

Aus dem Zentrum für Radiologie,
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
(Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. G. Schmitt)

Der epidermale Wachstumsfaktor- Rezeptor (EGFR) als Ziel genetischer Modulation zur Erhöhung der Strahlensensibilität humaner Karzinome und maligner Gliome

Molekularbiologische Analysen und präklinische Studien zur
Wirkungsweise und Effektivität genterapeutisch induzierter
Strahlensensibilisierung

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf als Habilitationsschrift vorgelegt

von

Guido Lammering

2002

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. EINLEITUNG	4
2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG.....	19
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 MATERIALIEN.....	27
3.1.1 Reagenzien und Zell- Linien	27
3.1.2 Rekombinante Adenoviren	29
3.1.3 Versuchstiere und Tumoren	30
3.2 <i>IN VITRO</i> METHODEN	30
3.2.1 Adenovirale Transduktion und Bestimmung der Transduktionsrate	30
3.2.2 Transiente Transfektion der CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen	32
3.2.3 Behandlung und Bestrahlung der Zellen <i>in vitro</i>	34
3.2.4 Western Blot und Immunpräzipitation	34
3.2.5 Immunkomplex Kinase Assay	36
3.2.6 Koloniebildungstest	37
3.3 <i>IN VIVO</i> METHODEN.....	38
3.3.1 Intratumorale Infusion der adenoviralen Vektoren, Bestimmung der Transfektionsrate im Tumor und Bestrahlung der Tumoren	38
3.3.2 Induktion der EGFR-CD533 Expression in Xeno- Transplantat-Tumoren von stabil transfizierten MDA-EGFR-CD533 Zellen und Bestrahlung der Tumoren	41
3.3.3 Western blot Analyse und Immunpräzipitation von Tumorzellen	42
3.3.4 <i>Ex vivo</i> Koloniebildungstest	42
3.3.5 Tumorwachstumsanalyse	43
3.4 STATISTISCHE ANALYSE.....	43
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER <i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNGEN ZUR STRAHLENSENSIBILISIERUNG VERSCHIEDENER KARZINOM- UND GLIOM- ZELL- LINIEN MITTELS ADENOVIRALER EXPRESSION DES DOMINANT-NEGATIVEN EGFR-CD533	45
4.1 Charakterisierung der ErbB-Rezeptor Expressionsprofile der untersuchten Zell- Linien	45
4.2 Optimierung der Transduktionsbedingungen und Expression des dominant negativen EGFR-CD533 nach adenoviralem Gentransfer	47
4.3 Hemmung der strahlen-induzierten Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase mittels adenoviraler Expression des dominant-negativen EGFR	50
4.4 Hemmung der strahlen- induzierten, EGFR vermittelten pro-proliferativen Aktivierung der MAPK mittels adenoviraler Expression des dominant-negativen EGFR	53
4.5 Klonogene Überlebensanalysen zur Strahlensensibilisierung verschiedener Zell- Linien mittels adenoviraler Genexpression des dominant-negativen EGFR nach Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung	55
4.6 Diskussion	62

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄKLINISCHEN STUDIEN ZUR STRAHLENSENSIBILISIERUNG HUMANER KARZINOME UND MALIGNER GLIOME MITTELS ADENOVIRALER EXPRESSION DES DOMINANT-NEGATIVEN EGFR-CD533	68
5.1 Optimierung der intratumoralen Infusion von Ad-EGFR-CD533 in MDA-MB-231 Xeno-Transplantat Tumoren	68
5.2 EGFR-CD533 Expression und Funktion in menschlichen Mammakarzinomzellen <i>in vivo</i>	70
5.3 EGFR-CD533 Expression <i>in vivo</i> und Quantifizierung der Strahlensensibilisierung der Tumoren	72
5.4 Tumor-Strahlensensibilisierung durch adenoviral vermittelte Gentherapie mit EGFR-CD533	75
5.5 Diskussion	79
6. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER FUNKTIONELLEN BEDEUTUNG EINER NATÜRLICHEN VARIANTE DES EGFR, EGFRVIII, UND SEINE BEDEUTUNG FÜR DIE ZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION NACH BESTRAHLUNG ANHAND EINES TRANSIENT TRANSFIZIERTEN CHO-ZELLSYSTEMS	83
6.1 Natürliche Expression von EGFRvIII <i>in vivo</i>	83
6.2 Ligandenunabhängigkeit von EGFRvIII und funktionelle Hemmung	85
6.3 Ligandenunabhängige strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII	86
6.4 EGFRvIII abhängige strahlen-induzierte Aktivierung von MAPK und Akt	89
6.5 Erhöhte Zytoprotektion nach strahlen-induzierter Aktivierung von EGFRvIII	92
6.6 Strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII <i>in vivo</i>	93
6.7 Diskussion	95
7. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONELLEN HEMMUNG DES EGFRVIII DURCH ADENOVIRALE EXPRESSION DES DOMINANT NEGATIVEN EGFR-CD533	100
7.1 Modulation der EGFRvIII Aktivität durch Expression des dominant-negativen EGFR- CD533	100
7.2 Blockierung der strahlen-induzierten Aktivierung von EGFRvIII durch Expression von EGFR-CD533	102
7.3 Hemmung der EGFRvIII vermittelten zytoprotektiven Antwort auf Bestrahlung durch Expression von EGFR-CD533	103
7.4 Funktionelle Hemmung des EGFRvIII <i>in vivo</i> nach Doxycyclin-induzierter Expression von EGFR-CD533	105
7.5 Die Expression von EGFR-CD533 hemmt die Tumorinduktions-Aktivität von EGFRvIII in Tumor Xeno-Transplantaten	107
7.6 Strahlensensibilisierung von EGFRvIII exprimierenden U-373 MG Tumoren nach adenoviraler Transduktion von EGFR-CD533	110
7.7 Diskussion	112
8. ZUSAMMENFASSUNG.	116
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	124
10. DANKSAGUNGEN.....	140
11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	142

