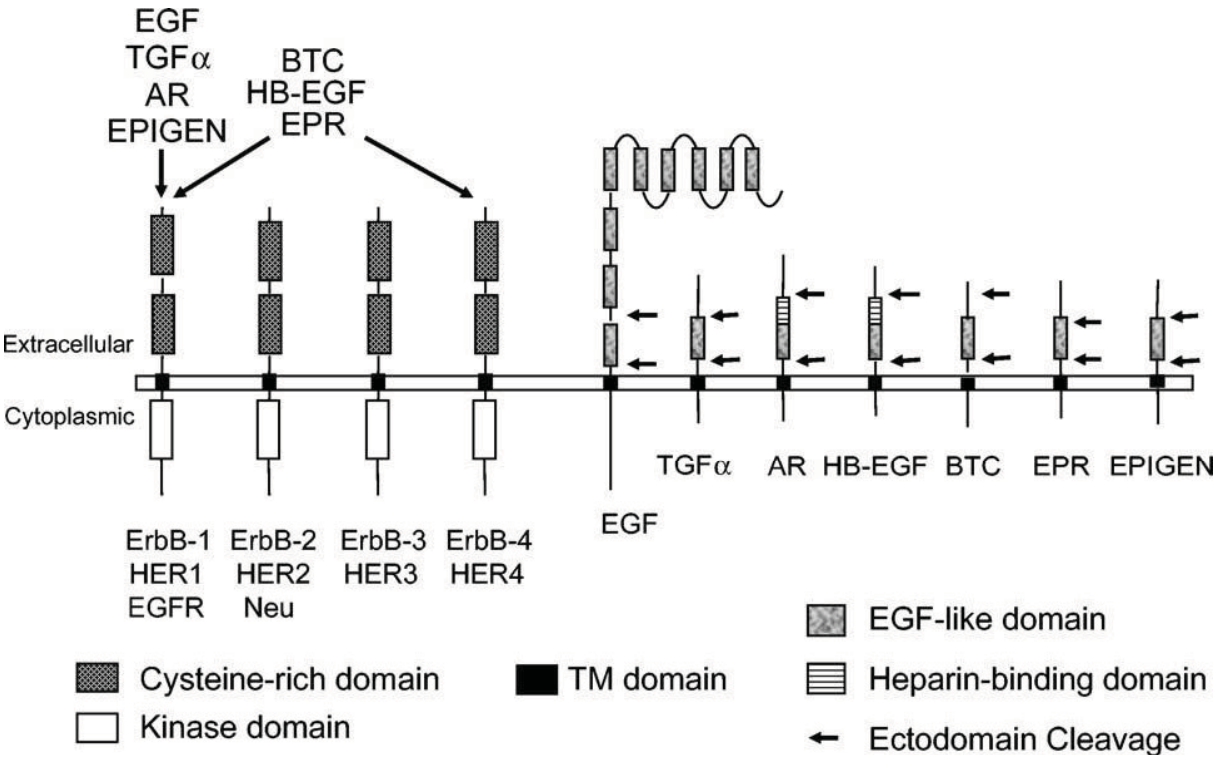


Abbildung 2: Die EGF-Rezeptor (ErbB)-Familie und ihre Liganden (Harris et al. 2003[33])

Zunächst liegt der EGFR als Monomer in der Zellmembran vor. Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors bewirkt in einem ersten Schritt die Dimerisierung von Rezeptormonomeren. Hierbei können entweder zwei identische EGF-Rezeptoren zu Homodimeren dimerisieren oder es erfolgt die Dimerisierung eines EGF-Rezeptors mit einem anderen Rezeptor aus der HER-Familie zu einem Heterodimer[34].

Das Resultat ist in beiden Fällen eine Konformationsänderung des Rezeptors mit anschließender Autophosphorylierung der intrazellulären, intrinsischen EGFR-Tyrosinkinasen-Domäne[35,36].

1.6 EGFR-induzierte Signaltransduktion

Die unter 1.5 beschriebene Dimerisierung und Phosphorylierung des EGFR bedingt die Aktivierung spezifischer Signalkaskaden.

Phosphorylierte Tyrosinreste sind hochaffine Bindungsstellen für eine Reihe intrazellulärer Signalproteine. Es werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert zu denen z.B. der Ras-Raf-MAPK (Mitogen-Aktivierte-Proteinkinasen)-Weg (s. Kap.

1.6.1), der STAT-Signalweg (*Signal Transducers and Activators of Transcription*, s. Kap. 1.6.2), der Phospholipase C-Weg (PLC, s. Kap. 1.6.3) aber auch die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und AKT (Proteinkinase B) gehören (s. Kap. 1.6.4).

Somit moduliert die EGFR-Signalaktivierung schließlich Gentranskription und DNA-Replikation und induziert Differenzierungs- und Proliferationsprozesse[37]. Störungen der EGFR-Signalkaskaden können zur Tumorbildung führen[38,39,40].

Nach erfolgter Aktivierung werden Rezeptor-Liganden-Komplexe internalisiert und anschließend entweder recycelt oder abgebaut[41,42].

1.6.1 MAPK-Signaltransduktion

MAPK gehören zu den am besten untersuchten und wichtigsten durch extrazelluläre Signale aktivierten Signalkaskaden[43]. Eine Subgruppe der MAPK bilden die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) bei denen es sich um zytoplasmatische Proteinkinasen handelt, deren Name sich aus ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen wirkende Liganden ableitet. Neben Zytokinen oder Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren werden die extrazellulär regulierten Kinase1/2 (ERK1/2) vor allem durch Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF-α bzw. IGF-1/IGF-2 aktiviert[44,45]. Die Aktivierung von ERK1/2 führt zu Zellzyklusprogression und Hemmung von Apoptose[46,47].

1.6.2 STAT-Signaltransduktion

Bei den Proteinen der STAT-Familie handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in der Wachstumsfaktor-induzierten Signaltransduktion spielen. Mittlerweile sind verschiedene STAT-Proteine mit unterschiedlicher Funktion bekannt, die aus 750-850 Aminosäuren bestehen und in ihrer inaktiven Form als Monomere im Zytoplasma einer Zelle vorliegen[48].

Im Verlauf der STAT-Aktivierung durch Phosphorylierung spezifischer und hochkonservierter Tyrosinphosphorylierungsstellen kommt es zu einer Dimerisierung von STAT-Monomeren, wobei aus gleichen und/oder verschiedenen STAT-Monomeren Homo- bzw. Heterodimere gebildet werden. Nach der Translokation der Dimere in den Zellkern binden diese an die Kern-DNA und können so die

Transkription verschiedener Gene für Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose regulieren. Erhöhte STAT-Aktivität spielt somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren. In diesem Zusammenhang wird vor allem für STAT3 sowie STAT5-Proteine eine Inhibition der zellulären Apoptose sowie eine Induktion der Zellproliferation beschrieben[48,49].

1.6.3 PLC-Singnaltransduktion

Die Phospholipase C (PLC) gehört zu einer Familie von Isoenzymen, die aus dem zweifach phosphorylierten Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP2) die „*second messenger*" Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysieren können.

Nach der Hydrolyse wandert das hydrophile IP3 zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und bewirkt dort die Freisetzung von Ca^{2+}. Dieses bindet an Calmodulin und aktiviert dadurch Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen. Außerdem werden Ca^{2+} -abhängige Enzyme und Prozesse aktiviert[50].

Das lipophile DAG hingegen verbleibt in der Membran und aktiviert die Proteinkinase C, eine Ser/Thr-Kinase, die in Gegenwart von Ca^{2+} Proteine phosphoryliert und dadurch deren Funktionszustand ändert. Diese Aktivierung fördert Vorgänge der Transkription im Zellkern und induziert somit die Mechanismen der Proliferation und Differenzierung[50].

1.6.4 PI3K-Akt-Signaltransduktion

EGF-Stimulation kann ferner zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) führen, welche PIP2 (Phosphoinisitol 4,5-bisphosphat) zum „*second messenger*" PIP3 phosphoryliert. Ein wichtiges Ziel der PI3-K ist PKB/Akt, welches durch die Aktivierung von NF-κB anti-apoptotische Effekte vermittelt. Akt inhibiert zeitgleich durch die Phosphorylierung von Raf den MAPK Signalweg.

Akt ist das am besten untersuchte PI3K-Substrat und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Apoptose. Es führt über verschiedene Stimuli zu Verschiebungen im Zellzyklus, zum Verlust der Zelladhäsion und zu DNA-Schädigungen. Außerdem ist Akt an der Kontrolle der Translation während der Proteinbiosynthese beteiligt[51].

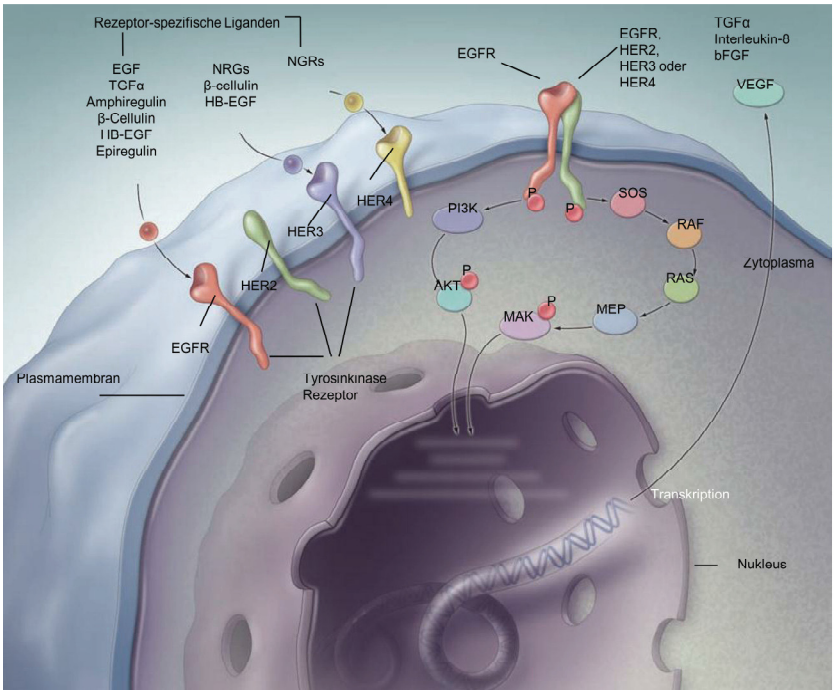


Abbildung 3: EGFR-Liganden und Signalwege (Abbildung modifiziert nach Ciardiello et al. 2008[57])
Die Bindung eines Rezeptor-spezifischen Liganden führt zur EGFR-Mono- oder Heterodimer-Bildung und induziert eine ATP-abhängige Phosphorylierung. Anschließend werden intrazelluläre Signalwege (PI3K-Akt, RAS-RAF-MEK-MAPK) aktiviert, die z.B. Antiapoptose oder Proliferation vermitteln.

1.7 Bedeutung des EGFR bei Tumorgenese und –progression

Für die Regulation von Wachstum, Überleben und Differenzierung eukaryotischer Zellen sind Rezeptortyrosinkinasen wie der EGFR von fundamentaler Bedeutung. Der EGFR ist unter physiologischen Bedingungen in den Zellmembranen nahezu aller Epithel- und Stromazellen vorhanden und wird darüber hinaus in einer Vielzahl solider Tumoren überexprimiert (Tab. 1)[42]. Auf einer gesunden Körperzelle werden etwa 40-100 EGFR exprimiert. Tumorzellen dagegen können bis zu zwei Millionen EGFR aufweisen[52]. Erst die massive Expression von EGFR und deren gesteigerte Aktivität erlaubt es den Tumorzellen autonom und dysreguliert zu proliferieren. So finden sich Überexpressionen des EGFR in Prostata-, Mamma- und Pankreas-Karzinomen, kolorektalen und ovarialen Tumoren, beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) sowie bei über 90% der Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich (SCCHN)[53]. Die Überexpression des EGFR dient hier nun als neuer Angriffspunkt zur Tumorbekämpfung.

Tumortyp	Anteil der Tumoren mit EGFR-Überexpression (%)
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	40-80
Prostatakarzinom	40-80
Mammakarzinom	14-91
Kolorektales Karzinom	25-77
Pankreaskarzinom	30-89
Ovarialkarzinom	35-70
Kopf-Hals-Tumoren	80-100

Tabelle 1: Tumoren mit EGFR-Überexpression (Harari et al. 2004[42])

Konventionelle Tumortherapien basieren in erster Linie auf radikalen Operationen sowie im Verlauf bzw. alternativ auf konventioneller Chemo- oder Strahlentherapie. Bei Inoperabilität eines Tumors aufgrund fortgeschrittenen Wachstums oder multipler Metastasierung über Lymph- und Blutweg ist eine Resektion *in sano* jedoch nicht mehr möglich. Als Therapiestrategien gegen eine weitere Ausbreitung der Tumorzellen im Körper verbleiben hier Chemo- oder Strahlentherapie. Chemotherapien wirken unspezifisch antiproliferativ über eine Hemmung des DNA Stoffwechsels und/oder über Induzierung von Apoptose bei schnell proliferierenden Zellen[54,55]. Eine selektive und zielgerichtete Wirkung auf Tumorzellen ohne gesunde schnell proliferierende Zellen mit einzubeziehen ist nicht gewährleistet. Ferner entwickeln Tumorzellen Mechanismen sich der Apoptose zu entziehen und können somit im Verlauf der Therapie Resistenzen gegen zytostatische Wirkstoffe entwickeln. Viele Tumoren entwickeln im Verlauf der Behandlung solch eine „Chemoresistenz“ gegen strukturell unterschiedliche Substanzen. Dieser Vorgang ist häufig therapielimitierend und verhindert das Erreichen einer stabilen Remission unter der chemotherapeutischen Behandlung[56].

Strahlentherapien sind meist nur begrenzt anwendbar und viele Tumore sind durch eine geringe Radiosensitivität charakterisiert. Ferner ist die Strahlentherapie durch die Anwendung ionisierender Strahlen mit einer iatrogenen Strahlenbelastung

verbunden. Durch die erhöhte Strahlenexposition können lokal im Bereich der Bestrahlung schmerzhafte akute Strahlenerytheme resultieren und/oder im Verlauf ein Radioderm entstehen, wobei letzteres mit einer erhöhten Gefahr der Karzinom-Entstehung einhergeht[57].

In den letzten Jahren konnte durch die Entwicklung zielgerichteter biologischer Substanzen ein bedeutender Fortschritt in der Chemotherapie maligner Tumoren erreicht werden. Durch ihre spezifische Wirkung auf molekulare Tumorzielstrukturen weisen sogenannte „*Biologicals*“ oder auch „*targeted-cancer drugs*“ gegenüber konventionellen Chemotherapeutika den Vorteil eines maximalen therapeutischen Benefits bei minimaler toxischer Wirkung auf gesunde Zellen auf. Durch eine EGFR-Inhibition bietet sich somit die Möglichkeit eine verbessert selektive und zielgerichtete Regression der Tumore zu erreichen[58,59].

Die Entwicklung neuer Medikamente mit spezifischeren Wirkungsmechanismen, die selektiv auf Krebszellen wirken, ist von großer Bedeutung. Die Inhibition des EGFR stellt sich als vielversprechende Zielstruktur heraus und ist ein attraktiver Angriffspunkt für die Tumortherapie[53,60]. Tumorzellspezifische Wirkstoffe könnten in Zukunft alleine oder in Kombination mit etablierten Therapieverfahren effektive und nebenwirkungsärmere Behandlungsformen für refraktäre Tumoren darstellen[59,61,62].

1.8 Therapeutische Beeinflussung des EGFR: „*Targeted-cancer-therapy*“

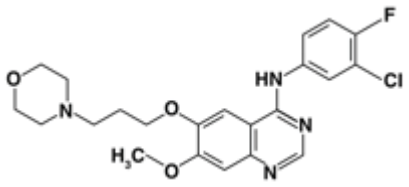
In den letzten Jahren wurden mannigfaltige Strategien zur EGFR-Inhibition erprobt [62,63,64]. Bisher konnten mindestens vier Inhibitoren des EGFR erfolgreich in der Therapie EGFR-exprimierender Tumoren etabliert werden.

Hierbei handelt es sich zum einen um extrazellulär-bindende monoklonale EGFR-Antikörper (Cetuximab, Erbitux® und Panitumumab, Vectibix®) sowie zum anderen um kleinmolekulare Inhibitoren der intrazellulären EGFR-Tyrosinkinase (Erlotinib, Tarceva® und Gefinitib, Iressa®)[58,65].

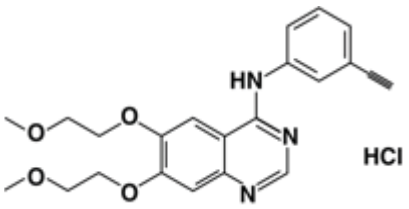
Weitere EGFR-„*targeted-cancer drugs*“ befinden sich in frühen Phasen der klinischen Testung[58].

1.8.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Kleinmolekulare EGFR-TK-Inhibitoren, wie die bereits zugelassenen Arzneistoffe Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®), lagern sich reversibel in die intrazelluläre ATP-Bindungstasche des Rezeptors an und blockieren so selektiv die Phosphorylierung des Rezeptors (s. Abb. 4). Dadurch wird die Aktivierung der EGFR-Signalkaskade verhindert. Im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern kommt es bei dieser Substanzklasse zu keiner Herunterregulierung des EGFR[58,65].
Gefitinib und Erlotinib (s. Abb. 3) binden als oral bioverfügbare EGFR-spezifische 4-Anilinochinazoline, mit circa 100-fach größerer Affinität an die EGFR-Tyrosinkinasedomäne als an andere Kinasen. Sie inhibieren durch kompetitive ATP-Blockade an der EGFR-Tyrosinkinase-Domäne reversibel die Autophosphorylierung des Rezeptors. Neuartige irreversible TK-Inhibitoren befinden sich gegenwärtig in klinischer Testung[58,65].