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Seit einigen Jahren ist die Bedeutung der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren bei der Entwicklung und Progression humaner Krebsformen bekannt. Durch die Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Oberflächenrezeptoren wird eine Rezeptoraktivierung induziert, welche daraufhin eine Signaltransduktionskaskade einzuleiten oder zu modifizieren vermag. Diese Wachstums- regulierenden Moleküle und ihre Rezeptoren wirken, indem sie die Proliferation und Differenzierung der Zellen in Normalgeweben oder auch während der Embryogenese modulieren. In vielen Karzinomen sind jedoch die Wachstumsfaktoren oder ihre Rezeptoren überexprimiert oder andersartig

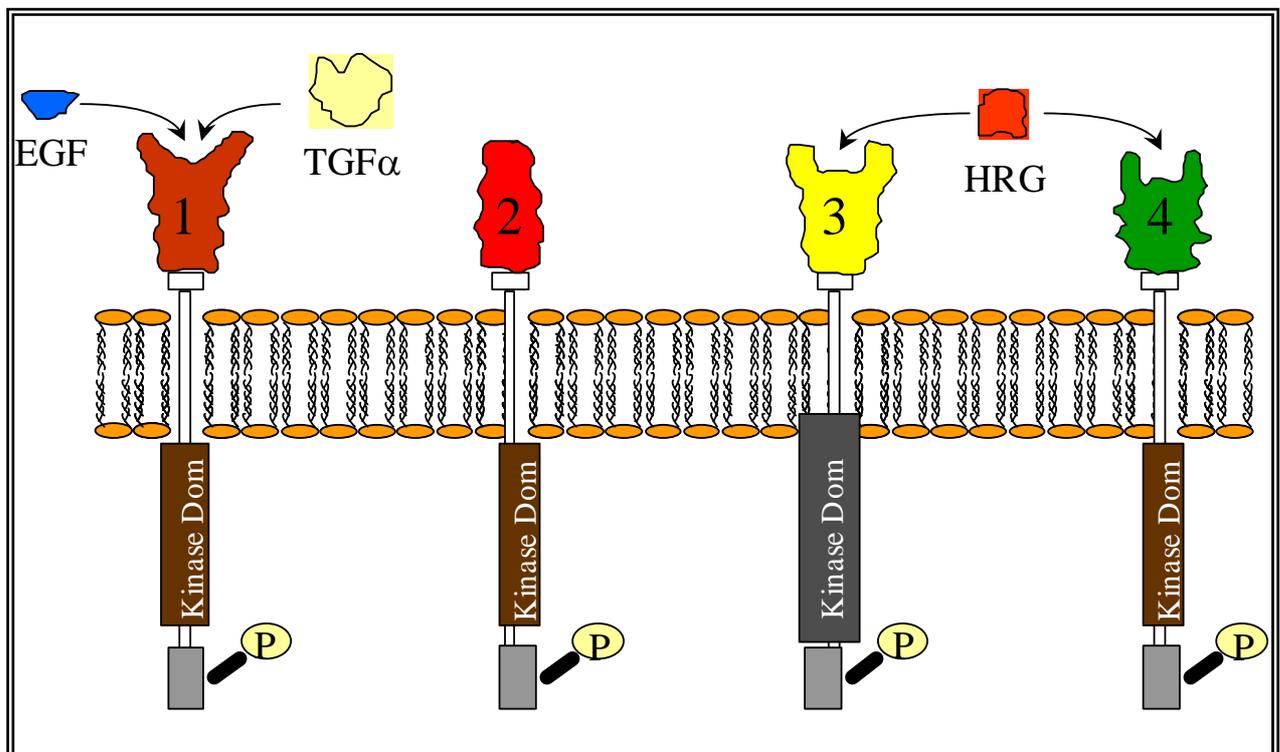


Abbildung 1: Schematische Darstellung der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinase Familie.

Kinase Dom = Kinase Domäne der ErbB-Rezeptor Moleküle;
EGF; TGFα; HRG (Herregulin) = Wachstumsfaktor- Liganden

exprimiert. Solch eine unregulierte Stimulation der Wachstumsfaktor-Signalwege führt zu unregulierten Zellsignalen, welche eine Dysregulation von Wachstum, eine Tumoraktivierung und eine Metastasierung zur Folge haben. Das Ausmaß, mit dem diese Zell-Signalwege zum Tumorwachstum beitragen, ist an der großen Zahl von Onkogenen abzulesen, die als zelluläre Gene für Wachstumsfaktoren (z.B. *sis*, *hst*), Wachstumsfaktor- Rezeptoren (*kit*, *trk*, *erbB-2*) oder Tyrosinkinasen (*abl*, *src*, *lck*) kodieren (Powis, 1994).