Gefitinib (Iressa®)



Erlotinib (Tarceva®)

Abbildung 4: Chemische Struktur der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib

Der niedermolekulare EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib (Iressa®) wurde als erstes Präparat seiner Art im Juli 2002 in Japan für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) zugelassen. In vorausgegangenen Phase II-Untersuchungen (IDEAL 1 und 2) konnte bei über 40% erfolglos vorbehandelter Patienten mit NSCLC eine Abnahme der Tumormasse und eine Besserung der Krankheitssymptome erreicht werden. Gefitinib ist in den USA, Kanada, Japan, Korea und der Schweiz für die Behandlung des NSCLC in der Drittlinientherapie zugelassen. Die amerikanische Zulassungsbehörde FDA hat allerdings die

Zulassung von Gefitinib im Juni 2005 unterbunden, da im Rahmen der ISEL-Studie (*Iressa® Survival Evaluation in Lung cancer*) ein klinisch kaum relevanter, nur statistisch tendenzieller Überlebensvorteil unter Gefitinib-Behandlung nachgewiesen wurde. In Japan, Korea, China und anderen asiatischen Ländern befindet sich Gefitinib jedoch weiterhin auf dem Markt[58]. In Europa erfolgte 2009 die Zulassung einer Gefitinib-Monotherapie als personalisierte Therapie zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC mit aktivierenden Mutationen der EGFR-Tyrosinkinase. In zwei klinischen Phase-III-Studien (IPASS, INTEREST) konnte ein Vorteil der Therapie für diese Patienten im Gegensatz zu einer konventionellen Chemotherapie bewiesen werden. Häufigste Nebenwirkungen unter Gefitinib-Therapie sind papulo-pustulöse Exantheme (ca. 49%) und Diarrhöen (ca. 35%)[25,66].

Der selektive EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (Tarceva®) erhielt im Oktober 2005 in Deutschland die Zulassung für die Therapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, bei denen mindestens eine vorausgegangene Chemotherapie zu keiner Remission geführt hat. Seit November 2005 ist Erlotinib in den USA auch zur Therapie bei fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreas-Karzinom zugelassen. Die Zulassung für metastasierte Pankreas-Karzinome in Kombination mit Gemcitabine erfolgte in der Europäischen Union (EU) verspätet im Januar 2007[58]. In einer randomisierten, placebokontrollierten Studie mit 569 Patienten konnte hier eine Steigerung des Gesamtüberlebens um 22% gegenüber der Placebogruppe nachgewiesen werden. Im Mai 2009 wurde als spezifische Nebenwirkung der Erlotinib-Therapie auf die erhöhte Inzidenz von Magen-Darm-Perforationen hingewiesen. Häufigste Nebenwirkungen unter Erlotinib-Therapie sind jedoch papulo-pustulöse Exantheme (72%), Diarrhöen (56%), Superinfektionen (43%) und Stomatitiden (23%)[31,42,66].

1.8.2 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper können aufgrund ihres großen Molekulargewichts nicht die Zellmembran der Zielzelle durchdringen. Ihre Zielstruktur ist daher die extrazelluläre Rezeptordomäne. Sie hemmen kompetitiv die natürliche Ligandenbindung und verhindern somit die Signalaktivierung. Zudem bewirken sie eine Internalisierung und Herunterregulation des EGFR[67].

Cetuximab (Handelsname: Erbitux®) ist ein chimärer, rekombinant humanisierter, monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1, der gegen die extrazelluläre Domäne des Wachstumsrezeptor EGFR/ErbB1 gerichtet ist. Nach einer Serie erfolgreicher klinischer Studien wurde Cetuximab 2003 in den USA, 2004 auch in der EU zur Behandlung von Kolorektalen-Karzinomen zugelassen, besonders in Fällen, bei denen eine vorausgegangene Oxaliplatin- und Ironotecan-basierte zytostatische Chemotherapie versagt hat. Seit 2006 ist es in Deutschland zudem zur Behandlung von lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich (SCCHN) in Kombination mit einer Strahlentherapie zugelassen. 2008 wurde die Zulassung auf eine Kombinationstherapie mit einer platinbasierten Standardchemotherapie bei Patienten mit rezidiviertem und/oder metastasiertem SCCHN erweitert[58]. Im Jahre 2009 wurde schließlich eine Studie publiziert (CRYSTAL) die zeigte, dass die Kombination mit Cetuximab einer Standardtherapie mit Fluorouracil und Leucovorin (FOLFIRI) beim metastasierten kolorektalen Karzinom mit Expression des Wildtyp K-Ras-Gen deutlich überlegen ist. Das Wildtyp K-Ras-Gen übernimmt hierbei eine Schlüsselfunktion in der EGFR-Signalkaskade. Häufigste Nebenwirkungen der Cetuximab + FOLFIRI vs. FOLFIRI-Therapie waren papulo-pustulöse Exantheme (ca. 16% vs. 0%) und Diarrhöen (ca. 16% vs. 10,5%) [41, 66].

Panitumumab (Handelsname: Vectibix®) ist ein vollständig humanisierter monoklonaler Antikörper aus der Gruppe der Immunoglobuline (IgG2κ). Er bindet ebenfalls an die äußere EGFR Ligandenbindungsstelle. Die therapeutische Zielstruktur entspricht damit der des chimären Antikörpers Cetuximab. Es findet weltweit seinen Einsatz als Monotherapie bei der Drittlinientherapie von kolorektalen Karzinomen, die resistent gegenüber Oxaliplatin, Irinotecan und Fluoropyrimidinen sind[58]. In den USA wurde Panitumumab im September 2006 zugelassen. In der EU erteilte die EU-Kommission am 3. Dezember 2007 eine bedingte Zulassung für die Zweitlinientherapie des metastasierten Kolon- oder Rektumkarzinoms. Es müssen der Anwendung erfolglose Therapieversuche z.B. mit 5-Fluorouracil, Oxaliplatin oder Irinotecan vorausgegangen sein. Außerdem ist für die erlaubte Anwendung der Nachweis des Wildtyp-K-Ras-Gens im Tumor erforderlich[58]. Häufigste Nebenwirkungen unter Panitumumab-Therapie sind Hautreaktionen (90%), darunter

akneiforme Hautveränderungen (57%), Pruritus (57%), Fissuren (20%) oder *Xerosis cutis* (10%) und Diarrhöen (21%)[20, 66].

1.9 Kutane Nebenwirkungen unter Therapie mit EGFR-Inhibitoren

Als häufigste und gravierendste unerwünschte Nebenwirkung unter der Therapie mit EGFR-Inhibitoren kommt es bei der Mehrzahl der behandelten Patienten (> 90%) zu charakteristischen Hauterscheinungen[68,69]. In über 50% der Fälle finden sich bereits innerhalb weniger Tage mehr oder weniger stark ausgeprägte juckende, makulo-papulöse bis papulo-pustulöse Exantheme, die als sogenannte „akneiforme" Exantheme bezeichnet werden („*acneiform rash*" oder „*Rash*")[70]. Diese manifestieren sich zumeist innerhalb der ersten zwei Wochen nach Therapieeinleitung als oft follikulär gebundene, erythematöse Papeln und Pusteln, bis hin zu konfluierenden Eiterseen, vorzugsweise in Hautarealen, die eine hohe Dichte an seborrhoischen Talgdrüsen aufweisen, wie etwa die T-Zone des Gesichts oder auch der obere Rumpf. Die für eine klassische *Acne vulgaris* typischen Komedonen zeigen sich bei keinem der Patienten, sodass sich das Exanthem klinisch eher „rosazeaform" als „akneiform" präsentiert (s. Abb. 5, A-H). Dieses Bild wird zusätzlich durch das Auftreten von zentrofazialen Teleangiektasien oder diffusen Begleiterythemen mit periorbitaler Aussparung nach mehrmonatiger Therapiedauer unterstützt. Interessanterweise wird eine positive Korrelation des Schweregrades des papulo-pustulösen Exanthems mit dem therapeutischen Ansprechen der Antitumortherapie beschrieben. Aufgrund des derzeitigen Mangels anderer quantifizierbarer Marker gilt die Schwere des papulo-pustulösen Exanthems neben den EGFR-I induzierten *Paronychien* heute sogar als der wichtigste Prognosefaktor für den Erfolg der Therapie[54,55,68,69].

Die Beurteilung des Schweregrades des EGFR-I Exanthems erfolgt gemäß eines Stufenschemas des National Cancer Institute (NCI), (s. Tab. 2). Dieses definiert fünf Schweregrade, wobei die Schweregrade I und II lokalisierte Exantheme ohne Superinfektion mit nur minimaler Symptomatik, wie Pruritus oder Spannungsgefühl, beschreiben. Diese bedingen meist eine nur geringe Einschränkung der Lebensqualität der Patienten. Schweregradigere Hautveränderungen (Grad III) sind durch ausgeprägtere papulo-pustulöse Exantheme mit Befall von über 30% der Körperoberfläche sowie dem Auftreten lokaler Superinfektionen definiert. Es besteht

eine Indikation zur oralen Antibiose. Pruritus oder Spannungsgefühl sind auch hier möglich, psychosoziale Beeinträchtigungen sind jedoch aufgrund des fortgeschrittenen Befundes gravierender. Schweregrad IV beschreibt eine ausgedehnte Superinfektion mit der Indikation einer intravenösen Antibiose. Lebensbedrohliche Verläufe sind möglich. Der fünfte und letzte Schweregrad geht schließlich mit sehr schweren, generalisierten Hautveränderungen und massiver Superinfektion einher, die infolge z.B. einer Sepsis und/oder Pneumonie letal endet[71].

Vor allem schwere Verlaufsformen EGFR-I assoziierter Hautveränderungen bedeuten eine starke Einschränkung der Lebensqualität und stellen eine Gefahr für die Compliance und das Leben des Patienten dar. Zwar sind die Hautveränderungen nach Dosisreduktion oder gar Absetzten der Immuntherapie reversibel, dieser Schritt sollte allerdings erst nach erfolglosem Ausschöpfen aller dermatologisch Maßnahmen zum Management des Exanthems unternommen werden[68,69,70]. Dieses Management der Hautveränderungen stellt somit eine besondere Herausforderung an den behandelnden Dermatologen dar[72]. Neben der konsequenten Hautpflege mit rückfettenden Externa von Beginn der EGFR-Inhibitor Therapie an, empfiehlt sich eine Therapie mit kombinierten antiinflammatorischen, antiseptischen und antibiotischen Maßnahmen. Hierunter lässt sich in den meisten Fällen eine deutliche Besserung des Hautbefundes und eine uneingeschränkte Fortführung der Immuntherapie erreichen. Eine systemische, gezielte antibiotische Therapie sollte ab Schweregrad III erfolgen um weitere Komplikationen bzw. die Entstehung einer generalisierten Erregerausbreitung in Form einer Sepsis und/oder Pneumonie zu verhindern.

Schweregrad	Hautveränderungen
Grad I	Papeln und/oder Pusteln, < 10 Prozent Körperoberfläche (KOF); Pruritus oder Spannungsgefühl sind möglich
Grad II	Papeln und/oder Pusteln, 10 bis 30 Prozent KOF; Pruritus oder Spannungsgefühl sind möglich; Psychosoziale Beeinträchtigung; Einschränkung von Alltagsaktivitäten

Grad III	Papeln und/oder Pusteln, > 30 Prozent KOF; Pruritus oder Spannungsgefühl sind möglich; Psychosoziale Beeinträchtigung; Einschränkung der Eigenversorgung; lokale Superinfektionen mit der Indikation einer oralen Antibiose
Grad IV	Papeln und/oder Pusteln mit ausgedehnter Superinfektionen mit der Indikation einer i.v. Antibiose; lebensbedrohliche Verläufe
Grad V	Tod

Tabelle 2: Einteilung der Schweregrade des EGFR-I assoziierten Exanthems nach Empfehlungen des amerikanischen National Cancer Institute[71]

Neben den charakteristischen papulo-pustulösen Exanthemen zeigen sich bei vielen Patienten teils ausgeprägte und schmerzhafte *Paronychien* im Bereich der Finger oder Zehen. Ferner kommt es zu einer Veränderung der Nagelstruktur mit erhöhter Brüchigkeit und Verfärbungen (s. Abb. 6, A-C)[73,66].

In seltenen Fällen entstehen nach mehrmonatiger Therapie mit EGFR-I auch Nebenwirkungen an Haaren und Kopfhaut. Ein verstärktes Längenwachstum mit Kräuselung von Augenbrauen und Wimpern (*Trichomegalie*) bei gleichzeitig gesteigerter Brüchigkeit (*Trichorhexis*) derselben sind zu erwarten. Entzündliche Veränderungen der Kopfhaut können zu einer diffusen, nicht vernarbenden *Alopezie* führen[18,66].

Abbildung 5: Kutane Nebenwirkungen mit Superinfektion unter EGFR-Blockade
(A-D) Charakteristische papulo-pustulöse Exantheme im Gesicht, am Rücken und Dekolleté eines 60-jährigen Patienten unter Erlotinib-Therapie. (E) Schweres periorales Exanthem mit entzündlichen, konfluierenden Pusteln bei einem 55-jährigen Patienten unter Cetuximab-Einnahme. (F,G,H,I) Generalisiertes papulo-pustulöses Exanthem bei einem 51-jährigen Patienten unter Erlotinib-Therapie.

Abbildung 6: EGFR-I induzierte Hautatrophie und Paronychie der Zehen (A-C)
(A-C) Schmerzhafte Paronychien der Zehen beidseits bei einer 53-jährigen Patientin unter Erlotinib-Therapie. Die Paronychien entwickelten sich ca. drei Wochen nach Einleitung der EGFR-I Therapie.

Die abgebildeten Patienten befanden sich in Behandlung durch die Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass das EGFR-I induzierte Exanthem nicht steril ist. So kommt es bei ca. einem Drittel der Patienten im Verlauf der Behandlung zu einer sekundären bakteriellen Infektion des Exanthems. Lacouture et al. wiesen in einer Studie mit 221 EGFR-I behandelten Patienten eine *S. aureus* Infektion bei 28% der Patienten nach. In seltenen Fällen ließen sich auch *Dermatophyten* (ca. 10%), *Herpes simplex* Viren (3%) und *Herpes Zoster* Viren (2%) nachweisen. Oft zeigten sich auch polymikrobielle Besiedlungen in den seborrhoischen Regionen, wobei auch hier *S. aureus* immer vertreten war[66,102].

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Als häufigste unerwünschte Nebenwirkung kommt es bei Patienten unter Therapie mit EGFR-Inhibitoren zu charakteristischen kutanen papulo-pustulösen Exanthemen. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass diese Eruptionen steril seien, zeigen aktuelle Studien und eigene klinische Beobachtungen, dass es bei über der Hälfte der untersuchten Patienten im Verlauf der EGFR-I Behandlung zu einer sekundären bakteriellen Besiedlung bzw. Superinfektion der Hautveränderungen kommt. Als mit Abstand häufigster Erreger wird hier *S. aureus* nachgewiesen[68,70]. Zudem finden sich in der Literatur viele Berichte über die Entstehung gravierender, systemischer Infektionen mit teils letalem Ausgang. So sind etwa die Entstehung einer Sepsis oder die Entwicklung von Pneumonien bei Patienten unter EGFR-I Therapie beschrieben. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Behandlung mit EGFR-I eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber bakteriellen Infektionen verursacht. Bis heute sind die zellulären und molekularen Mechanismen, die zu dieser Beeinträchtigung führen weitestgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu analysieren, ob durch EGFR-Inhibition mögliche zelluläre und molekulare Mechanismen einer gestörten antimikrobiellen Abwehr resultieren.

Bei der Durchführung dieser Arbeit standen somit insbesondere folgende Fragen/Ziele im Vordergrund:

1. Ist eine erhöhte Suszeptibilität für kutane Infektionen unter Therapie mit EGFR-Inhibitoren auf eine unmittelbare Arzneimittelnebenwirkung zurückzuführen oder besteht diesbezüglich keine Kausalität?
2. Entwicklung eines Modells zur Pathogenese bakterieller Infektionen im Rahmen einer EGFR-Inhibitor Therapie.

Ergebnisse dieser Arbeit sollen den Nachweis erbringen, dass kutane infektiöse Komplikationen kausal und unmittelbar durch EGFR-I verursacht werden und nicht Zufallsereignisse darstellen oder als eine Koinzidenz durch Tumor-/Chemotherapie-assoziierte Faktoren, wie etwa eine gestörte Immunkompetenz der oft geschwächten Patienten, zu interpretieren sind.

Gewonnene Erkenntnisse könnten als Grundlage zur Entwicklung neuer pathogenese-orientierter Behandlungsstrategien bei Patienten mit kutanen Nebenwirkungen unter EGFR-I Therapie dienen.

Nicht zuletzt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zum besseren Verständnis der zentralen Funktion des EGFR für die Homöostase des Hautorgans und der zellulären Immunabwehr dienen. Beobachtungen im Organsystem Haut mögen modellhaft dem besseren Verständnis EGFR-I assoziierter Komplikationen in anderen Organsystemen, wie etwa dem Magen-Darm-Trakt, dienen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien/ Bakterien

Humane Keratinozyten	aus Biopsiematerial (Mamma-Reduktionen) der Klinik für Plastische Chirurgie in Düsseldorf-Kaiserswerth
Staphylococcus aureus	Patientenstamm, bereitgestellt von Prof. Dr. C. MacKenzie, Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

ABI Prism 7000	Quantitatives Real-time PCR Gerät, Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarplatten	Columbia Agar + 5% Hammelblut, Biomérieux, France
Brutschrank	HERAcell 240, Heraeus, Deutschland
Eppendorf Multikanalpipette	Eppendorf Research 8-Kanal, mechanisch, [8-Kanal: 100 µl, 10 µl] Webers GmbH, Bottrop, Deutschland
Eppendorf Pipetten	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland [1 ml;1,5 ml; 2 ml]
Falcon-Tubes	Greiner-lab.com, Deutschland [15 ml, 50 ml]
Finn-Pipetten	Thermo Scientific, Heroldsberg, Deutschland [1000 µl, 500 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl]

PCR-Maschine	Mastercycler gradient, Eppendorf
Photometer	TECAN Spectra Rainbow, Crailsheim, Deutschland
Memmerl Inkubator	Memmerl, Schwabach, Deutschland
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Sterilbank	HBB 2472 S, Heraeus, Hanau, Deutschland
Sterile Kulturplatten	(6-, 96-Loch) Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Thermocycler	Biometra TRIO-Thermoblock / Biometra Heated Lid, Biometra, Göttingen, Deutschland
Tubes	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Vortex	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Sorvall RC-5B Refigerated Superspeed Centrifuge / Sorvall SA-600 Rotor, Sorvall
Zellkulturflaschen, 175 cm^2	Costar, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Zellkultur-Inkubator	Memmerl, Schwabach, Deutschland

3.1.3 Reagenzien, Chemikalien, Puffer

Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
DEPC H20	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Genspezifische TaqMan Sonde	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Genspezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Oligio-dT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Puffer	PAA, Pasching, Österreich
Random Haxamer	Promega, Mannheim, Deutschland
RNAse-Inhibitor	RNAsin, Roche, Mannheim, Deutschland
RNAseZap	Ambion, Austin, USA
RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TaqMan®	
-18SRNA spezifische Sonde	Applied Biosystems, Foster City, USA
-18SRNA spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer	
-SYBR-Green Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
-Universal Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Alle weiteren hier nicht einzeln aufgelisteten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen.