Die Rezeptor Tyrosinkinase der ErbB Familie sind eng in die Wachstumskontrolle von Säugetierzellen einbezogen. In normalen Zellen werden sie durch Wachstumsfaktoren über parakrine und juxtakrine Mechanismen aktiviert. Als bedeutender kritischer Schritt in der neoplastischen Progression werden die ErbB Rezeptor-Tyrosinkinase in Karzinomzellen Teil eines autokrinen Wachstumsregulationskreislaufes, welcher zusätzlich die ErbB spezifischen Wachstumsfaktor- Liganden wie EGF, TGF- α oder Heregulin (HRG) einbezieht (Chrysogelos und Dickson, 1994). Obwohl die Plasmamembran-Komponenten der ErbB Rezeptoren 1-4 als transmembrane 170 bis 200 kDa große Glykoproteine wichtige Gemeinsamkeiten besitzen, erfüllt jede ErbB-Spezies innerhalb des ErbB-Rezeptor- Tyrosinkinase Netzwerkes eine spezifische Funktion (Alimandi et al, 1995; Gamett et al., 1995; Guy et al., 1994; Riese und Stern, 1998; Segatto et al., 1991; Zhang et al., 1996). ErbB 1 und ErbB 4 sind vollständige Rezeptoren mit einer Liganden- Bindungsstelle in der extrazellulären NH₂-Komponente und einer Tyrosinkinase- Domäne in der zytoplasmatischen COOH terminalen Komponente des Moleküls. Die letztere enthält auch einige kritische Tyrosinresiduen, welche für die Aktivierung der Tyrosinkinase nach Homo- oder Heterodimerisierung im Anschluß an eine Wachstumsfaktorbindung erforderlich sind (Earp et al., 1995; Graus-

Porta et al., 1997; Gulliford et al., 1997; Qian et al., 1994). ErbB 2 repräsentiert einen konstant aktiven Rezeptor, welcher keine Liganden-Bindungsstelle besitzt. ErbB 3 teilt sich Ligandenspezifitäten mit ErbB 4, besitzt aber keine Tyrosinkinase Aktivität. Daher sind ErbB 2 und ErbB 3 als wichtige Modulatoren der zellulären Antwort auf Wachstumsfaktoren durch Heterodimerisierung mit ErbB 1 und ErbB 4 zu verstehen (Alimandi et al., 1995; Gamett et al., 1995; Guy et al., 1994; Riese et al., 1998; Segatto et al., 1991; Zhang et al., 1996; Earp et al., 1995; Graus-Porta et al., 1997; Gulliford et al., 1997; Qian et al., 1994; Abb. 1).

Abhängig vom Karzinomzelltyp und dem ErbB-Rezeptorexpressionsprofil antworten Zellen auf verschiedene Wachstumsfaktor- Liganden, welche eine proliferative Antwort induzieren, mit einer Hierarchie an primären und sekundären Homo- und Heterodimerisierungsereignissen (Gamett et al., 1995). Die ErbB Rezeptoren medieren ihre proliferativen Signale über einen bedeutenden zytoprotektiven Signaltransduktionsweg, welcher Adaptor- Proteine wie GRB2 und SHC, GTP-Austauschfaktoren wie SOS, Phospholipase C γ (PLC γ), Ras, Proteinkinase C (PKC), Raf, MAPK, und PI-3-Kinase abhängige Signalwege einbezieht. Diese Signaltransduktionswege beeinflussen direkt oder indirekt die Zellzykluskontrolle und die Transkriptionsregulation, welche die biosynthetische Maschinerie und Zellproliferation in Gang setzen (Schmidt-Ullrich et al., 1999; Abb. 2).

Die Rezeptor- Tyrosinkinasen der ErbB- Familie und verwandte Plasmamembran-Rezeptoren wurden als kritische Komponenten einer autokrinen Wachstumsregulation, die üblicherweise das Ergebnis einer koordinierten Koexpression von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren darstellt, bei Karzinomen und malignen

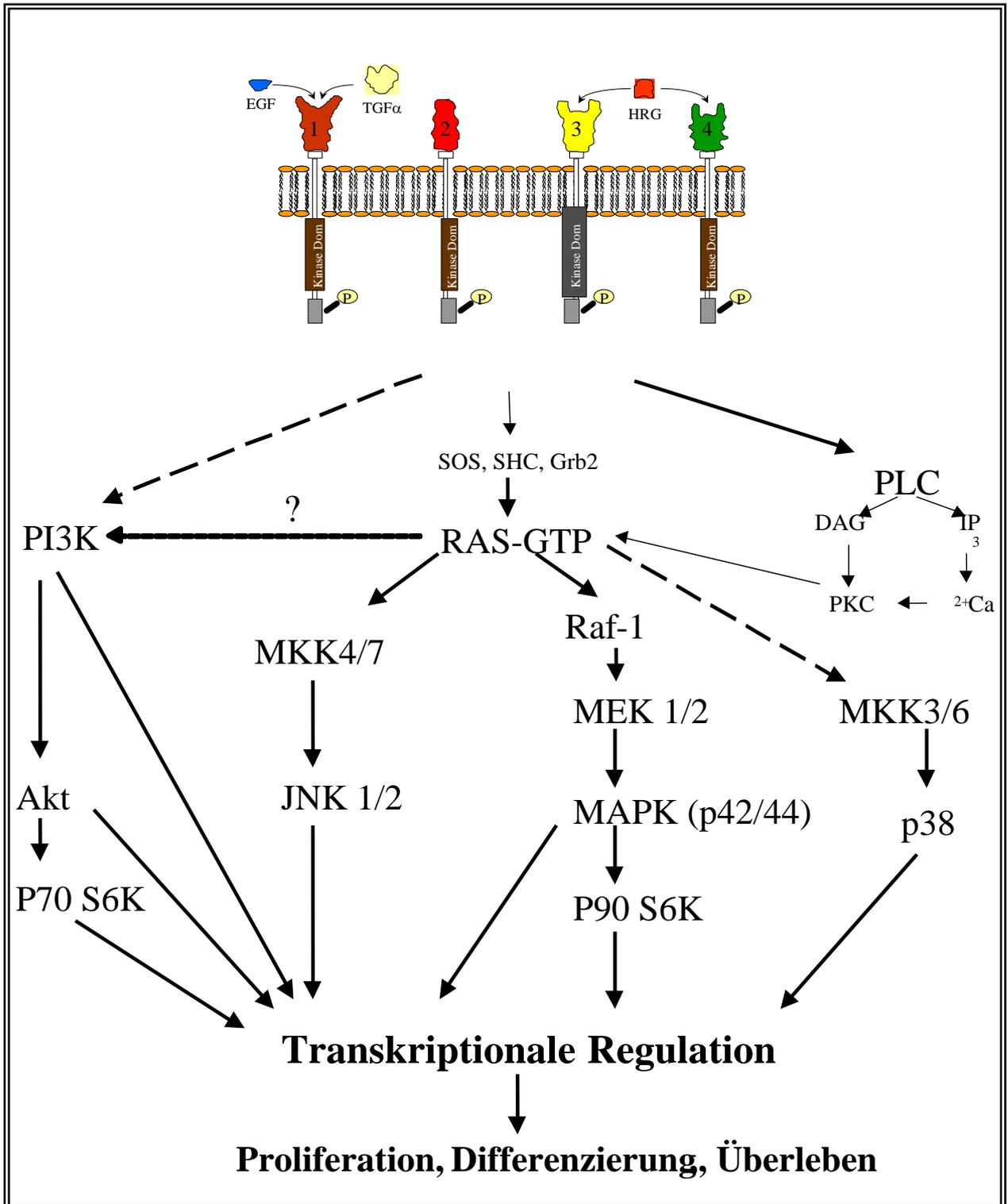


Abbildung 2: Schematische Darstellung der derzeit bekannten, von der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinase Familie induzierten Signaltransduktionswege, durch welche vermutlich über die Transkriptionsregulation die biosynthetische Aktivierung und Zellproliferation in Gang gesetzt wird.

Gliomen identifiziert (Weinberg, 1989; Baselga und Mendelsohn, 1994; Tang et al., 1997; Schmidt-Ullrich et al., 2000). Als zugrundeliegende Mechanismen hierfür wurden

die Rezeptoraktivierung und die Stimulierung der nachgeschalteten, die Mitogenese modifizierenden Signalwege ermittelt. Innerhalb der ErbB- Rezeptor- Tyrosinkinase Familie sind der ErbB-1 (EGFR) und ErbB-2 (Her-2/neu) Rezeptor die zur Zeit am besten untersuchten und verstandenen Vertreter.

1.2 EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktor- Rezeptor (EGFR) ist ein aus 1186 Aminosäuren bestehendes, 170 kDa großes transmembranes Protein, welches aus einer extrazellulären Ligandenbindungs- Domäne, einer transmembranen Region und einer zytoplasmatischen Protein- Tyrosinkinase- Domäne zusammengesetzt ist (Ennis et al., 1991). Eine Vielzahl von Liganden wurde bisher für EGFR identifiziert. Diese beinhalten den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den transformierenden Wachstumsfaktor TGF- α , den Vaccinia- Virus- Wachstumsfaktor, sowie Amphiregulin- und Heparinbindendes EGF. Der vorwiegend in menschlichen Geweben exprimierte Ligand ist das TGF- α . EGFR wird eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellteilung und Tumorstadium zugeschrieben. Die Bindung von EGFR- spezifischen Liganden, wie beispielsweise dem EGF an der extrazellulären Domäne, führt zu einer Dimerisierung. Die Dimerisierung wiederum aktiviert die intrinsische Protein- Kinase über intermolekulare Autophosphorylierung innerhalb der zytoplasmatischen Domäne. Die phosphorylierten Tyrosinresiduen Tyr, Ser und Thr funktionieren als Bindungsstellen für zytoplasmatische Messengerproteine, welche dann eine Kaskade an Signalen vom Zytoplasma bis zum Nucleus einleiten, wodurch schließlich die Mitogenese, das Tumorstadium und das Zellüberleben reguliert werden (Schmidt-Ullrich et al., 2000; Schmidt-Ullrich et al., 1999; Ullrich und Schlessinger, 1990; Abb. 2).