3.1.4 Zellkulturmedien

Keratinocyte-SFM	Invitrogen, Gibco®, Karlsruhe, Deutschland
Keratinocyte-SFM-Kit	Invitrogen, Gibco®, Karlsruhe, Deutschland
PAN-Medium	RPMI 1640, Biotech GmbH, Deutschland
L-Tryptophan	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	Invitrogen, Gibco®, Karlsruhe, Deutschland
IL-1β	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
TNF-α	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA

3.1.5 Inhibitoren

Tyrphostin AG 1478	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Cetuximab (Erbitux®)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Erlotinib (Tarceva®)	Roche, Mannheim, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur: Anzucht von Keratinozyten aus Biopsaten

Für die Arbeit wurden ausschließlich humane primäre epidermale Keratinozyten verwendet, die aus Mammareduktions-Exzidaten isoliert wurden. Die Hautproben wurden dazu in ca. 0,5 cm große Stücke geschnitten, in PBS gewaschen und dann für 12 h über Nacht mit Dispase (Roche) bei 4°C inkubiert. Die Epidermis konnte so anschließend am Morgen im Wasserbad nach vorhergehender Inkubation mit Trypsin/EDTA über 30 min und kräftigem Schütteln von der Dermis gelöst werden. Daraufhin erfolgte ein kurzer Waschvorgang mit PBS und die Aufnahme durch ein Sieb in ein neues Falcon® Tube. Das Falcon® Tube wurde 10 min bei 1.000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 175 cm² große Plastikkulturflaschen überführt und mit spezifischen Wachstumsmedien für Keratinozyten (Keratinocyte-SFM-Kit von Gibco®, Invitrogen) nach Protokollen des Herstellers kultiviert, wobei hier immer bewusst auf die Zugabe von Antibiotika verzichtet wurde. Alle Kultivierungen fanden in einem Memmert Inkubator bei 37°C, 5% CO2-Partialdruck und einer Humidität von 95% statt.

3.2.2 Passagierung der Zelllinien

Zur Passage wurden die maximal 80% konfluent gewachsenen Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit EDTA/Trypsin inkubiert, damit sich die Keratinozyten vom Flaschenboden lösen. Nach Ablösung der Zellen wurden diese in einer Verdünnung von 1:10 in 6-Well-Platten ausgesät und mit frischem Kulturmedium (Kera-SFM-Medium von Gibco mit Glutamin-, EGF Human Rekombinant- und Bovine Pitutary Extract-Zusatz) und ohne Zugabe von Penicillin/Streptomycin versorgt. Zwischen den Passagen erfolgte routinemäßig in dreitägigem Rhythmus ein Austausch des Kulturmediums.

3.2.3 Stimulierung der Zelllinien

Für Experimente wurden die Keratinozyten in den 6-Loch-Platten bis zu einer Konfluenz von 60% - 80% herangezogen und entweder mit oder ohne TNF-α (10 ng/ml) und IL-1β (5 ng/ml) behandelt. Des Weiteren wurden die Zellen mit einem EGFR-Inhibitor in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Behandlungen erfolgten zum einem mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin AG 1478 (30 nM, 500 nM, 1000 nM) und zum anderen dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (30 nM, 500 nM, 1000 nM) oder zum anderen mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab (15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml).

Die so behandelten Keratinozyten wurden für 24 Std. im Brutschrank bei 37°C (Memmert-Inkubator) kultiviert. Anschließend wurden jeweils 100 µl in Keratinozyten-Medium (Keratinocyte-SFM-Kit) verdünnte L-Tryptophan-Lösung (5 µg/ml) und jeweils 100 µl in PAN-Medium verdünnte Bakterien-Suspensions-Lösung (1:10^5 /ml) in jede 6-Loch-Platte überführt.

Zur Herstellung der Bakterien-Suspensions-Lösung wurde eine *S. aureus*-Kolonie von einem Patientenstamm mit einer sterilen Öse auf eine Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 bebrütet. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie dieser Platte in 1 ml PAN-Medium (Bakterienmedium ohne L-Tryptophanzusatz) überimpft und zu einer Endkonzentration von 1:10^5 verdünnter Bakterien-Suspensions-Lösung seriell verdünnt. Von dieser wurden dann je 100 µl zu den stimulierten Zellkulturen zugegeben.

Die so behandelten 6-Loch-Platten wurden für 24 Std. im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2-Partialdruck und einer Humidität von 95% kultiviert.

3.2.4 Optische Dichte Messung (OD)

Das Bakterienwachstum in den Zellkulturüberständen wurde zunächst mittels optischer Dichte Messung (OD) berechnet. Durch den Vergleich der OD von Bakterien in reinem Medium mit der OD von Bakterien in den einzelnen Versuchsüberständen wurde die ungefähre Bakterienkonzentration in den einzelnen Versuchsüberständen ermittelt.

Hierfür wurde der Überstand in den 6-Loch-Platten nach Ablauf der 24 Std. zunächst mit einer Pipette (200 µl) vorsichtig durchmischt. Zur Messung der optischen Dichte des Überstandes wurden jeweils 3 x 200 µl/Loch des Kulturüberstandes aus den 6-Loch-Platten in 96-Loch-Platten überführt. Dann erfolgte die photometrische Messung der Bakteriendichte in den Zellkulturüberständen mit dem Photometer (TECAN, Spectra Rainbow) bei einer Wellenlänge von 620 nm.

3.2.5 Bestimmung der Anzahl Koloniebildender Einheiten (KBE)

Zur genaueren Bestimmung der Anzahl der Bakterien in den unterschiedlich vorbehandelten Zellüberständen wurden Koloniebildende Einheiten (KBE) aus den Überständen angezüchtet. Diese ermöglichen eine genauere und empfindlichere Quantifizierung der Bakterienanzahl auf kulturellem Weg.

Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der Überstände aus den einzelnen stimulierten Zellkulturen durchgeführt. Dabei wurden aus den 96-Loch-Platten aus denen durch Messung der optische Dichte die ungefähre Bakterienkonzentration bekannt war, nach voriger Durchmischung je 10 µl Überstand pro Loch entnommen und eine 1:10 bis $1:10^8$ Verdünnung in PBS in Mikrotiterplatten angefertigt. Danach wurden 10 µl jeder Verdünnung auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und alle Platten über Nacht bei 37°C und 5% CO_2-Partialdruck im Brutschrank bebrütet. Die Auszählung der Bakterienkolonien erfolgte 18 bis 24 Std. später.

3.2.6 Berechnung der zytotoxischen Aktivität

Die zytotoxische Aktivität (%) in den jeweiligen Überständen wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet[74]:

Zytotoxische Aktivität (%) = [1 –(KBE behandelte Kultur) ÷ (KBE Kontrollkultur)] x 100

3.2.7 RNA-Extraktion aus Keratinozyten

Die Extraktion von Gesamt-RNA wurde mit Trizol (Invitrogen), einem Ein-Phasen-Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, durchgeführt. Dazu wurden die auf dem Boden der 6-Loch-Platten verbliebenen Zellen (Keratinozyten) nach Entfernen des Kulturüberstandes in 1 ml Trizol aufgenommen. Nach Zugabe von je 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol wurden die Proben 15 min lang bei 13.000 rpm, 4°C

(Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge mit Sorvall SA-600 Rotor) zentrifugiert. Die obere, wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein sauberes Gefäß übernommen, die Interphase mit genomischer DNA und die proteinhaltige, rötliche Phenolphase wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde mit Isopropanol versetzt und die Nukleinsäure über Nacht bei -80°C gefällt.

Der Ansatz wurde am nächsten Morgen 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Pellet im Röhrchen wurde mit 1,5 ml 80% Ethanol von Salzen gereinigt und nach einer weiteren Zentrifugation (15 min bei 13.000 rpm und 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl DEPC-behandeltes H_2O aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

3.2.8 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung und Qualitäts-Kontrolle

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der Absorption im Bereich von 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Spektralphotometer. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook[75] berechnet. Für hochmolekulare DNA entspricht eine Absorption A260 von 1 genau 50 µg DNA/ml, für RNA 40 µg RNA/ml.

3.2.9 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA in cDNA wurden 4 µg RNA in einer Mischung von 10 µl DEPC-H2O mit 1 µl DNAseI, 1,5 µl 5x RT-Buffer, 1 µl RNAse-Inhibitor (RNAsin) und 2,5 µl DEPC-H2O für 20 min bei 37°C und weitere 10 min bei 70°C im Thermocycler behandelt. Nach Zugabe von 3,6 µl Oligo dT und 0,4 µl Random Hexamer folgten 10 min Inkubation bei 70°C im Thermocycler, das Annealing erfolgte auf Eis. Nach Zugabe von 4,5 µl 5x-Puffer, 1,5 µl dNTP, 1 µl DTT und 1 µl RNAsin erfolgte eine Inkubation im Thermocycler für 2 min bei 42°C. RNAsin und DTT werden zur Inhibierung von RNAsen zu den Reaktionsansätzen gegeben.

Die eigentliche reverse Transkription erfolgte nach Zugabe von 2 µl Superscript II für 50 min bei 42°C und weitere 10 min bei 70°C im Thermocycler. Abschließend wurde basierend auf der RNA-Konzentrationsmessung vor der RT-PCR eine Konzentration von 10 ng/µl RNA eingestellt.

3.2.10 Quantitative Realtime-PCR

Quantitative Realtime-PCR-Experimente wurden mit einem ABIPrism 7000 durchgeführt. Die Realtime-PCR wurde nach der TaqMan®-Methode durchgeführt, bei der zusätzlich zu den beiden spezifischen Primern zur Amplifikation der cDNA ein dritter Primer (Probe-Primer) eingesetzt wird. Dieser bindet auf der cDNA zwischen den Erkennungssequenzen der spezifischen Vorwärts (3') - und Rückwärts (5') - Primer. Durch Freisetzung eines an den Probe-Primer gebundenen Farbstoffs während der Polymerisation des PCR-Produktes durch Abbau des Probe-Primers kann die Menge an PCR-Produkten indirekt in Echtzeit gemessen werden.

Die PCR-Reaktion wurde im TaqMan® Universal PCR Master Mix durchgeführt. In Anwesenheit von 12,5 µl TaqMan® Universal Master, 0,625 µl genspezifischer TaqMan® Probe, 0,5 µl genspezifischer Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 0,5 µl DEPC-H2O wurden 25 ng cDNA amplifiziert. Zur internen Positivkontrolle wurden je 0,125 µl 18S RNA-spezifische Sonde und Primer eingesetzt. Als genspezifische Sonden wurden FAM-markierte Oligonukleotide eingesetzt. Alternativ wurden 25 ng cDNA mit genspezifischen Primerpaaren und SYBR-green Mastermix amplifiziert, wobei 2,5 µl eines 2 µM Primermix und 12,5 µl SYBR-green Mastermix zusammen mit 25 ng cDNA in 10 µl H_2O verwendet wurden.

Folgende Reaktionstemperaturen wurden gewählt: 50°C für 2 min, 95°C für 10 min und 40 Wiederholungen 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 min. Die Expression des Zielgens wurde nach der Expression der 18S RNA normalisiert, um die einzelnen Proben vergleichen zu können. Die Analyse wurde nach den Richtlinien von Applied Biosystems durchgeführt (Applied Biosystems, 2004).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Wirkung von EGFR-Inhibitoren auf das Wachstum von *S. aureus* in Zellkulturüberständen

Primäre humane Keratinozyten wurden wie unter 3.2.3 beschrieben sowohl in An- als auch in Abwesenheit von TNF-α (10 ng/ml) und IL-1β (5 ng/ml) jeweils mit einem EGFR-Inhibitor in drei aufsteigenden Konzentrationen inkubiert.

Aus den inkubierten Zellkulturüberständen wurden nach Zugabe einer definierten Konzentration von *S. aureus* nach 24 Std. KBE durch Beimpfung von Agarplatten generiert (vgl. Kap. 3.2.5). Änderungen der Bakterienkonzentration in den Überständen wurden durch Photometrie (Abschnitt 4.1.1.) sowie durch Auszählung der KBE (Abschnitt 4.1.2.) quantitativ erfasst.

4.1.1 Darstellung Koloniebildender Einheiten (KBE) über Photometrie

4.1.1.1 Effekt von Tyrphostin AG1478 auf das Wachstum von *S. aureus*

Unter Zugabe des EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors Tyrphostin AG1478 zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Dosis und zytotoxischer Aktivität von *in vitro* Überständen primärer humaner Keratinozyten gegen *S. aureus*.

Bei Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (TNF-α, IL-1β) ließ sich für die Versuchsreihe mit der niedrigsten Tyrphostinkonzentration von 30 nM im Vergleich zur Kontrollkultur keine signifikante Zunahme der Bakterienkolonien erkennen. Bei steigender Inhibitorkonzentration war jedoch ein Wachstum der Bakterien im Überstand deutlich erkennbar. Unter Zugabe der höchsten Inhibitorkonzentration (1000 nM) zeigte sich schließlich ein hochsignifikant gesteigertes Bakterienwachstum im Vergleich zur Kontrollkultur (***, $P < 0{,}001$)(Abb. 7).

Bei zusätzlicher Gabe der proinflammatorischen Zytokine TNF-α (10 ng/ml) und IL-1β (5 ng/ml) zeigte sich keine signifikante Vermehrung von *S. aureus* Kolonien bei steigender Inhibitorkonzentration (Abb. 7).

Die An- oder Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine bewirkte einen signifikanten (*, $P<0{,}05$) Unterschied in der Anzahl der *S. aureus* Kolonien in den

Überständen bei jeweils gleicher Inhibitorkonzentration sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei der niedrigsten Konzentration von Tyrphostin AG1478 von 30 nM.

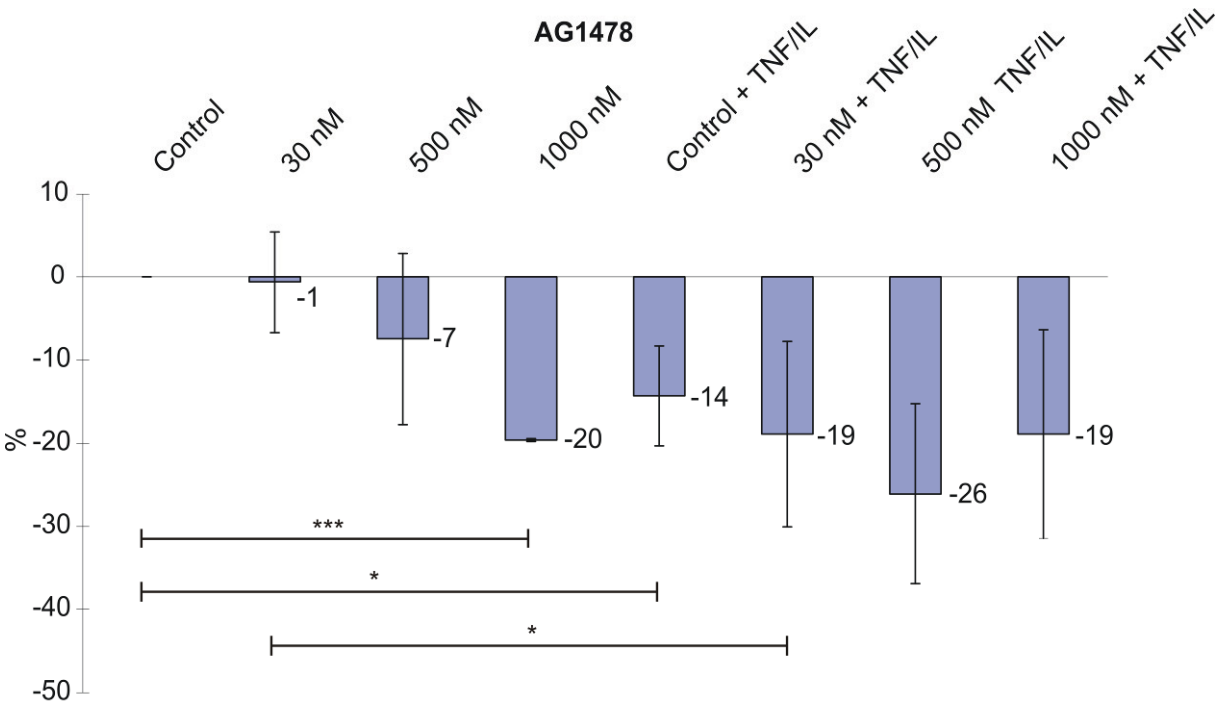


Abbildung 7: AG1478 supprimiert die zytotoxische Aktivität humaner Keratinozyten gegen *S.aureus*
Relative zytotoxische Aktivität von Zellkulturüberständen primärer humaner Keratinozyten bei An- und Abwesenheit von TNF-α und IL-1ß, welche mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin AG1478 (30 nM, 500 nM und 1000 nM) oder Mediumkontrollen (+ DMSO) behandelt wurden. Zellkulturüberstände wurden mit definierten Konzentrationen von *S. aureus* inkubiert und nach Beimpfung von Kulturplatten KBE bestimmt. Abgebildet sind Mittelwerte ± Standard-Abweichungen der relativen zytotoxischen Aktivität aus drei Messungen (n=3) eines repräsentativen Experiments mit Tyrphostin AG1478 von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Student´s t-Test: *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001. Die relative zytotoxische Aktivität (%) ist definiert als: [1 - (KBE Zellkulturüberstand) / (KBE Kulturmedium)] x 100. [Quelle: Eigene graphische Umsetzung der erhobenen Daten, Juni-Dezember 2008]

4.1.1.2 Effekt von Erlotinib auf das Wachstum von *S. aureus*

Erlotinib hatte auf die Verminderung der zytotoxischen Aktivität der Zellkulturüberstände gegenüber *S. aureus* bei zunehmender Inhibitor-Konzentration einen vergleichbaren Effekt wie AG1478.

Bei Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine nahm die zytotoxische Aktivität mit steigender Erlotinib-Konzentration ab (s. Abb. 8). Ein signifikanter Unterschied (*, P < 0,05) zeigte sich beim Vergleich Kontroll-Medium zur höchsten Konzentration (Control vs. 1000 nM).

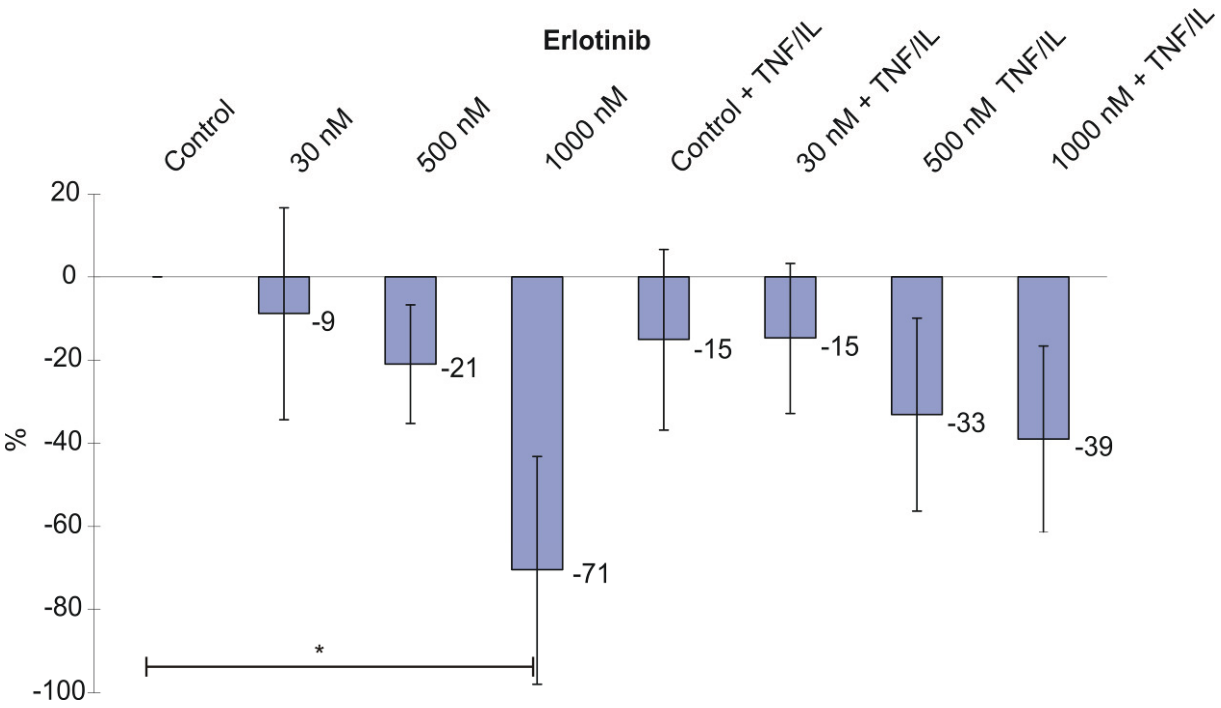


Abbildung 8: Erlotinib supprimiert die zytotoxische Aktivität humaner Keratinozyten gegen *S.aureus*
Relative zytotoxische Aktivität von Zellkulturüberständen primärer humaner Keratinozyten bei An- und Abwesenheit von TNF-α und IL-1ß, welche mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (30 nM, 500 nM und 1000 nM) oder Mediumkontrollen (+ DMSO) behandelt wurden. Zellkulturüberstände wurden mit definierten Konzentrationen von *S. aureus* inkubiert und nach Beimpfung von Kulturplatten Koloniebildende Einheiten bestimmt. Abgebildet sind Mittelwerte ± Standard-Abweichungen der relativen zytotoxischen Aktivität aus drei Messungen (n=3) eines repräsentativen Experiments mit Erlotinib von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Student´s t-Test: *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001. Die relative zytotoxische Aktivität (%) ist definiert als: [1 - (KBE Zellkulturüberstand) / (KBE Kulturmedium)] x 100. [Quelle: Eigene graphische Umsetzung der erhobenen Daten, Juni-Dezember 2008]

Unter Zugabe der proinflammatorischen Zytokine TNF-α (10 ng/ml) und IL-1β (5 ng/ml) zeigte sich zwar die Tendenz einer Abnahme der zytotoxischen Wirkung gegenüber *S. aureus* mit steigender Inhibitorkonzentration ohne jedoch eine statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 8, rechter Teil).

4.1.1.3 Effekt von Cetuximab auf das Wachstum von *S. aureus*

Unter den drei eingesetzten EGFR-Inhibitoren zeigte der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab die quantitativ größte Vermehrung von *S. aureus* Kolonien in den Versuchsüberständen nach Applikation zunehmender Inhibitorkonzentrationen.

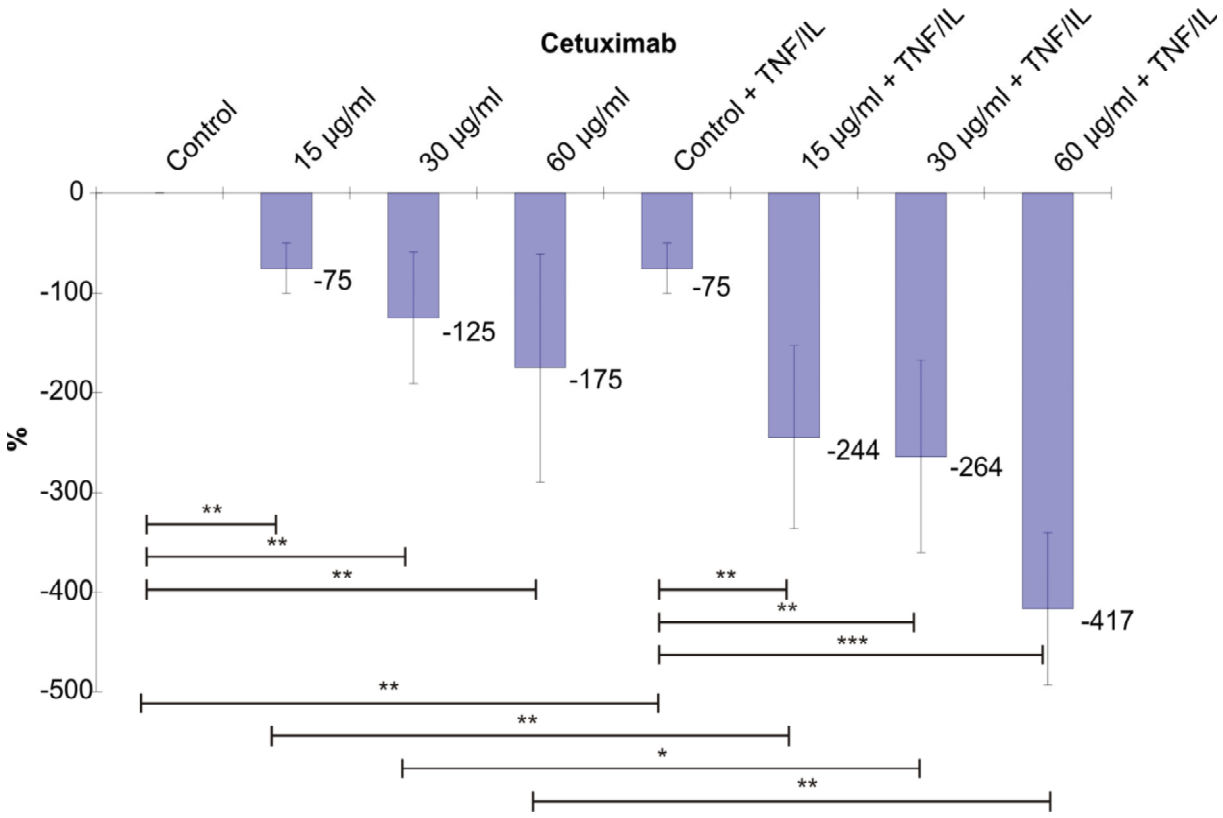


Abbildung 9: Cetuximab supprimiert die zytotoxische Aktivität humaner Keratinozyten gegen *S.aureus*:
Relative zytotoxische Aktivität von Zellkulturüberständen primärer humaner Keratinozyten bei An- und Abwesenheit von TNF-α und IL-1ß, welche mit dem monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab (15 µg/ml, 30 µg/ml und 60 µg/ml) oder Mediumkontrollen (+ DMSO) behandelt wurden. Zellkulturüberstände wurden mit definierten Konzentrationen von *S. aureus* inkubiert und nach Beimpfung von Kulturplatten KBE bestimmt. Abgebildet sind Mittelwerte ± Standard-Abweichungen der relativen zytotoxischen Aktivität aus drei Messungen (n=3) eines repräsentativen Experiments mit Cetuximab von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Student´s t-Test: *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001. Die relative zytotoxische Aktivität (%) ist definiert als: [1 - (KBE Zellkulturüberstand) / (KBE Kulturmedium)] x 100. [Quelle: Eigene graphische Umsetzung der erhobenen Daten, Juni-Dezember 2008]

Bei den Versuchsreihen ohne Zugabe proinflammatorischer Zytokine zeigte sich bereits unter Gabe der niedrigsten Cetuximab-Dosis (15 µg/ml) ein signifikant gesteigertes Wachstum von *S. aureus* im Vergleich zur Kontrollkultur (**, P < 0,01). Ein signifikanter Unterschied war ebenso für die mittlere (**, P < 0,01) und höchste (**, P < 0,05) Dosierung von Cetuximab gegenüber der Kontrollkultur nachweisbar (s. Abb. 9, linker Teil).

Die Durchführung derselben Versuche mit Cetuximab bei zusätzlicher Anwesenheit der proinflammatorischen Zytokine TNF-α (10 ng/ml) und IL-1β (5 ng/ml) führte ebenfalls zu signifikanten Vermehrungen der *S. aureus* Kolonien bei steigender Inhibitorkonzentration (Abb. 9, rechter Teil). Hier ist die Bakterienvermehrung sowohl

im Vergleich zum Kontrollmedium als auch im Vergleich zu den Versuchen ohne Zytokine signifikant stark ausgeprägt.

Bei jeweiliger Konstanz der Inhibitorkonzentration zeigte sich eine signifikante Differenz in der Anzahl von *S. aureus* Kolonien im Überstand in Anwesenheit im Vergleich zur Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (s. Abb. 9, unterer Teil). Auch dieser Effekt war in diesem Ausmaß nur bei den Versuchen mit Cetuximab feststellbar und war in dieser Form bei Tyrphostin AG1478 nur zum Teil und bei Erlotinib gar nicht zu beobachten.

4.1.1.4 Vergleich der zytotoxischen Wirkung der EGFR-Inhibitoren

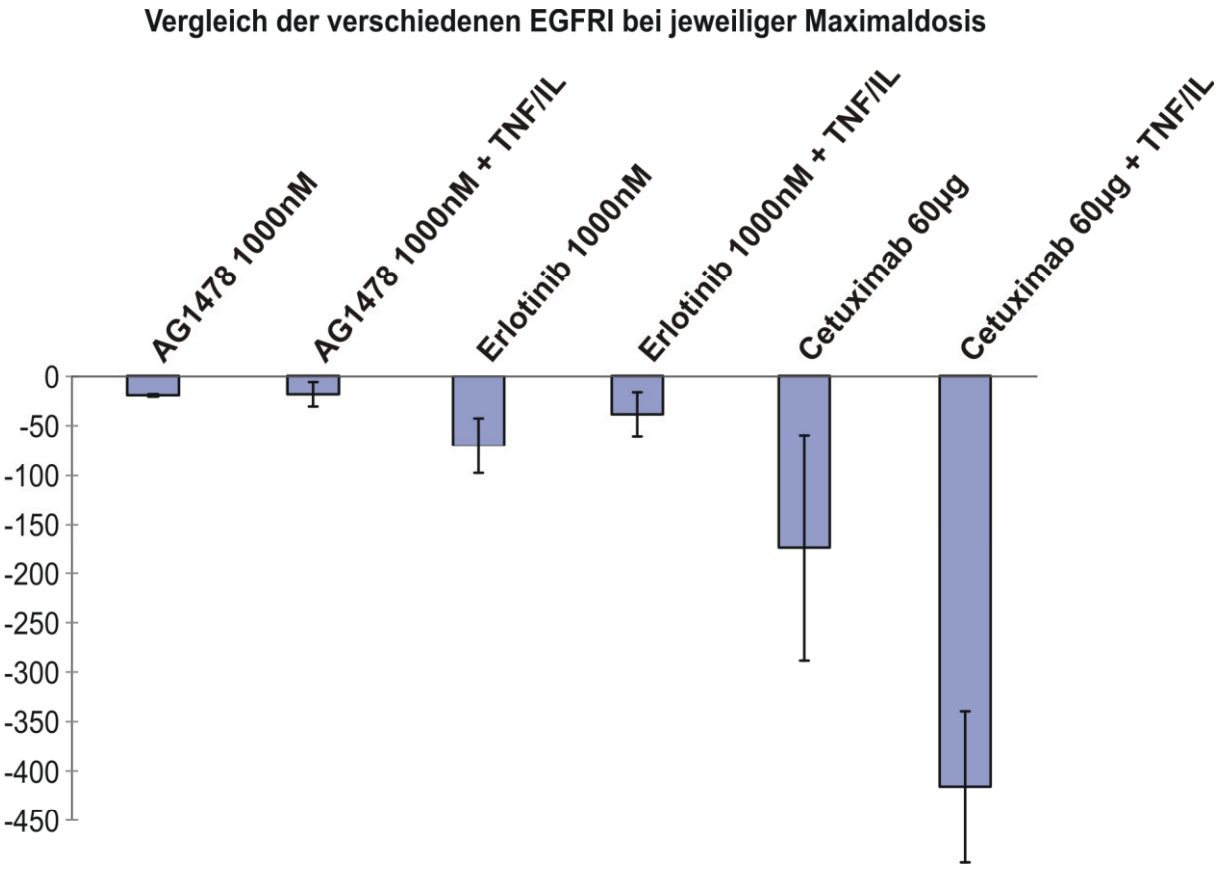


Abbildung 10: Cetuximab supprimiert am stärksten die zytotoxische Aktivität humaner Keratinozyten gegenüber *S.aureus* im Vergleich zu AG1478 und Erlotinib: Relative zytotoxische Aktivität von Zellkulturüberständen primärer humaner Keratinozyten bei An- und Abwesenheit von TNF-α und IL-1ß für die jeweilige Maximaldosierung der drei getesteten EGFR-I [Quelle: Eigene graphische Umsetzung der erhobenen Daten, Juni-Dezember 2008]

In Abbildung 10 sind in Anlehnung an die Abbildungen 7, 8 und 9 die zytotoxischen Wirkungen der EGFR-I inkubierten Zellkulturüberstände vergleichend aufgetragen.

Abgesehen vom Vergleich des Einflusses verschiedener EGFR-I auf die relativen zytotoxischen Aktivitäten im Vergleich zu den jeweiligen Medium-Kontrollen, zeigt auch eine Analyse des absoluten zytotoxischen Effektes der jeweils höchsten Inhibitor-Konzentration ein interessantes Bild. So findet sich im direkten Vergleich der Tyrosinkinaseinhibitoren mit dem Antikörper eine sehr stark ausgeprägte Inhibierung der zytotoxischen Wirkung gegen *S. aureus* unter Cetuximab Maximaldosierung gegenüber den anderen beiden untersuchten EGFR-I ebenfalls bei jeweiliger Maximaldosierung. Besonders auffällig ist die Unterdrückung des zytotoxischen Effektes unter Zugabe von TNF-α und IL-1β in den mit Cetuximab in Maximaldosis inkubierten Zellkulturüberständen.

4.1.2 Darstellung Koloniebildender Einheiten (KBE) über Verdünnungsreihen

Die Bakteriendichte im Überstand der stimulierten Keratinozyten wurde mittels Photometer gemessen (s. Abschnitt 4.1.1). Im Anschluss wurden zur verifizierenden Bestimmung der Anzahl der *S. aureus*-Kolonien die Koloniebildenden Einheiten (KBE) in Verdünnungsreihen derselben Überstände ausgewertet.

4.1.2.1 KBE Medium und Tyrphostin AG 1478 (1000 nM)

Es wurden Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-8} der Überstände aus den einzelnen stimulierten Zellkulturen angesetzt. Zur Darstellung dieser zusätzlichen Agarplatte mit Medium und Tyrphostin AG1478 (1000 nM) wurden zusätzlich aus den Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-7} je 10 µl Überstand aus der Medium-Kontrollkultur und der 1000 nM-Tyrphostin AG1478-Kultur jeweils einzeln auf eine weitere Blutagarplatte pipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank ließ sich hier eine quantitative Bakterienzunahme in der mit Tyrphostin AG1478 (1000 nM) behandelten Zellkultur um mehr als eine Potenz erkennen (s. Abb. 11).

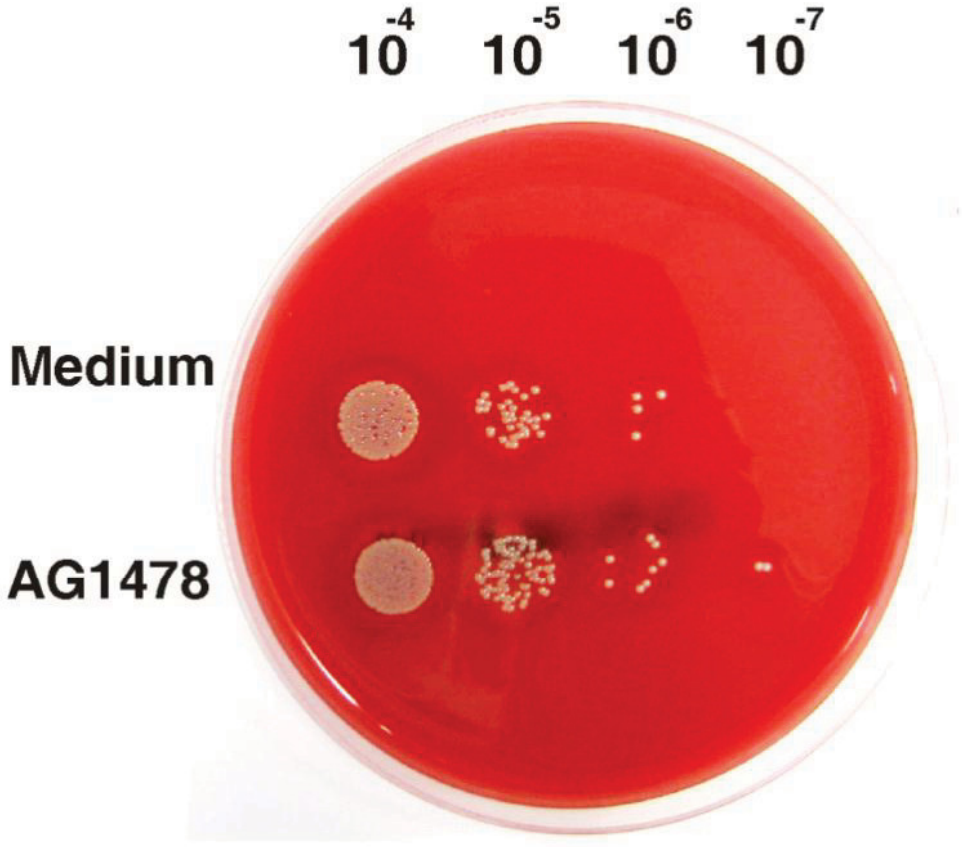


Abbildung 11: KBE Medium und Tyrphostin AG 1478 (1000 nM)
Kulturplatte nach Beimpfung mit verschiedenen *S. aureus*-Zellsuspensionen aus den Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-7} der 1000 nM-Tyrphostin AG1478-Kultur sowie aus der Medium-Kontrollkultur. KBE entsprechen der Summe einzelner Kolonien pro Impfareal. [Quelle: Eigene Aufnahme, September 2008]

4.1.2.2 KBE Medium und Erlotinib (1000 nM)

Zur Anfertigung dieser Übersichtsplatte wurden Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-8} der Überstände aus den einzelnen stimulierten Zellkulturen angefertigt. Die Verdünnungsreihen 10^{-4} bis 10^{-8} wurden dabei auf eine Extraplatte pipettiert.