EGFR wird in allen Epithelien, aber auch in vielen Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert. Eine primäre Aufgabe von EGFR besteht in seiner Fähigkeit, das zelluläre Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung zu beeinflussen. In den letzten Jahren sind eine Reihe von Publikationen erschienen, die eine Überexpression von EGFR für epitheliale Tumoren ermittelt haben. Wie auch für andere Wachstumsfaktor-Rezeptoren kann eine erhöhte EGFR-Expression beziehungsweise Aktivität die Folge einer erhöhten Ligandenmenge sein, es kann aber auch eine EGFR Genamplifikation, eine erhöhte Transkription, mRNA Translation oder eine Mutation mit der Folge eines unreguliert erhöhten Rezeptorsignals vorliegen. Für viele Karzinome konnte eine erhöhte EGFR-Aktivität mit einem vermehrten Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht werden. Präklinische Studien legen die Vermutung nahe, daß EGFR-vermittelte Signale auch andere Aspekte der Tumorprogression beeinflussen, wie beispielsweise Angiogenese, Zellüberleben und Metastasierung. Solche phänotypischen Veränderungen bei menschlichen Karzinomen sind für das Fortschreiten der Erkrankung und das Überleben der Patienten oft entscheidend. EGFR wird auf der Oberfläche vieler Normalgewebe exprimiert. Es wurde jedoch auch eine vermehrte Anzahl an EGF- Rezeptoren bei einer Vielzahl menschlicher Tumoren, wie Mamma-, Bronchial-, Kopf-Hals-Tumoren, Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen gefunden (Klijn et al., 1992; Bucci et al., 1997; Salomon et al., 1995; Grandis et al., 1996; Rieske et al., 1998; Goike et al., 1999; Messa et al., 1996). Tatsächlich ist eine Korrelation von EGFR Überexpression und fortgeschrittenem Tumorstadium, Tumorprogreß, Überleben und Therapieansprechen für eine Vielzahl humaner Malignome beschrieben worden (Wells, 2000). Zahlreiche Studien haben belegt, daß die Überexpression des EGFR bei einer Reihe von Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose der Patienten einher geht (Bartlett et al., 1996; Grandis et

al., 1998; Chow et al., 1997; Volm et al., 1998; Maurizi et al., 1996). Auch wenn diese Korrelation von EGFR Überexpression und ungünstigem klinischen Verlauf überzeugend erscheint, so besteht derzeit noch keine direkte Ursachen- und Effektbeziehung. Es erscheint wahrscheinlich, daß nicht eine einfache arithmetische Quantifizierung von EGFR, sondern die spezifische Zugehörigkeit zu einem speziellen Zelltyp oder Gewebe für den wachstumsfördernden EGFR Signalweg von entscheidender Bedeutung ist.

1.3 EGFR Variationen

Die Überexpression von EGFR in autokrin regulierten Karzinom- und Gliomzellen ist als Teil der neoplastischen Progression häufig mit der Expression mutierter EGFR Formen assoziiert (Frederick et al., 2000; Huang et al., 1997; Moscatello et al., 1995; Nagane et al., 1996; Nishikawa et al., 1994). Die häufigste EGFR Variation ist EGFRvIII, welche durch eine Deletion der Exone 2-7 des EGFR Gens mit 801 fehlenden kodierenden Basen (cDNA Nukleotide 275 – 1075) hervorgerufen wird (Huang et al., 1997). Durch diese Deletion kommt es zu einer Elimination der Aminosäuren 6-273 der extrazellulären Subdomänen I und II und der Cystein- reichen EGF- Bindungsstelle des EGFR (Batra et al., 1995; Nishikawa et al., 1994). Diese Variation des EGFR führt zu einer konstant aktiven Tyrosinkinase, welche Liganden- unabhängig eine Zelltransformation verursachen kann. Eine Liganden- Bindung ist nicht möglich (Moscatello et al., 1996; Wong et al., 1992). EGFRvIII ist nicht in Normalgeweben zu finden, wird jedoch auf der Zellmembran verschiedener Tumoren und von 50% aller malignen Gliome exprimiert, weiterhin in zahlreichen Prostatakarzinomen, nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Ovarialkarzinomen (Moscatello et al., 1995;

Frederick et al., 2000). Mechanistische Studien zur Charakterisierung der besonderen Funktionen des EGFRvIII waren bislang nur begrenzt möglich aufgrund der Tatsache, daß dieser Rezeptor nur *in vivo* exprimiert und in Tumorzellen *in vitro* rasch herunterreguliert wird (Bigner et al., 1990). Daher hat man sich in den meisten Studien bislang auf die Definition der Transformationsaktivität und der Effekte auf nachgeschaltete Signaltransduktionswege konzentriert (Montgomery et al., 1995; Huang et al., 1997; Antonyak et al., 1998). Demgegenüber wurde die Rolle von EGFRvIII bei der zellulären Antwort auf genotoxischen Streß, wie beispielsweise Bestrahlung oder zytotoxische Therapie, nur unzureichend untersucht, und wird daher in der vorliegenden Arbeit analysiert.