Nach 24-stündiger Inkubation dieser Extraplatte im Brutschrank entstand folgendes Bild (s. Abb. 12). Die *S. aureus* Stämme zeigten in der mit Erlotinib (1000 nM) behandelten Zellkultur ein um mehr als eine Potenz vermehrtes Wachstum.

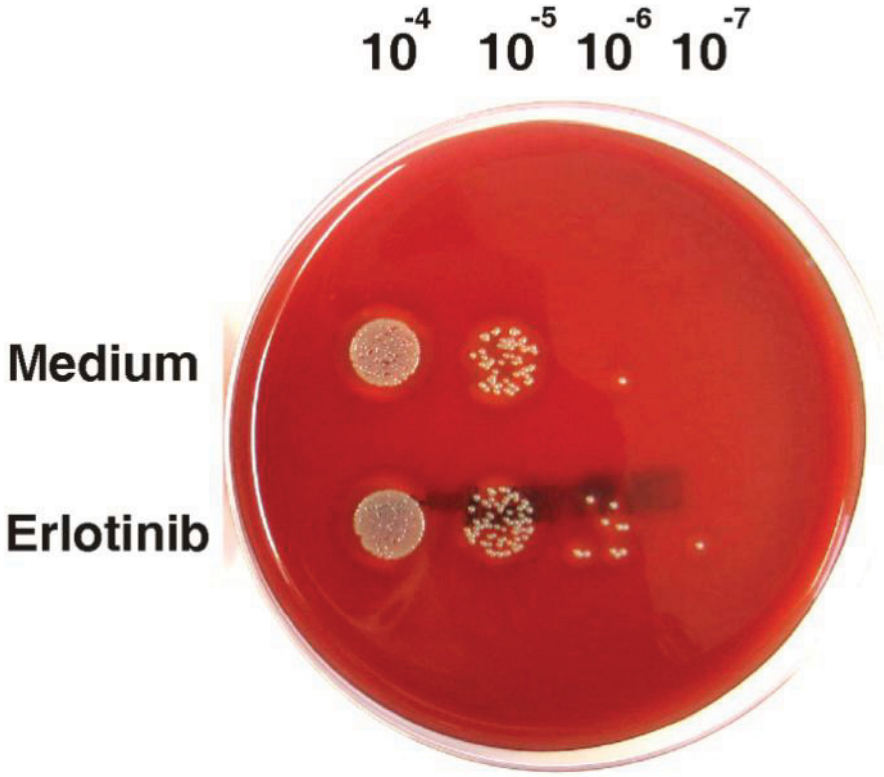


Abbildung 12: KBE Medium und Erlotinib (1000 nM)
Kulturplatte nach Beimpfung mit verschiedenen *S. aureus*-Zellsuspensionen aus den Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-7} der 1000 nM-Erlotinib-Kultur sowie aus der Medium-Kontrollkultur. KBE entsprechen der Summe einzelner Kolonien pro Impfareal. [Quelle: Eigene Aufnahme, September 2008]

4.1.2.3 KBE Medium und Cetuximab (60 µg/ml)

Zur Darstellung dieser Agarplatte mit Medium und Cetuximab (in der höchsten Dosierung 60 µg/ml) wurden zusätzlich aus den Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-7} je 10 µl Überstand aus der Medium-Kontrollkultur und der 60mg/ml -Cetuximab-Kultur jeweils einzeln auf diese pipettiert. Nach analoger Lagerung zu den vorhergegangenen Versuchen (24 h bei 37°C im Brutschrank) präsentierte sich auch unter der mit Cetuximab (60 µg/ml) behandelten Zellkultur ein um mehr als eine Potenz vermehrtes Wachstum (s. Abb. 13).

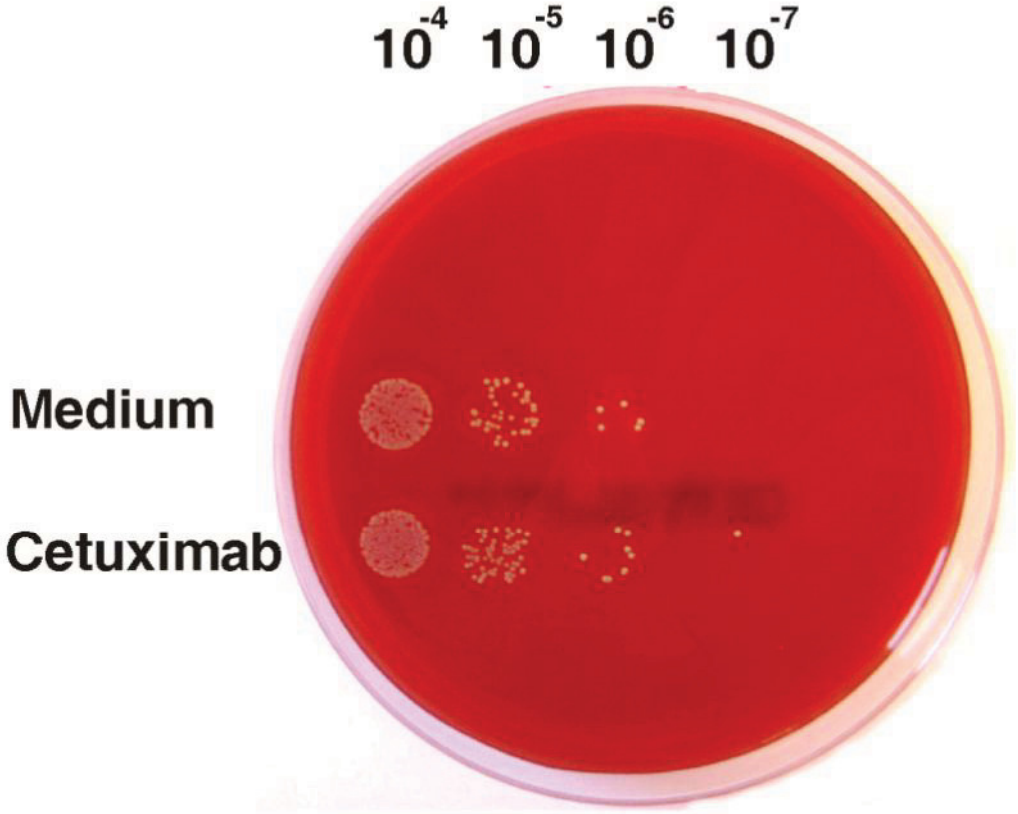


Abbildung 13: KBE Medium und Cetuximab (60 µg/ml)
Kulturplatte nach Beimpfung mit verschiedenen *S. aureus*-Zellsuspensionen aus den Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-7} der 60 µg/ml-Cetuximab-Kultur sowie aus der Medium-Kontrollkultur. KBE entsprechen der Summe einzelner Kolonien pro Impfareal. [Quelle: Eigene Aufnahme, September 2008]

4.1.3 Zusammenfassung der Wirkung von EGFR-Inhibitoren auf das Wachstum von *S. aureus* in den Überständen

Die in diesem Abschnitt dargestellten *in vitro* Analysen belegen signifikante positive Korrelationen zwischen dem Wachstum von *S. aureus* und der Dosierung von EGFR-I (Abb. 7, 8 und 9), gleichbedeutend mit einer negativen Korrelation zwischen applizierter EGFR-I Dosis und zytotoxischer Aktivität. Die zwei Tabellen 3 und 4 fassen die beobachteten Suppressionen der Immunabwehr gegen *S. aureus* zusammen.

Selektiver Einfluss der Inhibitor Konzentration				
	Ohne TNF-α, IL-1β		Mit TNF-α, IL-1β	
Tyrphostin AG 1478		Hochsignifikante Suppression der zytotoxischen Aktivität bei 1000nM		Keine signifikante Suppression der zytotoxischen Aktivität
Erlotinib		Signifikante Suppression der zytotoxischen Aktivität bei 1000nM		Keine signifikante Suppression der zytotoxischen Aktivität
Cetuximab		Starke und signifikante Suppression der zytotoxischen Aktivität schon ab 15 µg/ml		Starke und signifikante Suppression der zytotoxischen Aktivität schon ab 15 µg/ml

Tabelle 3: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses nur der Inhibitorkonzentration
Die Ergebnisse der Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2 zusammenfassende Darstellung der Inhibition der zytotoxischen Wirkung unter Betrachtung nur der Inhibitoren, jeweils für den Fall An- und Abwesenheit von Zytokinen.

In Tabelle 3 ist der Einfluss der Inhibitorkonzentration auf die zytotoxische Wirkung zusammenfassend dargestellt. Selektiv wird die Suppression der Immunantwort gegen *S. aureus* in Abhängigkeit nur von der Inhibitorzugabe dargestellt, jeweils für den Fall der An- bzw. Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine.

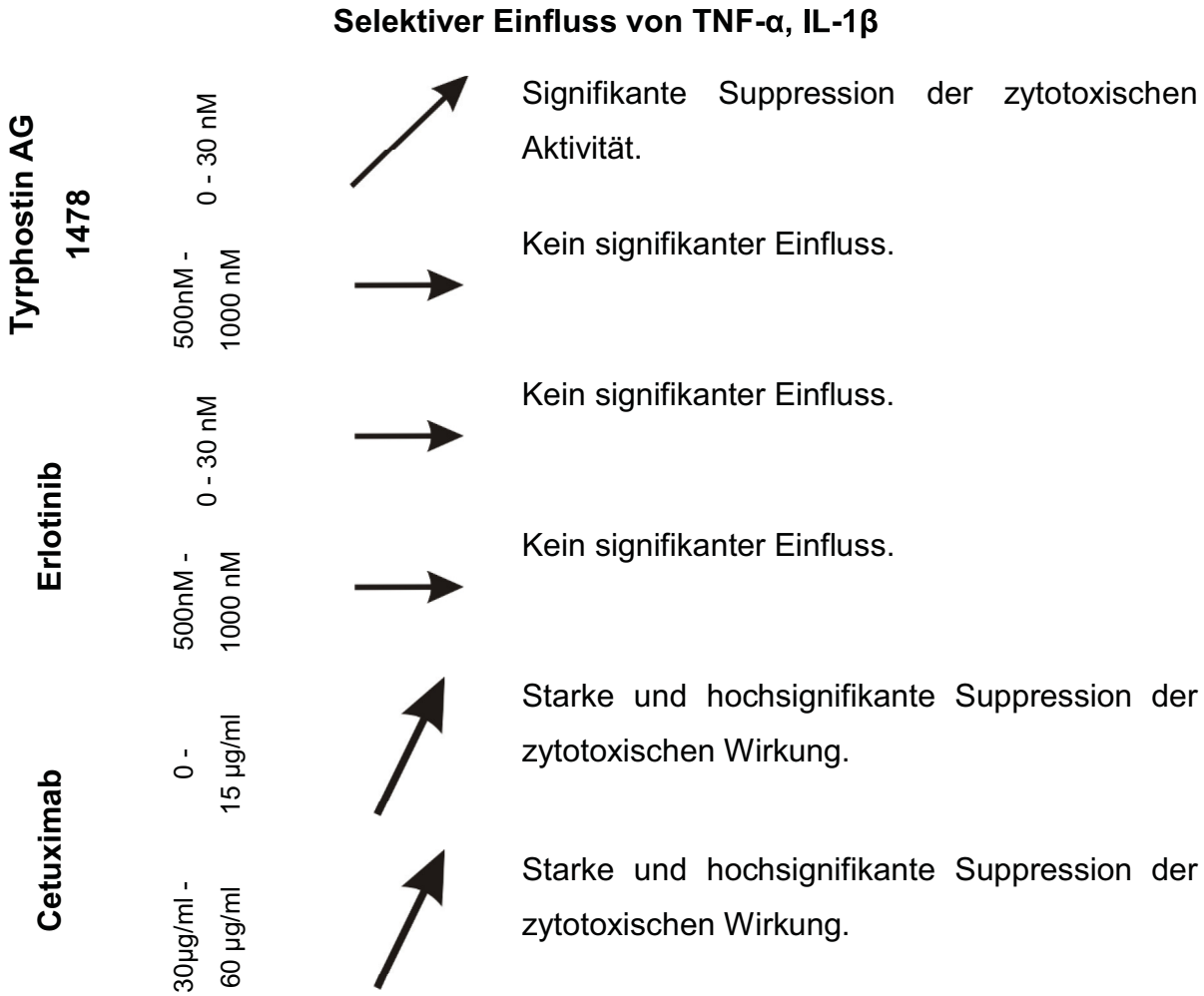


Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses nur der Zytokine
Die Ergebnisse der Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2 zusammenfassende Darstellung der Inhibition der zytotoxischen Wirkung unter Betrachtung nur der An- und Abwesenheit von Zytokinen für den jeweils verwendeten Inhibitor in geringer respektive hoher Dosierung.

Im Gegensatz zu der beobachteten starken Hemmung der zytotoxischen Wirkung durch Cetuximab in schon geringen Konzentrationen ließen sich für die Versuchsreihen der mit Tyrphostin AG1478 und Erlotinib behandelten Keratinozyten bei der jeweils niedrigsten applizierten Dosis an EGFR-Inhibitoren noch keine signifikante Zunahme der Bakterienkolonien erkennen. Erst unter Zugabe der jeweils stärksten Inhibitorkonzentration (1000 nM) präsentierte sich bei Tyrphostin AG1478 und Erlotinib ein signifikantes Bakterienwachstum im Vergleich zur Kontrollkultur (s. Abb. 7 und 8).

Tabelle 4 stellt selektiv den Einfluss der zusätzlichen Applikation proinflammatorischer Zytokine (TNF-α, IL-1β) für den jeweiligen Inhibitor

zusammenfassend dar. Die Zytokine bewirkten nur bei den mit Cetuximab und Tyrphostin AG1478 behandelten Keratinozyten-Zellkulturen einen signifikanten Anstieg der *S. aureus* Konzentration im Überstand. Bei mit Erlotinib behandelten Zellkulturen zeigten sich dagegen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den nicht mit proinflammatorischen Zytokinen behandelten Kulturen (vgl. auch Abb. 7, 8 und 9).

4.2 Untersuchungen zur Expression von AMP unter EGFR-Inhibition in primären humanen Keratinozyten

Um die molekularen und zellulären Mechanismen der erhöhten Suszeptibilität für bakterielle Infektionen bei Patienten unter Therapie mit EGFR-I weiter aufzuklären, wurde zusätzlich die Expression von antimikrobiellen Peptiden (AMP) untersucht. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand entfernt und die auf dem Boden der 6-Loch-Platten verbliebenen Keratinozyten in Trizol aufgenommen um in nachfolgenden Schritten die RNA zu extrahieren und die Expression von AMP zu ermitteln (vgl. 3.2.8 -3.2.10).

Beispielhaft für die drei untersuchten EGFR-I wurde für den Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 die Expression von LL-37/hCAP-18, hBD-1, hBD-2 und hBD-3 untersucht.

Eine signifikante Suppression der Expression von LL-37 durch AG1478 um mehr als 80% war bereits bei geringer Dosierung (30 nM) feststellbar.

Die Expression von hBD-2 wurde bei niedriger Dosierung (30 nM) um ca. 20% und bei hoher Dosierung (1000 nM) um ca. 75% supprimiert.

Die Expression von hBD-3 wurde am stärksten supprimiert. Schon bei 30 nM AG1478 wurde die Expression um mehr als eine Zehnerpotenz vermindert (s. Abb. 14).

Im Gegensatz zu den Defensinen hBD-2 und hBD-3 ließ sich für hBD-1 eine signifikante, dosisabhängige Induktion beobachten (s. Abb. 14). Bereits bei den mit der niedrigen Dosierung (30 nM) inkubierten Keratinozyten wurde die Exprimierung des Defensins verdreifacht.

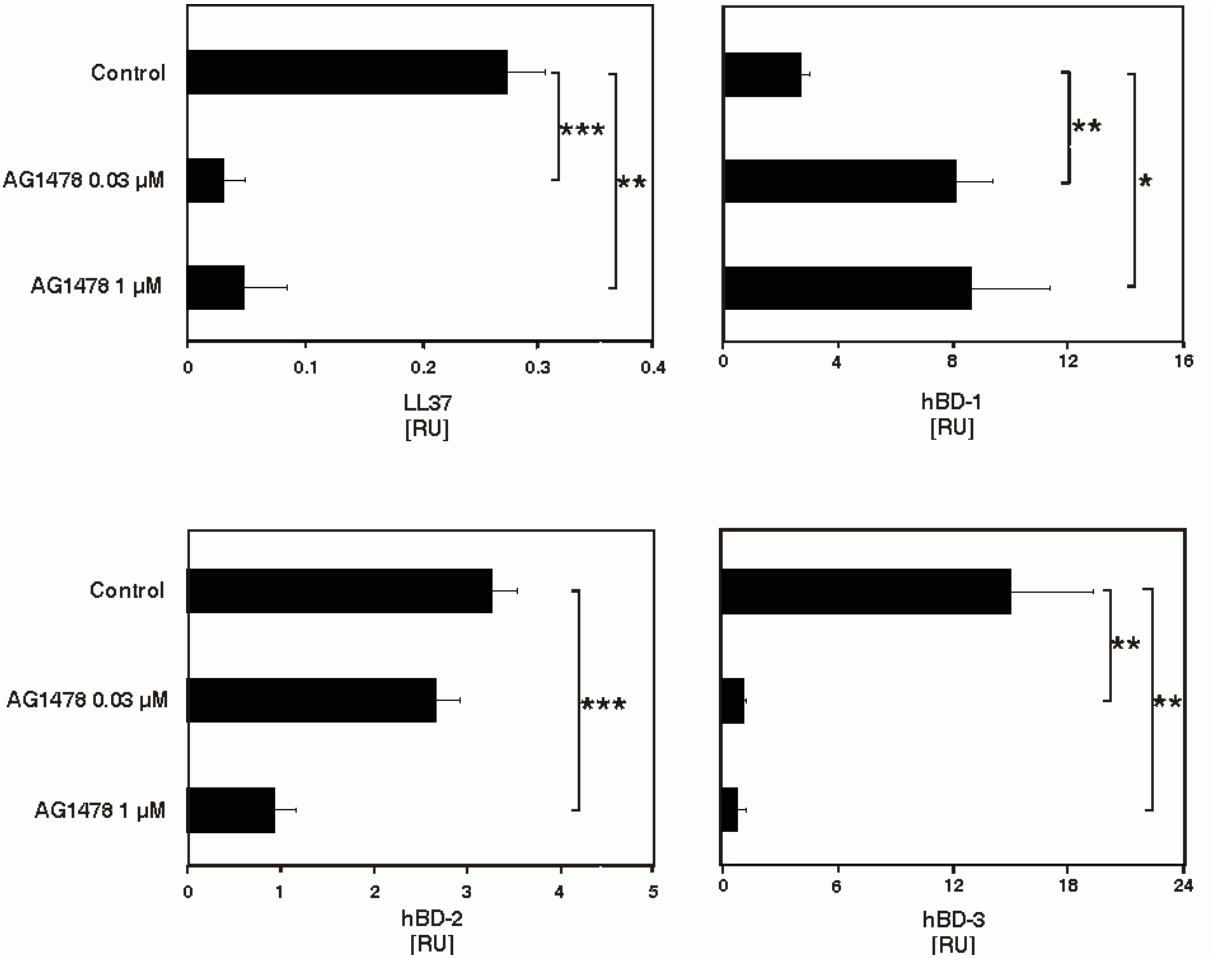


Abbildung 14: Expression AMP unter EGFR-Inhibition
Quantitative Realtime-PCR Analysen von LL37, HBD-1, hBD-2 und hBD-3 in primären humanen Keratinozyten nach Applikation des EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors AG1478 (0,03 µM und 1 µM) oder Mediumkontrollen (+ DMSO) über 24h. Die Ergebnisse zeigen relative Expressionen (RU) der Zielgene im Vergleich zur Expression des 18S Gens. Abgebildet sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten (Student´s t-Test; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

5 Diskussion

5.1 Einfluss von EGFR-Inhibitoren auf das Wachstum von *S. aureus* in *in vitro* Modellen primärer humaner Keratinozyten und die Bedeutung der veränderten AMP Expression

Die drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten EGFR-Inhibitoren reduzierten die zytotoxische Aktivität primärer humaner Keratinozyten gegenüber *S. aureus* signifikant *in vitro.*

5.1.1 Vergleich der Wirkung der drei untersuchten EGFR-Inhibitoren

Der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab unterdrückte in unseren Untersuchungen die zytotoxische Aktivität am stärksten. Hier zeigte sich schon bei niedrigster Konzentration des Inhibitors (15 µg/ml) ein signifikant gesteigertes Wachstum von *S. aureus* im Vergleich zum Kontrollmedium (vgl. Abb. 9). Zur quantitativen Vergleichbarkeit der angewandten Dosierungen des EGFR-Antikörpers Cetuximab und den Dosierungen der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren Tyrphostin AG1478 und Erlotinib liegen jedoch keine Informationen vor. Zu beachten ist auch, dass die jeweils niedrigste Dosierung der Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und AG1478 3% der maximal eingesetzten Dosierung betrug, hingegen die niedrigste Dosierung von Cetuximab bereits 25% der Maximaldosierung darstellte. Die zweithöchste Dosierung ist mit jeweils 50% der Maximaldosierung für alle EGFR-Inhibitoren wiederum vergleichbar.

5.1.2 Einfluss der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β

Bei zusätzlicher Anwesenheit der proinflammatorischen Zytokine TNF-α (10 ng/ml) und IL-1β (5 ng/ml) wurde nur im Versuch mit Cetuximab mit gesteigerter Dosierung auch eine weitere signifikante Verminderung der zytotoxischen Aktivität beobachtet (vgl. Tab. 15). Diese Beobachtungen sind mit Arbeiten von Rodeck[76] sowie Sörensen et al.[77] vereinbar, die jeweils zeigen konnten, dass proinflammatorische Zytokine die EGFR-abhängige Regulation von AMP signifikant beeinflussen. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt jedoch nicht für hBD-3. Die Suppression der *S. aureus* Abwehr durch Zytokinzugabe zeigte sich in allen Versuchen in den Kontrollansätzen mit TNF-α (10 ng/ml) und IL-1β (5 ng/ml) gegenüber den Kontrollansätzen ohne

Zytokinzugabe (Diagramme in Abbildung 7, 8 und 9). Für Erlotinib war der Effekt allerdings nur quantitativ zu beobachten und nicht signifikant. Die Rolle der proinflammatorischen Zytokine wird in der Entwicklung eines Wirkmodells in Abschnitt 5.2 näher betrachtet.

5.1.3 Selektive Blockade bestimmter AMP durch EGFR-Inhibitoren

Expressionsanalysen der antimikrobiellen Peptide LL37, hBD-1, hBD-2 und hBD-3 mit Hilfe quantitativer real-time PCR in behandelten Keratinozyten zeigen, dass durch EGFR-I die Ausschüttung bestimmter antimikrobieller Peptide blockiert wird. Nach Applikation des EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors Tyrphostin AG1478 war in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Versuchsreihen eine dosisabhängige, im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikante Suppression der Expression von LL-37, hBD-2 und hBD-3 nachweisbar (vgl. Abb. 11). Interessanterweise wird insbesondere diesen AMP in der Literatur[77] eine bakteriostatische bzw. bakteriozide Potenz vor allem gegenüber grampositiven Erregern zugeschrieben. Insbesondere hBD-3 zeigt hierbei eine hohe zytotoxische Aktivität gegen *S. aureus*[78]. In Zusammenschau bietet also die in dieser Arbeit beschriebene signifikante Regulation von AMP durch den EGFR eine kausale Erklärung für den klinischen Phänotyp einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber bakteriellen Infektionen unter EGFR-I Therapie, insbesondere mit *S. aureus*. Bezüglich der Suppression von hBD-3 ist hierbei zusätzlich anzumerken, dass durch die Gewinnung der Keratinozyten *ex vivo* hBD-3 bereits durch zellulären Stress induziert wird, während hBD-3 in gesunder Haut nahezu nicht nachweisbar ist[77]. Die Behandlung mit EGFR-I könnte also *in vivo* nicht nur die ohnehin basal geringen Level von hBD-3 weiter reduzieren sondern viel mehr die durch bakterielle oder anderweitig traumatische Stimuli bedingte Induktion des AMP verhindern. Diese Überlegungen unterstützen die Modellvorstellung einer Störung der angeborenen Immunität durch EGFR-I.

Im Gegensatz hierzu ließ sich in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen eine signifikante, dosisabhängige Induktion in der Produktion von hBD-1 beobachten (Abb. 14). Auf den ersten Blick lässt sich dieses Ergebnis einer EGFR-I vermittelten Induktion eines AMP nicht mit dem Phänotyp einer kutanen Superinfektion in Einklang bringen. Anderseits liegt das antibakterielle Wirkspektrum von hBD-1 im Bereich von *E. coli* und *Ps. aeruginosa*, also jeweils Erreger, die sich

nicht in erhöhter Inzidenz im Rahmen von EGFR-I assoziierten Superinfektionen nachweisen lassen. Dementgegen könnte eine gestörte Proliferation von *E. coli* und *Ps. aeruginosa* im Rahmen einer verminderten kompetitiven Hemmung das verstärkte Wachstum von *S. aureus* unter EGFR-I Therapie zusätzlich unterstützen (vgl. Kap. 5.4).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist in diesem Zusammenhang der Transfer unserer Ergebnisse aus dem Hautorgan in das Verdauungsorgan. Tatsächlich handelt es sich bei *E. coli* um einen klassischen Darmkeim, der nicht zuletzt durch das epidemische Auftreten von entero-hämorrhagischen *E. coli* (EHEC) Infektionen mit teils letalen Komplikationen im Rahmen eines hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS), in der Bundesrepublik Deutschland im Sommer 2011 in das Interesse der breiten Öffentlichkeit gerückt ist[79]. Gleichsam finden sich neben kutanen Reaktionen auch Diarrhöen (16–56% der Patienten unter EGFR-I Therapie) als eine der häufigsten EGFR-I assoziierten Komplikationen (vgl. Kapitel 1.8). Ein Ziel weiterführender Studien könnte folglich die mikrobiologische Analyse EGFR-I assoziierter Diarrhöen sein. Fänden sich im Rahmen dieser Untersuchungen z.B. eine verminderte Zahl von *E. coli* im Vergleich zu gesunden Patienten oder im Vergleich zu Patienten mit Diarrhöen anderer Genese, so würde dieses unsere Hypothese einer Dysregulation von AMP und nicht zuletzt hBD-1 als generellen EGFR-I assoziierten Mechanismus an anderen Grenzorganen über die Haut hinaus unterstützen.

Bezüglich seiner Regulation führen Sörensen et al. die Induktion von hBD-1 jedoch nicht nur auf die Wirkung von Interferon gamma (IFN-γ), sondern auch auf die Stimulierung von Blutleukozyten in Anwesenheit des Antigens Peptidoglycan (PGN), einem Zellwandbestandteil von *S. aureus*, zurück[64]. Folglich könnte die Proliferation von *S. aureus* unter EGFR-I Therapie durch entsprechende bakterielle Stoffwechselprodukte wie etwa PGN die Induktion von hBD-1 weiter stimulieren.

Zusammenfassend wird den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge die Expression antimikrobieller Peptide durch eine pharmakologische EGFR-Blockade moduliert. Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen EGFR-Inhibition und der verminderten Expression von AMP. Hierbei deuten unsere *in vitro* Analysen darauf hin, dass es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um eine direkte Wirkung der Inhibitoren

und nicht etwa um eine indirekte Folge, wie z.B. die Konsequenz einer allgemeinen pharmakologischen Immunsuppression, handelt.

5.2 Entwicklung eines Modells zur Pathogenese bakterieller Infektionen im Rahmen einer EGFR-Inhibitortherapie

Die Ätiopathogenese EGFR-I assoziierter kutaner Nebenwirkungen ist noch nicht vollständig verstanden[76]. Als häufigste Nebenwirkung kommt es sowohl unter Therapie mit EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren (Erlotinib) als auch mit monoklonalen EGFR-Antikörpern (Cetuximab) zu einem stark inflammatorischen papulo-pustulösen Exanthem. Rodeck schließt in seiner Modellvorstellung der Pathogenese des EGFR-I induzierten Exanthems daher eine Immunreaktion auf die monoklonalen Antikörper selbst als Ursache aus[76].

Diese Hypothese einer direkt EGFR-vermittelten Pathogenese wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gleichsam unterstützt. So findet sich eine Einschränkung der zytotoxischen Aktivität von Keratinozyten gegenüber *S. aureus* analog für Tyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonale Antikörper.

5.2.1 Verfrühte Apoptose und Unterbindung der Proliferation

Die Epidermis besteht aus Keratinozyten, die einer streng geregelten Differenzierung ausgehend von Basalzellen bis hin zu den kernlosen Zellen des *Stratum corneum* durchlaufen, wo sie als Korneozyten des Plattenepithels flächige Strukturen bilden. Diese Proliferation und gezielte Apoptose werden über die Signalwege des EGFR gesteuert, der in der Basalschicht und der Suprabasalschicht sowie in den äußeren Schichten des Haarfollikels verstärkt exprimiert wird[80]. Die antiapoptotische Wirkung einer EGFR Aktivierung wird hierbei über die Botenmoleküle BCL2 und BCL-X_L vermittelt[81]. Gleichsam wirkt eine EGFR-Blockade proapoptotisch, wie durch Untersuchungen von Rodeck et al. an *ex vivo* kultivierten Keratinozyten gezeigt werden konnte[82]. Interessanterweise korreliert das von Rodeck et al. beschriebene Apoptose-Maximum an den Tagen 4 bis 12 der EGFR-Blockade mit der Dauer von der Einleitung einer EGFR-I Therapie bis zum Auftreten des „*Rash*“.

Diese EGFR-I induzierte Apoptose könnte auch das Bakterienwachstum bzw. die verminderte Defensin-Ausschüttung durch eine zahlenmäßige Reduktion vitaler bzw. responsiver Keratinozyten weiter fördern.

Gleichsam führt die Apoptose der Keratinozyten über die Freisetzung chemoattraktiver Botenstoffe zur Rekrutierung einer Vielzahl neutrophiler Granulozyten, welche die Entwicklung pustulöser Läsionen unterstützen, die beim „*Rash*“ beobachtet werden.

5.2.2 Inflammatorisches Milieu

Mascia et al.[83] und Pastore et al.[84] beschrieben bei pharmakologisch bedingter EGFR-Inhibition die Induktion der Ausschüttung einer Reihe proinflammatorischer Chemokine einschließlich CCL 5, CCL 27 und CXCL 14. Diese Chemokine rekrutieren bestimmte Leukozyten-Subpopulationen, wie zum Beispiel dendritische Zellen (intraepidermale Langerhanszellen) sowie CD4- oder CD8-positive T-Lymphozyten. Diese inflammatorische Zellen bedingen über die Produktion zusätzlicher proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, IL-7 und TNFSF4) und Chemokine die Migration zusätzlicher Leukozyten. Dieser Prozess führt schließlich zur Entstehung von papulösen Läsionen infolge der Akkumulation von Entzündungszellen, Vasodilatation, erhöhter Vasopermeabilität und nachfolgender Ödembildung[85,86,87]. Schließlich kommt es über die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur pustulösen Umwandlung. Hierbei scheint der IL-1 Rezeptor eine Schlüsselrolle zu spielen[88,76]. Schließlich stellen proinflammatorische Zytokine vom Typ IL-1 einen zusätzlichen apoptotischen Stimulus für Keratinozyten dar[89].
Die Zerstörung epidermaler Strukturen bzw. des *Stratum corneum* bedingt, dass die vitalen Keratinozyten tieferer Hautschichten gegenüber Bakterien oder bakteriellen Produkten exponiert werden. Diese reagieren mit der Produktion induzierbarer AMP. Gleichsam supprimiert aber nun die pharmakologische EGFR-Inhibition die Produktion dieser AMP und insbesondere von hBD3, RNAse 7 und LL-37[90]. In Folge der gestörten epidermalen Integrität kann *S. aureus* nun auf der Haut von Patienten unter EGFR-I Therapie weitestgehend ungehindert proliferieren und in der Folge, z.B. über bakterielle Spaltprodukte, zusätzlich proinflammatorisch wirken[91,92].

In Zusammenschau resultiert die unter 5.2.1 und 5.2.2 beschriebene inflammatorische Kaskade sowie die unter 5.2.1 beschriebene vorzeitige Apoptose der Keratinozyten im Sinne einer unkontrollierten bzw. ungehemmten Entzündungsreaktion, vergleichbar einem sich selbst amplifizierenden *circulus vitiosus* mit konsekutiver Störung der epidermalen Integrität[66,85,93].

An der Haut gewonnene Erkenntnisse lassen sich auf andere Organsysteme bzw. systemische Komplikationen übertragen. So sind etwa die Entstehung einer Sepsis oder die Entwicklung von Pneumonien bei Patienten unter EGFR-I Therapie beschrieben[94,95]. Der EGFR ist also ein zentraler Regulator von Inflammation und Infektionskontrolle.

5.2.3 Prädisposition durch andere Vorerkrankungen

Lacouture et al.[102] beschrieben als weitere Risikofaktoren für kutane Infektionen und die starke Eruption des „*Rash*“ neben der gestörten Barrierefunktion der Haut die Prävalenz begleitender Erkrankungen und belastender Eingriffe. So zeigten Patienten mit soliden Tumoren eine höhere Prävalenz als Patienten mit hämatologischen Krankheitsbildern[69]. Lacouture[102] führt dies auf die zusätzliche Belastung durch die chirurgischen Eingriffe bei Tumorpatienten zurück.

5.2.4 Begleitende Besiedlung durch Demodex follicullorum

Im Jahr 2011 stellten Gerber et al.[96] in einer klinischen Studie die Bedeutung des EGFR für die Kontrolle der kutanen Mikroflora heraus. So konnten bei 19 untersuchten EGFR-I Patienten eine signifikant erhöhte Besiedlung der Haut mit der Haarbalgmilbe *Demodex folliculorum* (DF) gefunden werden. Im Bereich des papulopustulösen Exanthems zeigte sich eine mittlere Besiedlungsdichte von 4,7 DF/cm², die die für hautgesunde Patienten publizierten Durchschnittswerte von 0,7 DF/cm² deutlich überstieg.

Die Bedeutung einer funktionellen kutanen immunologisch-antimikrobiellen Abwehr für die Reaktion der Haut gegenüber DF wird am Beispiel der DF-Besiedlung immunkomprimierter Patienten deutlich. So entwickelten z.B. HIV-Patienten eine DF-assoziierte inflammatorische Eruption erst nachdem sie zur Wiederherstellung des Immunsystems mit einer antiretroviralen Therapie behandelt wurden. Dieses Auftreten der Eruption, einhergehend mit einer starken Immunreaktion, spricht für eine Abwehrreaktion gegen DF selbst. Beobachtungen bei HIV Patienten lassen sich auch für die Situation von Tumorpatienten unter EGFR-I Therapie übertragen. Kommt es hier im Rahmen einer konventionellen Chemotherapie vor Einleitung einer EGFR-I Therapie zunächst zu einer immunsuppressiv bedingten verstärkten Proliferation von DF, so wird diese nach Einleitung der EGFR-I Therapie durch eine

Dysregulation von AMP weiter unterstützt. Gleichsam entstehen durch die verstärkte Proliferation von DF zusätzliche inflammatorische Stimuli, wie etwa durch die Produktion von Milbenprodukten, die den „*Rash*“ im Sinne einer Köbnerisierung (isomorpher Reizeffekt) provozieren. Vor dem Hintergrund der Induktion von proinflammatorischen Mediatoren durch EGFR-I bedingt dies eine starke Amplifikation des beschriebenen „*Rash*“-Zyklus.

Ähnlich dem EGFR-I induzierten Exanthem finden sich auch im Rahmen der papulopustulösen *Rosazea* erhöhte Dichten von DF[97,98,99]. DF ist kein Kommensal, sondern ruft eine Abwehrreaktion des Organismus hervor. Das Infiltrat korreliert hierbei statistisch signifikant mit der Zahl der Milben im Haarfollikel. Das epitheliotrope Infiltrat ist aggressiv, zerstört die Basalmembran und führt zu Spongiose des Follikelepithels. Dieser Prozess kann fortschreiten und entspricht in der Maximalvariante der nun klinisch sichtbaren Papulopustel der *Rosazea*. Extrazelluläre Verlagerungen von DF werden mit granulomatösen Varianten der *Rosazea* assoziiert[99].