1.4 EGFR Expression in humanen Tumoren

EGFR wird in Normalgeweben in einer Größenordnung von 20000 bis 200000 Rezeptoren pro Zelle exprimiert. Diese Rezeptoranzahl kann in malignen Zellen wesentlich höher liegen. MDA-468 Mammakarzinomzellen beispielsweise, bei denen das EGFR-Gen amplifiziert ist und zu einer Überexpression des Rezeptors führt, können bis zu 2 Millionen Oberflächen EGF- Rezeptoren pro Zelle aufweisen. Tumorzellen in Kultur sind üblicherweise weniger von exogenen Wachstumsfaktoren für Proliferation und Überleben abhängig als Normalzellen. Dies liegt höchstwahrscheinlich an der autokrinen Stimulation des Rezeptors durch Eigenproduktion von EGF oder TGF- α durch die Tumorzellen. Hierbei wird der Regulationskreislauf durch Bindung an den Rezeptor geschlossen. In diesem Zusammenhang wurde eine Koexpression von EGF und TGF- α für etwa 40% der Bronchialkarzinome nachgewiesen (Rusch et al., 1993). Studien an MDA-468 Mammakarzinomzellen ergaben den Nachweis eines TGF-

α ähnlichen Liganden, welcher in das Zellkulturmedium sezerniert und mit der Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor konkurriert (Ennis et al., 1991). Demzufolge sind Tumorzellen für ein kontinuierliches Überleben weniger von einer erhöhten Expression an EGFR, sondern eher von einem funktionierenden autokrinen Regelkreis abhängig. Die Höhe der EGFR- Expression und Aktivität variiert je nach Tumorentität stark, zum Teil auch bedingt durch unterschiedliche Nachweismethoden. Die Streuung an ermittelten EGFR Überexpressionen für eine bestimmte Tumorentität in verschiedenen Studien ist in Tabelle 1 aufgeführt. Trotz der starken Variation deutet dies auf eine erhöhte EGFR- Expressionsrate bei zahlreichen Tumorentitäten hin.

Tabelle 1: EGFR- Überexpression in ausgewählten humanen Tumoren

Tumorentität	EGFR- Expression in Tumoren (Streuung in Literatur)	Expression in entsprechenden Normalgeweben	Autoren
NSCLC	40 – 80 %	+	Salomon ('95), Rusch ('97) Fontanini ('98), Fujino ('96)
Nierenzell – CA	50 – 90 %	+	Salomon ('95), Yoshida ('97)
Mamma – CA	14 – 91 %	+	Klijn ('92), Walker ('99) Beckman ('96), Bucci ('97)
Ovarial – CA	35 – 70 %	31 %	Salmon ('95), Fisher – Colbrie ('97), Bartlett ('96)
Gliome	40 – 50 %	-	Salomon ('95), Rieske ('98) Ekstrand ('91)
Pankreas – CA	30 – 50 %	+	Salmon ('95), Uegaki ('97)
Kopf- Hals CA	80 – 100 %	+	Salomon ('95), Grandis ('96)
Kolon – CA	25 – 77 %	+	Salomon ('95), Messa ('98)
Blasen – CA	31 – 48 %	nur Basalepithel	Salomon ('95), Chow ('97)

Die Ergebnisse einiger Studien am Tiermodell lassen vermuten, daß die EGFR-Expression in Metastasen noch größer als im Primärtumor ist. Eine erhöhte EGFR-Expression wurde beispielsweise in Metastasen humaner Kolon- Karzinomzellen gefunden, nicht aber im korrespondierenden Primärtumor. In Tumoren mit hoher metastatischer Tendenz fanden sich um mehr als fünffach höhere Konzentrationen von EGFR-mRNA als bei Tumoren mit geringer Metastasenfrequenz (Radinsky et al., 1995).

1.5 EGFR- Expression als Prognosefaktor

Aufgrund der häufigen Überexpression von EGFR in Tumoren und den präklinischen Daten, welche EGFR eine Rolle bei der Tumor- Progression zuschreiben, wurden zahlreiche Studien eingeleitet, um EGFR als einen möglichen Prognosemarker für Tumor- Patienten zu untersuchen. Die Bedeutung von EGFR als Prognoseindikator wird gegenwärtig in der Literatur kontrovers diskutiert. In einigen Studien gibt es Hinweise für eine mögliche Assoziation von EGFR- Expression und erhöhtem Rezidivrisiko, verminderter Überlebensrate, höherem Tumorstadium und vermehrtem Metastasierungsrisiko (Bartlett et al., 1996; Volm et al., 1998; Maurizi et al., 1996; Fischer-Colbrie et al., 1997). Zum Beispiel scheint das EGFR- Expressionsniveau bei Patienten mit Kopf- Hals- Karzinomen der zur Zeit valideste Prognoseparameter für das Rezidivrisiko zu sein. Grandis et al. fanden heraus, daß in Ergänzung zu EGFR die TGF- α Expression ebenfalls einen Prognosefaktor bei Kopf-Hals- Karzinomen darstellte und daß beide Marker mit dem krankheitsfreien Überleben korrelieren (Grandis et al., 1996; Grandis et al., 1998). Für Blasenkarzinome korrelierte die Expression von EGFR, TGF- α und EGF mit einem erhöhtem Rezidivrisiko (Chow et al., 1997; Turkeri et al.,

1998). Eine signifikante Korrelation von EGFR- Expression und verkürztem Überleben und/oder verkürztem krankheitsfreien Intervall ließ sich für Ovarial- und Kehlkopftumoren sowie nodal-positive Mamma- und Plattenepithelkarzinome der Lunge ermitteln (Volm et al., 1998; Maurizi et al., 1996; Torregrosa et al., 1997). Bei Ovarialkarzinomen hatten Patienten mit einer erhöhten EGFR- Expression eine höhere Wahrscheinlichkeit, an einem Tumorrezidiv zu erkranken (Fischer-Colbrie et al., 1997). Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu den bislang veröffentlichten Daten der prognostischen Bedeutung von EGFR.