Die hohe Wirksamkeit lokal applizierter akarizider und antiparasitärer Substanzen wie der systemischen Therapie mit Ivermectin spricht nach Rufli[99] für eine mindestens mitbedingte Rolle von DF auf *Rosazea* Erscheinungen. Auch bei EGFR-I Patienten wurden Behandlungserfolge mit Metrodinazol erzielt[69]. Zudem legen die aktuellen Befunde einer verminderten AMP-Expression in Kombination mit einer gesteigerten parasitären Besiedlung des „*Rash“* den Schluss nahe, dass in weiterführenden Studien die Effektivität von Ivermectin, Permethrin oder verwandten Substanzen bei der Therapie EGFR-I assoziierter kutaner Nebenwirkungen evaluiert werden sollte.

Der direkte Beweis eines Ursache-Wirkungszusammenhangs von DF und *Rosazea* bzw. dem EGFR-I bedingten „*Rash*“, kann jedoch aktuell nicht mit letzter Sicherheit erbracht werden, da sich DF nicht *in vitro* kultivieren lässt[100].

In jedem Falle sprechen die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit wie auch der Studie von Gerber et al. zusammenfassend für eine EGFR-I induzierte Suppression der antimikrobiellen Abwehr, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine vermehrte Besiedlung mit DF ermöglicht.

5.3 Klinische Relevanz der durch EGFR-Inhibition verminderten Produktion antimikrobieller Peptide auf die lokale Immunabwehr der Haut

5.3.1 AMP in Psoriasis vulgaris und atopischem Ekzem

Ong et al.[74] beschrieben erstmals die erhöhte Expression von verschiedenen AMP auf psoriatischer Haut und stellten sie der verminderten Produktion von AMP auf atopischer Haut gegenüber. Klinisch korrelierten die Autoren ihre Beobachtungen mit dem klinischen Phänotyp beider Dermatosen. So finden sich in oder auf läsionaler Haut von Psoriasispatienten praktisch nie kutane Infektionen. Gleichsam findet sich bei Patienten mit atopischem Ekzem eine hohe Frequenz von kutanen Superinfektionen, insbesondere mit *S. aureus*. Der antiinfektiöse Phänotyp psoriatischer Haut wird durch die vermehrte Expression der AMP hBD-2 und Cathelizidin LL-37 erklärt[101]. Ong et al. postulierten ferner, dass im Gegenteil die verminderte Fähigkeit der Keratinozyten atopischer Haut hBD-2 und Cathelicidin LL-37 zu produzieren, die erhöhte Infektneigung insbesondere gegenüber *S. aureus* bedingt[74]. Diese Befunde korrelieren direkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit, so dass für den EGFR-I induzierten „*Rash*“ ein dem atopischen Ekzem vergleichbarer Pathomechanismus postuliert werden kann. Für das atopische Ekzem stellten Ong et al. weiterführend die Hypothese auf, dass die Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-13 in Keratinozyten die Fähigkeit hBD-2 und LL-37 zu bilden, „abschalten“[74]. Die Untersuchung der Kontrolle von AMP durch Zytokine und Chemokine im EGFR-I induzierten Exanthem könnte diesbezüglich ein interessantes Ziel zukünftiger Studien sein.

5.3.2 *S. aureus* Kolonisierung vor EGFR-I Therapie

Bezüglich des Nachweises von *S. aureus* auf der Haut ist klinisch eine reine Kolonisation von einer manifesten Infektion zu unterscheiden[102]. Während erstere nur eine oberflächliche Besiedlung der Haut beschreibt, werden bei letzterer tiefer liegende Hautschichten befallen. Interessanterweise weisen etwa 18-38% der amerikanischen Bevölkerung eine oberflächliche Besiedlung der Haut mit *S. aureus* auf[103]. Als Risikofaktoren für Hautinfektionen insbesondere bei onkologischen Patienten gelten vermehrte Krankenhausaufenthalte (>5/Jahr) aber auch

Chemotherapien, chronische Hauterkrankungen und Operationen mit anschließendem stationären Aufenthalt[104].

Folglich könnte die kalkulierte Eradikation oder Reduktion von kutanem *S. aureus*, z.B. durch antiseptische Maßnahmen vor Einleitung einer EGFR-I Therapie, ein möglicher Schritt zur Prophylaxe kutaner Infektionen unter dieser Therapie sein.

5.3.3 EGFR-I induzierte Magen-Darm-Symptome

Mechanistische Erkenntnisse aus dem Hautorgan lassen sich auf andere Organsysteme extrapolieren. So werden neben kutanen Toxizitäten Nebenwirkungen im Bereich des Magen-Darm-Traktes als häufigste Komplikation einer Therapie mit EGFR-I beschrieben[90]. Bis dato finden sich in der einschlägigen Fachliteratur aber keinerlei Untersuchungen, ob Infektionen etwa im Sinne einer unkontrollierten Proliferation pathogener Keime hierbei eine Rolle spielen bzw. ob es zur selektiven Proliferation bestimmter Keime im Gastrointestinaltrakt EGFR-I behandelter Patienten kommt. Interessanterweise finden sich aber in der Literatur Hinweise auf eine hochgradig positive Korrelation zwischen der Dysregulation humaner Defensine im Endothel des Magen-Darm-Traktes und der Inzidenz entzündlicher Darmerkrankungen wie *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn*[90]. Auch diese sind klinisch unter anderem durch rezidivierende Diarrhöen charakterisiert. In diesem Zusammenhang führen Wehkamp et al.[105] das seltene Vorkommen von akuten oder chronischen Infektionen im Magen-Darm-Trakt auf die unter physiologischen Umständen hohen Konzentrationen von hBD-1 und auch von Cathelizidin LL-37 in den Epithelzellen des gesamten Magen-Darm-Traktes zurück. Die physiologische Expression dieser Defensine ist dabei in den Paneth-Zellen im Dünndarm besonders stark. Diese sekretorischen Epithelzellen befinden sich am Grund der Lieberkühn-Krypten im Dünndarm und sind in der Lage nach Stimulation durch bakterielle Produkte in Granula gespeicherte Defensine in den Dünndarm zu sezernieren.

Bei der im Dünndarm ursächlich lokalisierten Form der infektiösen Darmerkrankung *Morbus Crohn* ist nach der Modellvorstellung von Wehkamp et al.[106,107] durch einen Mangel an in den Paneth-Zellen gebildeten α-Defensinen HD5 und HD6 die chemische Barriere der Mukosa des Dünndarms gestört. Dadurch können Bakterien aus dem Darmlumen in die Mukosa eindringen und hier mit den residenten Immunzellen in Kontakt treten und eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Bei im

Colon lokalisierten *Morbus Crohn* scheint nach Kübler et al.[108], analog zu unseren Beobachtungen in der Haut von Patienten unter EGFR-I Therapie, ein primärer Defekt der induzierbaren humanen β-Defensine hBD-2 und hBD-3 vorzuliegen. Auch das Cathelizidin LL-37 wird beim im Dickdarm lokalisierten *Morbus Crohn* nur vermindert sezerniert[109,110,111].

Rodeck et al.[76] postulieren eine hemmende Wirkung von EGFR-I auf die Proliferation und Differenzierung von Schleimhautzellen im Gastrointestinaltrakt durch Suppression der hBD-2 Expression. AMP sind nachweislich für die Abwehr von infektiösen Erregern und damit auch für die Intaktheit von Schleimhautzellen verantwortlich. Werden sie im Magen-Darm-Trakt vermindert sezerniert, so kommt es hier zu einer Expansion von nicht-residenten Erregern, was eine der Grundlagen für die Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) darstellt. Eine möglicherweise durch EGFR-I induzierte verminderte hBD-2 Synthese im Magen-Darm-Trakt könnte also die Adhärenz und Invasion von Erregern in die Darmwand erleichtern.

Während es beim *Morbus Crohn* zu einer genetisch-programmierten Dysregulation von AMP im Colon kommt, kommt es beim EGFR-I behandelten Patienten zu einer pharmakologischen Suppression. Im Umkehrschluss könnte der Einsatz von EGFR-I also als pharmakologisches *in vivo* Modell zur Untersuchung der Pathogenese des *Morbus Crohn* dienen.

Gleichsam ist eine mögliche Rolle des EGFR bei der Genese des *Morbus Crohn* oder der *Colitis ulcerosa* wenig untersucht. Interessanterweise konnten aber in einer Studie aus dem Jahr 2002 genetische Polymorphismen des EGFR mit der Prävalenz chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert werden (Martin K, 2002, Digestion). Zukünftige Studien zur Rolle des EGFR bei der Genese EGFR-I assoziierter Nebenwirkungen im Magen-Darm-Trakt wie auch zur Bedeutung des EGFR bei der Genese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, könnten also grundlegend neue Einblicke in die Bedeutung des EGFR als Regulator der Homöostase an Grenzorganen liefern.

5.4 Pathogenese-orientierte Therapieansätze

5.4.1 Antibiotika

Tan et al.[112] werteten in einer Meta-Analyse die in der Literatur dokumentierten Behandlungsansätze für das Management des EGFR-I induzierten „Rash“ aus. Die Gabe von topischen Antibiotika ist demnach zur Eindämmung der kutanen Nebenwirkung sehr verbreitet und wird in diversen Studien als erfolgversprechende Behandlung propagiert. Neuartige hocheffiziente topische Antibiotika wie Retapamulin erlauben die kurzzeitige Anwendung und sind auch wirksam gegen Fusidinsäure-resistente *S. aureus* Stämme[113].

Topisch verabreichte konventionelle Antibiotika haben jedoch den Nachteil, dass sie tiefliegende Hautschichten nicht erreichen und damit nur oberflächlich wirken. Des Weiteren befreien sie die Haut und Schleimhaut nicht nur von Sekundärerregern, sondern beeinträchtigen auch unerwünscht stark die physiologische (Schleim-) Hautflora.

Dennoch weisen Lacouture et al.[102] auf die Bedeutung der Behandlung bakterieller, viraler wie auch fungaler Komplikationen einer EGFR-I Therapie zum Erhalt der Lebensqualität betroffener Patienten hin. Besonders Patienten mit einer Leukopenie, aber auch anderen Formen der Immundefizienz, zeigten in seiner Studie kutane Infektionen.

In diesem Zusammenhang konnte die gleiche Gruppe in einer Studie an 95 Patienten, die mit Cetuximab oder Erlotinib behandelt wurden, die Vorteile einer präventiven Therapie mit Feuchtigkeitscreme, UV-schützender Sonnencreme, topischen Steroiden und nicht zuletzt dem systemisch verabreichten Antibiotikum Doxycyclin nachweisen[114]. Von den 48 präventiv behandelten Patienten zeigten lediglich 29% einen „*Rash“* vom Grad 2 (studienspezifisches Grading) oder höher, während es bei den reaktiv behandelten Patienten in 60% der Fälle zu einen „*Rash*“ der Stärke 2 oder höher kam. Die Lebensqualität der präventiv behandelten Patientengruppe war mit 1,3 Punkten gegenüber 4,2 Punkten bei der reaktiv therapierten Gruppe besser. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen also ein präventiv/adjuvantes Management des „*Rash*“, in dem Antibiotika zur Prävention kutaner Infektionen eine essentielle Rolle spielen. Gleichsam könnte die gute Wirksamkeit des systemisch verabreichten Doxycyclins aber auch auf seine anti-

inflammatorische Potenz zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob durch Doxycyclin in niedrigen, sogenannt sub-antimikrobiellen Dosen (Doxycyclin 40 mg/Tag; Oracea®) ähnliche Effekte zu erreichen sind. Es besteht also ein Bedarf an weiterführenden klinischen Studien. Ferner muss die adjuvante Therapie des EGFR-I induzierten Exanthems kritisch hinterfragt werden. So könnte eine adjuvante Therapie das Auftreten des „*Rash*“ als wichtigsten Surrogatmarker der Immuntherapie unterdrücken und somit ein Ansprechen der EGFR-I Therapie verschleiern und schlussendlich einen Therapieabbruch provozieren. Auch ist eine potentielle Interaktion systemischer Antibiotika mit EGFR-Inhibitoren wenig untersucht, sodass eine Beeinträchtigung der Wirksamkeit nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Dennoch bieten adjuvante Management-Strategien einen interessanten Ansatz für die Prävention schwerer EGFR-I assoziierter Hautreaktionen (insbesondere in Kombination mit einer Strahlentherapie) und sollten in randomisierten Studien mit ausreichenden Patientenzahlen evaluiert werden.

5.4.2 Begleitende Anwendung von Glukokortikosteroiden

Die Anwendung topischer Glukokortikosteroide ist mit einer Reduktion der Dicke der Epidermis sowie mit einer abgeschwächten Immunkompetenz der behandelten Haut assoziiert[115]. Folglich wird die topische Anwendung von Glukokortikosteroiden beim Management des EGFR-I induzierten „*Rash*“ kontrovers diskutiert[112]. So postulieren Lacouture et al.[102] und Mitchell et al.[116], dass die topische Anwendung von Steroiden bei Patienten unter EGFR-I Therapie das Risiko kutaner Infektionen nicht erhöht. Hier konnte in der STEPP (*Skin Toxicity Evaluation Protocol With Panitumumab*) Studie kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten bakterieller Infektionen und der Anwendung topischer 1% Hydrocortison Creme festgestellt werden. Allerdings erhielt das mit dem Glukokortikosteroid-behandelte Kollektiv der Studie auch präventiv vor EGFR-I Therapiebeginn Doxycyclin, so dass diese Ergebnisse in Bezug auf die Inzidenz kutaner Infektionen sicherlich kritisch zu werten sind.

In einer vergleichbaren Studie behandelten Amitay-Laish et al.[117] 29 Patienten unter EGFR-I Therapie erfolgreich mit topischen Steroiden sowie topischer und systemischer Antibiotika-Gabe. Hier zeigte sich nach 200 Tagen die Entwicklung eines sekundären „*Rash*“ bei 7 Patienten, die in allen Fällen eine Besiedlung mit *S.*

aureus zeigten. Die Patienten wurden durchgängig mit topischen Steroiden behandelt, jedoch nur teilweise mit topischen oder systemischen Antibiotika. Dieser späte, klar bakteriell induzierte Ausbruch sollte nach Amitay-Laish et al.[117] durch regelmäßige mikrobiologische Abstriche frühzeitig erkannt und wiederum mit topisch applizierten Antibiotika behandelt werden.

5.4.3 Retinoide

Das Retinoid Isotretinoin, das als Standardmittel bei papulo-pustulösen Hauterkrankungen wie *Rosacea* oder *Acne vulgaris* eingesetzt wird, zeigt auch bei der Behandlung des EGFR-I induzierten Exanthems eine deutliche Wirksamkeit[118]. Reck et al.[119] wie auch Wollenberg et al.[120] empfehlen die orale Gabe von Retinoiden allerdings nur in sehr schweren Fällen, die auf andere Therapieansätze nicht ausreichend ansprechen.

Darüber hinaus können Retinoide die Expression von Defensinen auch direkt beeinflussen. So konnten Harder et al.[121] in *ex vivo* Untersuchungen an primären humanen Keratinozyten mittels PCR Analyse nachweisen, dass eine Prä-Inkubation von Keratinozyten mit Retinoiden die Induktion von hBD-2, -3 und -4 Genexpression durch Calcium, Bakterien oder gar proinflammatorische Zytokinen um mehr als 90% reduziert. Die Verabreichung von Retinoiden könnte folglich auch den „*Rash*“ durch eine zusätzliche Blockade der ß-Defensin Expression und konsekutive Infektion weiter aggravieren.

5.4.4 Endogene Antibiotika

Sörensen et al.[77] konnten demonstrieren, dass eine artifizielle Verletzung der Haut über eine Aktivierung von EGFR hBD-3 induziert, was in der Folge eine Infektion z.B. mit *S. aureus* verhindert bzw. erschwert. Traumata aktivieren demnach das angeborene Immunsystem um Infektionen zu verhindern[77].

Die Analyse der unter AG1478 Zugabe exprimierten AMP in der der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Studie zeigte eine sehr starke Suppression von hBD-3 (vgl. Abschnitt 4.2.) schon unter geringer Zugabe von 30 nM AG1478.

Es stellt sich somit die Frage, ob durch Induktion der EGFR-Signaltransduktion in der Haut oder durch eine Applikation synthetisch hergestellter AMP selbst die infektiösen

Nebenwirkungen einer EGFR-I Therapie eingedämmt werden könnten. Eine direkte, zielgerichtete Stimulation der Keratinozyten wie die in Abschnitt 5.1 beschriebene Expression von hBD-2 durch Interferon gamma wäre ein möglicher Weg für eine solche Stimulation der mikrobiellen Abwehr in Grenzorganen. Gleichsam könnte aber die Applikation proinflammatorischer Mediatoren die EGFR-I induzierte Entzündungsreaktion zusätzlich verstärken, so dass diese Maßnahmen eher kontraproduktiv erscheinen. Darüber hinaus werden antimikrobielle Peptide und Proteine auch physiologisch über ein System von sogenannten „*Pathogen-Pattern-Recognition-Rezeptoren*“ induziert[18,22]. Es wird postuliert, dass diese Rezeptoren auf den Epithelzellen Moleküle erkennen, die die Anwesenheit potentiell gefährlicher Mikroben signalisieren und nachfolgend die Synthese antimikrobieller Peptide und Proteine induzieren. Beispiele dieser Epitope sind bakterielle Lipopolysaccharide, ß-Glucane, Formyl-methionyl-Leucyl-Phenylalanin, einige Mannose-haltige Kohlenhydrate, Peptidoglycane und bakterielle DNA[122,123]. Theoretisch könnte die topische Anwendung dieser Epitope direkt die Produktion von AMP in Epithelien induzieren. Andere Studien haben gezeigt, dass Lipopolysaccharide und Hitze-inaktivierte Bakterien oder Pilze bei topischer Applikation zwar durchaus zu dieser Induktion in der Lage sind, allerdings bewirken sie zusätzlich eine starke Entzündungsreaktion durch die Produktion entzündungsfördernder Zytokine wie IL-1ß und TNF-α und die konsekutive Rekrutierung von Abwehr-/Immunzellen. IL-1ß und TNF-α sind zwar selbst auch Induktoren antimikrobieller Peptide in Epithelzellen, aber primär überwiegt ihre entzündungsfördernde Wirkung. Interessanterweise zeigte sich allerdings in der vorliegenden Arbeit, dass durch die gleichzeitige Stimulation mit IL-1ß und TNF-α die Unterdrückung der zytotoxischen Aktivität von primären humanen Keratinozyten zum Teil sogar noch verstärkt wurde.