Tabelle 2: Prognostische Bedeutung von EGFR für ausgewählte humane Tumoren

Tumorentität	Beobachtungen	Autoren
Nicht kleinzelliges BC	EGFR- Expression korreliert mit verkürztem Gesamtüberleben, Korrelation mit schlechter Prognose, Korrelation mit hoher Metastasierungsrate	Volm ('98) Veale ('93) Pavalic ('93)
Mamma – CA	Im kurzen Zeitintervall (1-4 Jahre) Korrelation von EGFR- Expression mit Gesamtüberleben und der Rezidiv-freien Zeit; Korrelation nach 10 Jahren nicht signifikant Negative Korrelation von EGFR und ER/PR Status	Klijn ('92) Klijn ('94) Klijn ('92)
Ovarial – CA	Korrelation mit schlechter Prognose, Korrelation mit schlechtem Gesamtüberleben und Rezidiv-freiem Überleben, Assoziation von EGFR- und Chemotherapieresistenz	Bartlett ('96) Fischer-Colbrie ('97) Niikura ('97)
Gliome	Korrelation von EGFR- Expression und Differenzierungsgrad	Ekstrand ('91)
Pankreas – CA	Koexpression von EGFR- und EGF-TGF assoziiert mit fortgeschrittenem Stadium, Tumorgröße, verkürztem Überleben	Yamanaka ('93)
Kopf- Hals CA	EGFR signifikanter Prädiktor des krankheitsfreien Überlebens, Korrelation mit Gesamtüberleben bei Larynxkarzinomen	Grandis ('98) Maurizi ('96)
Kolon – CA	Erhöhte EGFR-Expression als Prognoseparameter	Mayer ('93)
Blasen – CA	EGFR- Expression zeigte erhöhtes Rezidivrisiko Erhöhte EGFR- Expression in invasiven Tumoren	Chow ('97) Turkeri ('98) Neal ('89)

1.6 EGFR als Prädiktor des Therapieansprechens

Bei EGFR- überexprimierenden Zell- Linien wurden in präklinischen Studien Veränderungen in der Chemosensitivität festgestellt. In EGFR- positiven Nierenzellkarzinomen fanden sich erhöhte Mengen der „drug-resistance“ Proteine Topoisomerase II und P-Glycoprotein. In einer Untersuchung fanden sich unter den EGFR- exprimierenden Bronchialkarzinomen signifikant mehr cisplatin-resistente als cisplatin-sensitive Tumoren (Ogawa et al., 1993). Bei Patientinnen mit EGFR- positiven oder TGF- α exprimierenden Ovarialkarzinomen zeigte sich ebenfalls ein geringeres Ansprechen auf Cisplatin- haltige Chemotherapien, im Vergleich zu mit Patientinnen mit niedrigem EGFR- Niveau (Fischer-Colbrie et al., 1997). Auch wurde bei Patienten mit Kopf- Hals- Karzinomen eine verminderte Ansprechwahrscheinlichkeit auf eine Chemotherapie ermittelt, wenn die EGFR- Expression der Tumoren bei über 100 fmol/mg Protein betrug (Santini et al., 1991; Etienne et al., 1999).

Weiterhin wurde von einer Assoziation von EGFR- Expression und klinischer Strahlenresistenz berichtet. Bei Kopf-Hals- Karzinomen wurde eine inverse Korrelation von EGFR- Überexpression und Ansprechen auf die Strahlentherapie gefunden (Maurizi et al., 1996). Die EGFR- Expression erwies sich bei Patienten mit einem astrozytären Gliom nach einer Strahlentherapie als signifikanter unabhängiger prognostischer Parameter für das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben (Zhu et al., 1996). Kürzlich wurde berichtet, daß Patientinnen mit einem Residual- oder Rezidivtumor nach einer Strahlentherapie eines Zervixkarzinoms eine höhere EGFR- Expression im Primärtumor hatten als solche, die tumorfrei waren (Pillai et al., 1998). Andere Autoren fanden eine inverse Korrelation von EGFR- Expression und

Radiokurabilität für murine Karzinome (Akimoto et al., 1999). Die Zugabe von EGF führte in Zellkulturen zu einer Radioprotektion, wohingegen eine Behandlung mit einem Antikörper gegen EGFR den gegenteiligen Effekt einer Strahlensensibilisierung zur Folge hatte (Balaban et al., 1996).

Zusammenfassend lassen die bisherigen Daten vermuten, daß eine erhöhte EGFR-Expression mit einer vermehrten Chemo- und/oder Radioresistenz der Tumoren verbunden ist. Diese Erkenntnis hat auch die Erforschung der gezielten Modulation der EGFR- Funktion als eine neue therapeutische Option stimuliert. Die vorhandenen Daten sind aber noch unzureichend und zu unvollständig, um die EGFR- Expression als einen Prädiktor für das Ansprechen auf eine Chemo- und/oder Strahlentherapie definieren zu können.