5.4.5 Liganden-unabhängige Aktivierung des EGFR durch Redox-Cycler

Perez-Solér et al.[124] postulieren die topische Anwendung von Vitamin K3 (Menadion) als kausalen Therapieansatz für die Behandlung des EGFR-I induzierten „*Rash*“. Hierbei aktiviert Menadion über seine Funktion als Redox-Cycler die EGFR-Tyrosinkinase ligandenunabhängig. Ziel ist die hautspezifische Aktivierung des EGFR-Singalwegs durch topische Anwendung ohne hierbei die systemische Wirkung des EGFR-I zu komprimieren. So schlagen Perez-Solér et al. eine Behandlung mit

topischen Vitamin K Analoga zeitgleich mit Beginn der EGFR-I Therapie bzw. spätestens beim ersten Auftreten des „*Rash*“ vor. Vorzugsweise sollte Vitamin K3 in einer Konzentration von 75 µg/ml bis 100 µg/ml topisch angewendet werden, Vitamin K1 mindestens in einer Konzentration von 450 µg/ml. Die Verwendung von Vitamin K bei dieser Indikation wurde bereits zum Patent angemeldet und stellt zurzeit die wohl aussichtsreichste Strategie zur kausalen Prophylaxe bzw. Therapie des EGFR-I induzierten Exanthems dar. Erste Ergebnisse klinischer Testungen werden derzeit mit Spannung erwartet.

6 Literaturverzeichnis

1 Braun-Falco O. Dermatologie und Venerologie. 5. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005. Struktur und Funktion der Haut. S. 3-6. Ref. Type: Serial (Book, Monograph)

2 Rassner G. Dermatologie Lehrbuch und Atlas. 8. Auflage. Urban & Fischer Verlag München, 2007. Aufbau und Aufgaben des Hautorgans. S. 5-9. Ref. Type: Serial (Book, Monograph)

3 Moll I. Duale Reihe Dermatologie. 6. Auflage. Mikroskopische Struktur und Differenzierung der Haut. S. 3-15. Ref. Type: Serial (Book, Monograph)

4 Fuchs E. Epidermal differentiation: the bare essentials. J Cell Biol 1990; 111(6 Pt 2):2807-14.

5 Bowden PE, Stark HJ, Breitkreuz D, Fusenig NE. Expression and modification of keratins during terminal differentiation of mammalian epidermis. Curr Top Dev Biol 1990; 22:35-68.

6 Schröder JM. Antimikrobielle Peptide: Effektormoleküle der Haut als Abwehrorgan. Hautarzt 2002; 53:424-435.

7 Schröder JM, Harder J. Antimicrobial skin peptides and proteins. Cell Mol Life Sci 2006; 63(4):469-486.

8 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. Nature 2007; 387(6636):861.

9 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. Isolation and characterization of human ß-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem 2001; 276:5707-5713.

10 Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Ganz T. Human ß-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. J Clin Invest 1998; 101:1633-1642.

11 Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SSL, Ganz T, Selsted ME. Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. J Clin Invest 1989; 84(2):553-561.

12 Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. Blood 2001; 79:3951-3959.

13 Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 9541-9546.

14 Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic is cysteine-free and expressed in bone-marrow and testis. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:195-199.

15 Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood 2000; 96:3086-3093.

16 Golec M. Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide. Ann Agric Environ Med 2007; 14(1):1-4.

17 Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. J Immunol 2002; 169:3883-3891.

18 Wehkamp J, Bals R, Kreft B, Schröder JM, Stange EF. Angeborene Immunabwehr. Dt. Ärzteblatt 2007; 104(5):A257-62.

19 Harder J, Schröder JM. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. J Biol Chem 2002; 277:4679-84.

20 Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. Front Biosci 2002; 7:d1356-d1368.

21 Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. Nat Immunol 2005; 6:57–64

22 Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Rev 2003; 55(1):27-55

23 Shai Y, Oren Z. From „carpet“ mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. Peptides 2001; 22:1629-1641.

24 Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. Biochem J 1999; 341:501-513.

25 Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. Protein Sci 1994; 3(9):1362-1373.

26 Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. Annu Rev Immunol 1993; 11:105-128.

27 Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. Trends in Immunol 2002; 23(6):283-284.

28 Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formly peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. J Exp Med 2000; 192(7):1069-1074.

29 Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities in human defensins and cathelicidin (LL-37). J Leucoc Biol 2001; 69(5):691-697.

30 Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Bäckdahl M, Liden S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinozytes during inflammatory disorders. J Biol Chem 1997; 272(24):15258-15263.

31 Wells A. EGF receptor. Int J Biochem Cell Biol 1999; 31:637-643.

32 Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Morimoto S. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. Biochem J 1997; 326:69-75.

33 Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. Experimental Cell Research 2003; 284:2–13.

34 Yarden Y, Silkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2:127-137.

35 Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 1990; 61(2):203-12.

36 Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. Endocr Relat Cancer 2003; 8(3):151-9.

37 Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. Pharmacol Ther 1999; 82:241-50.

38 Nagane M, Lin H, Cavenee WK, Huang HJ. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. Cancer Lett 2001; 162 Suppl:S17-S21.

39 Hynes NE. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Breast Cancer Res 2000; 2:154-7.

40 Tang CK, Gong XQ., Moscatello DK, Wong AJ, Lippman ME. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. Cancer Res 2000; 60(11):3081-7.

41 Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin. Eur J Dermatol 1999; 9(5):413-25.

42 Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer 2004; 11:689-708.

43 Chan-Hui PY, Weaver R. Human mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates the stress-induced activation of mitogen-activated protein kinase cascades. Biochem J 1998; 336:599-609.

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

45 Grimberg A. Mechanisms by which IGF-1 may promote cancer. Cancer Biol Ther 2003; 2:630-635.

46 Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: A prototype of MAPK signaling. Mol Biotechnol 2005; 31:151-174.

47 Wilkonson MG, Millar JB. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. FASEB J 2000; 14:2147-2157.

48 Bromberg J, Darnell JE. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. Oncogene 2000; 19:2468-2473.

49 Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. Oncogene 2000; 19:2474-88.

50 Yi KS, Chung JH, Lee YH, Chung HG, Kim IJ, Suh BC, Kim E, Cocco L, Ryu SH, Suh PG. Inhibition of the EGF-induced activation of phospholipase C-gamma1 by a single chain antibody fragment. Oncogene 2001; 20:7954-46.

51 Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science 1999; 286(5445):1741-4.

52 Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. Pharmacol Ther 1999; 82:241-250.

53 Peghini PL, Iwamoto M, Raffeld M, Chen YJ, Goebel SU, Serrano J, Jensen RT. Overexpression of epidermal growth factor and hepatocyte growh factor receptors in a proportion of gastrinomas correlates with aggressive growth and lower curability. Clin Cancer Res 2002; 8:2273-85.

54 Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. J Clin Oncol 2001; 19:32S-40S.

55 Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, Averbuch S, Wadsworth P. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. Anticancer Res 2003; 23:3639-50.

56 Wosikowski K, Schuurhuis D, Kops GJ, Saceda M, Bates SE. Altered gene expression in durg-resistant human breast cancer cells. Clin Cancer Res 1997; 3:2405-2414.

57 Sartor CL. Mechanisms of disease: Radiosensitization by epidermal growth factor receptor inhibitors. Nat Clin Pract Oncol 2004; 1:80-87

58 Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med 2008; 358:1160-74

59 Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. N Engl J Med 2005; 353:172-87

60 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 1995; 19:183-232.

61 Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. Oncologist 2002; 7 Suppl 4:2-8.

62 Ritter CA, Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase: a promising therapeutic target in solid tumors. Semin Oncol 2003; 30:3-11.

63 Nanney LB, Stoscheck CM, King LE, Jr., Underwood RA, Holbrook KA. Immunolocalization of epidermal growth factor receptors in normal developing human skin. J Invest Dermatol 1990; 94:742-8.

64 Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. J Immunol. 2005; 174(8):4870-9.

65 Siegel-Lakhai WS, Beijnen JH, Schellens JH. Current Knowledge and Future Directions of the Selective Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors Erlotinib and Gefitinib. The Oncologist 2005; 10(8):579-89.

66 Gerber PA, Buhren BA, Kürle S, Homey B. Therapie mit Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktors. Hautarzt 2010; 61:654-661

67 Vitetta ES, Uhr JW. Monoclonal antibodies as agonists: an expanded role for their use in cancer therapy. Cancer Res 1994; 54:5301-9.

68 Perez-Soler R, Delord JP, Halpern A. et al. HER1/EGFR inhibitor-associated rash: future directions for management and investigation outcomes from the HER1/EGFR inhibitor rash management forum. Oncologist 2005; 10(5):345-56.

69 Segaert S, Van Cutsem E. Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors. Ann Oncol 2005; 16:1425-33.

70 Kardaun SH, van Duinen KF. Erlotinib-induced florid acneiform rash complicated by extensive impetiginization. Clin Exp Dermatol 2008; 33:46-9.

71 Gutzmer R, Wollenberg A, Ugurel S, Homey B, Ganser A, Kapp A. Cutaneous side effects of new antitumor drugs: clinical features and management. Dtsch Arztebl Int 2012; 109(8): 133–40.

72 Busam KJ, Capodieci 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; 144:1169-76.

73 Boucher KW, Davidson K, Mirakhur B, Goldberg J, Heymann WR. Paronychia induced by cetuximab, an antiepidermal growth factor receptor antibody. J Am Acad Dermatol 2002; 47:632.

74 Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DYM. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. N England J Med 2002; 347:1151-60.

75 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 1989.

76 Rodeck U. Skin Toxicity Caused by EGFR Antagonists – An Autoinflammatory Condition Triggered by Deregulated IL-1 Signaling? J Cellular Physiology 2009; 218:32-34

77 Sorensen OE, Thapa DR, Roupe KM, Valore EV, Sjöbring U, Roberts AA, Schmidtchen A, Ganz T. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. J Clin Invest 2006; 116(7):1878-1885.

78 Maisetta G, Batoni G, Esin S, Florio W, Bottai D, Favilli F, Campa M In Vitro Bacterial Activity of Human ß-Defensin 3 against Multidrug-Resistant Nosocomial Strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50(2):806-809.

79 Rubino S, Cappuccinelli P, Kelvin DJ Escherichia coli (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France. J Infect Dev Ctries 2011; 5(6):437-440.

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

81 Stoll SW. EGF receptor signalling inhibits keratinocyte apoptosis: Evidence for mediation by Bcl-XL. Oncogene 1998; 16:1493-99.

82 Rodeck U. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. J Cell Sci 1997; 110:113-121.

83 Mascia F, Mariani V, Girolomoni G, Pastore S. Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. Am J Pathol 2003; 163:303-12.

84 Pastore S, Mascia F, Mariotti F, Dattilo C, Mariani V, Girolomoni G. ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation. J Immunol 2005; 147:5047-56.

85 Gerber PA, Enderlein E, Homey B, Muller A, Boelke E, Budach W. Radiation induced prevention of Erlotinib-induced skin rash is transient: a new aspect toward the understanding of epidermal growth factor receptor inhibitor associated cutaneous side effects. J ClinOncol 2007; 25:4697-4698.

86 Buhren BA. Unraveling the mechanisms EGFR-inhibitor associated cutaneous adverse effects. Universität Düsseldorf 2010. Ref. Type: Dissertation.

87 Woodworth CD, Michael E, Marker D. Inhibition of the epidermal growth factor receptor increases expression of genes that stimulate inflammation, apoptosis and cell attachment. Mol Cancer Ther 2005; 4:650-658.

88 Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. Nat Med 2007; 13:851-856.

89 Rodeck U, Jost M, DuHadaway J, Kari C, Jensen PJ, Risse B, Ewert DL. Regulation of Bcl-XL expression in human keratinocytes by cell-substartum adhesion and the epidermal growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:5067-72.

90 Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during Helicobacter pylori infection. J Biol Chem 2006; 281:11637-48.

91 Grenader T, Gipps M, Goldberg A. Staphylococcus aureus bacteremia secondary to severe erlotinib skin toxicity. Clin Lung Cancer 2008; 9:59-60.

92 Duvic M. EGFR inhibitor-associated acneiform folliculitis: assessment and management. Am J Clin Dermatol 2008; 9:285-94.

93 Hollywood E. Clinical issues in the administration of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, IMC-C 225. Semin Oncol Nurs 2002; 18:30-35.

94 Liu V, White DA, Zakowski MF, Travis W, Kris MG, Ginsberg MS, Miller VA, Azzoli CG. Pulmonary toxicity associated with erlotinib. Chest 2007; 132:1042-4.

95 Vahid B, Esmaili A. Erlotinib-associated acute pneumonitis: report of two cases. Can Respir J 2007; 14:167-70.

96 Gerber PA, Kukova G, Buhren BA, Homey B: Density of Demodex folliculorum in Patients Receiving Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. Dermatology 2011; 222(2):144-7

97 Bonnar E, Eustace P, Powell PC: The demodex mite population in rosacea. J Am Acad Dermatol 1993; 28:443-448.

98 Forton F, Germaux MA, Brasseur T, De Liever A, Laporte M, Mathys C, Sass U, Stene JJ, Thibaut S, Tytgat M, Seys B. Demodicosis and rosacea: epidemiology and significance in daily dermatologic practice. J Am Acad Dermatol 2005; 52:74-87.

99 Rufli T. Rosacea und Demodex. J Dtsch Dermatol Ges. 2005; 3(8):585-6.

100 Zhao YE, Guo N, Wu LP. Influence of temperature and medium on viability of Demodex folliculorum and Demodex brevis (Acari: Demodicidae). Exp Appl Acarol 2011; 54(4):421-5.

101 Frohm M, Agerberth B, Ahangari G. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. J Biol Chem 1997; 272:15258-63.

102 Eilers RE, Gandhi M, Patel JD, Mulcahy MF, Agulnik M, Hensing T, Lacouture ME. Dermatologic Infections in Cancer Patients Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Therapy. J Natl Cancer Inst 2010; 102:47-53.

103 Graham PI, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of Staphylococcus aureus colonization. Ann Intern Med 2006; 144:318-325.

104 Boyce JM. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. J Hosp Infect 2001; 48 (suppl.A):S9-S14.

105 Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger K, Bevins C, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. Nature Clin Pract 2005; 2:406-415.

106 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaeffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn`s disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. Gut 2004; 53:1658-1664.

107 Wehkamp J, Salzmann NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn`s disease. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:18129-18134.

108 Kübler I, Stange EF, Fellermann K, Wehkamp J. Defensine: körpereigene Antibiotika als zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Dtsch Med Wochenschr 2006; 131:1960-1964.

109 Schauber J, Rieger D, Weiler F, Wehkamp J, Eck M, Fellermann K, Scheppach W, Gallo RL, Stange EF. Heterogeneous expression of human cathelizidine hCAP18/LL-37 in iflammatory bowel diseases. Eur J Gastroenterol Hepatol 2006; 18:615-621.

110 Wehkamp J, Fellermann K, et al. Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 14:745-752.

111 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn`s disease and ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2003; 9:215-223.

112 Tan EH, Chan A. Evidence-based treatment options for the management of skin toxicities associated with epidermal growth factor receptor inhibitors. Ann Pharmacother 2009; 43(10):1658-66.

113 Oranje AP, Chosidow O, Sacchidanand S, Todd G, Singh K, Scangarella N, Shawar R, Twynholm M. Topical retapamulin ointment, 1%, versus sodium fusidate ointment, 2%, for impetigo: a randomized, observer-blinded, noninferiority study. Dermatology 2007; 215(4):331-40.

114 Lacouture ME, Mitchell EP, Piperdi B, Pillai M, Shearer H, Iannotti N, Xu F, Yassine M. Skin toxicity evaluation protocol with panitumumab (STEPP), a phase II, open-label, randomized trial evaluating the impact of a Pre-Emptive Skin treatment regimen on skin toxicities and quality of life in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2010; 28:1351-1357.

115 Lehmann P, Zheng P, Lavker RM, Kligman AM. Corticosteroid atrophy in human skin. A study by light scaning and transmission electron microscopy. J Invest Dermatol 1983; 81(2):169-176.

116 Mitchell E, Lacouture M, Shearer H, et al. A phase II, open label trial of skin toxicity evaluation (STEPP) in metastatic colorectal cancer patients receiving panitumumab + FOLFIRI or ironotecan-only chemotherapy as 2nd line treatment. In: 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer. Barcelona, Spain (abstract 15007). J Clin Oncol 2008; 26:644.

117 Amitay-Laish I, David M, Stemmer SM. Staphylococcus coagulase-positive skin inflammation associated with epidermal growth factor receptor targeted therapy: An early and a late phase of papulopustular eruptions. The Oncologist 2010; 15(9):1002-08.

118 Gutzmer R, Werfel T, Mao R, Kapp A, Elsner J. Successful treatment with oral isotretinoin of acneiform skin lesions associated with cetuximab therapy. Br J Dermatol 2005; 153:849-51.

119 Reck M, Gutzmer R. Management of the cutaneous side effects of therapeutic epidermal growth factor receptor inhibition. Onkologie 2010; 33:470-479.

120 Wollenberg A, Reitamo S, Atzori F, Lahfa M, Ruzicka T, Healy E, Giannetti A, Bieber T, Vyas J, Deleuran M; European Tacrolimus Ointment Study Group. Proactive treatment of atopic dermatitis in adults with 0.1% tacrolimus ointment. Allergy 2008; 63(6):742-750.

121 Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM. Differential Gene Induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes Is inhibited by retinoic acid. J Invest Dermatol 2004; 123:522-9.

122 Panaro MA, Mitolo V. Cellular responses to FMLP challenging : a mini-review. Immunopharmacol Immunotoxicol 1999; 21:397-419.

123 Heeg K, Sparwasser T, Lipford GB, Hacker H, Zimmermann S, Wagner H. Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to immune cells. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:464-469.

124 Perez-Soler R, Zou Y, Li T, Tornos C, Ling Y. Topical vitamin K3 (Vit K3, Menadione) prevents erlotinib and cetuximab-induced EGFR inhibition in the skin. Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006:3036.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Dermato-Immunologischen und Onkologischen Labor der Hautklinik sowie im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt daher Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Homey, Direktor der Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die freundliche Überlassung des sehr interessanten Themas sowie seinen wertvollen Anregungen und seine wohlwollende Unterstützung, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Scheu, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die freundliche Kooperation und Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. med. Peter Arne Gerber danke ich für die langjährige, engagierte Betreuung, für die wertvollen Diskussionen und für die Einweisung in die Methoden. Nicht zuletzt bin ich ihm dankbar für das Korrekturlesen dieser Arbeit und seine andauernde Ansprechbarkeit.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und vielerlei Hilfestellungen in fachlichen und anderen Fragen danke ich den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Homey in der Hautklinik sowie Mitarbeitern der Arbeitsgruppe MacKenzie im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Insbesondere danke ich von ganzem Herzen meiner Familie für die beständige Unterstützung und Liebe.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Parinaz Ansari Pirsarai