1.7 Die potenziellen therapeutischen Ansätze einer EGFR- Hemmung und ihre relative Effektivität

Zur Ausschaltung der EGFR- Funktion werden zur Zeit drei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste ist die Produktion und detaillierte Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen den Rezeptor. Von diesen ist C225 am besten bekannt, weil dieser Antikörper die Liganden- Bindungsstelle für EGF- oder TGF- α hemmt und auf diese Weise mit den physiologischen Prozessen des Rezeptors interferiert. Ausgedehnte Studien haben gezeigt, daß die Effekte von C225 auf die Tumorzellproliferation, die Chemo- und Strahlensensitivität und das Tumorwachstum *in vivo* möglicherweise durch Interferenzen mit der Tumorzell- Angiogenese bedingt sind (Milas et al., 2000; Huang et al., 2000). Diese Experimente wurden überwiegend mit

Karzinomzell- Linien durchgeführt, welche hauptsächlich durch EGFR wachstumsreguliert sind. In anderen Zell- Linien wie malignen Gliomzellen oder Mammakarzinomzellen könnte jedoch das Wachstum durch andere ErbB- Rezeptoren als EGFR reguliert sein, so daß C225 wahrscheinlich eher eine eng begrenzte therapeutische Applikationsbreite haben wird.

Der andere wichtige Therapieansatz zur Hemmung der EGFR- Funktion besteht in der chemischen Hemmung der Tyrosinkinase- Domänen des EGFR- oder der ErbB- Rezeptoren allgemein. Diese pharmakologischen Hemmstoffe, auch "small molecules" genannt, sind konkurrierende Substrate für die Kinase und blockieren die Enzymdomäne. Als pharmakologische Hemmstoffe wurden bislang CI-1033® (Park-Davis) und ZD 1839® (Astra- Zeneca) entwickelt und charakterisiert. In ersten Untersuchungen wurden bereits sensibilisierende Wirkungen für Chemotherapeutika und Bestrahlung nachgewiesen. Demgegenüber gibt es nur sehr wenige Untersuchungen zu den Mechanismen, welche diesen Sensibilisierungen zugrunde liegen. Hierzu gehören insbesondere die Strahlensensibilisierungseffekte. Die aktuelle Entwicklung der Tyrophostin- Kinase- Hemmstoffe besteht aus der neuen Generation von Hemmstoffen mit einem breiten Spektrum an ErbB- Aktivität und einer irreversiblen Hemmung der Kinasedomänen (CI-1033®). Auch diese Effekte werden aufgrund des ErbB- Rezeptor „turnover“ weniger konstant sein können als beispielsweise ein genetischer Ansatz, der in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird. Der dritte Therapieansatz beinhaltet diesen genetischen Ansatz einer Überexpression eines dominant-negativen EGF- Rezeptors, der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls genauer definiert wird.

1.8 EGFR und Bestrahlung

Neuere strahlenbiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Bestrahlung von Säugetierzellen in klinisch relevanten Dosisbereichen zu einer Aktivierung existierender zellulärer Signaltransduktionswege führt. Diese Signaltransduktionswege, welche überwiegend Proteinkinasen einbeziehen, vermitteln zytoprotektive und zytotoxische Antworten von Zellüberleben bis zum Zelltod. Zytoprotektive Antworten beziehen Signalkaskaden der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) und der Phosphatidylinositol-3-Phosphatkinase (PI3K) ein, welche die biosynthetische Kaskade aktivieren und möglicherweise die Zellproliferation stimulieren. In vorausgehenden Arbeiten wurde gezeigt, daß EGFR beziehungsweise die ErbB- Rezeptor Tyrosinkinasen bei diesen strahlen- induzierten zellulären Signaltransduktionsantworten eine wichtige Rolle spielen (Schmidt-Ullrich et al., 1996; Schmidt-Ullrich et al., 1997; Schmidt-Ullrich et al., 1999; Reardon et al., 1999). Es wurde eine EGFR- Abhängigkeit der strahlen- induzierten Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) und der MAPK Kaskade sowie der strahlen-induzierten proliferativen Antwort, welche für normale und neoplastische Plattenepithelien beschrieben worden war, nachgewiesen (Denekamp, 1973). Möglicherweise werden die strahlen- induzierten zytoprotektiven Antworten einer Zelle sogar auf der Ebene der Membran durch Aktivierung der ErbB- Rezeptor- Tyrosinkinasen und anderer beteiligter Moleküle eingeleitet (Chae et al., 1993). Deshalb könnte eine Ausschaltung dieser Rezeptorfunktion eine Strahlensensibilisierung der Tumorzelle bewirken.

2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG:

Der epidermale Wachstumsfaktor- Rezeptor EGFR und die übrigen ErbB- Rezeptor-Tyrosinkinase sind in die autokrine Wachstumsregulation vieler Karzinom- und malignen Gliomzellen eingebunden (Chryssogelos und Dickson, 1994; Ekstrand et al., 1991; Alimandi et al., 1995; Westphal et al., 1997). Es wurde in vorhergehenden Untersuchungen gezeigt, dass die Behandlung der Tumorzellen mit ionisierenden Strahlen im therapeutischen Dosisbereich von 1 bis 5 Gy zu einer unmittelbaren Aktivierung von EGFR führt (Schmidt-Ullrich et al., 1996; Contessa et al., 1999; Lammering et al., 2001) und dass die wiederholte Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy eine Erhöhung der Expressionsrate von EGFR induziert (Schmidt-Ullrich et al., 1994). Die Aktivierung des EGFR durch Bestrahlung war durch eine mehrfache Zunahme der Tyrosin- Phosphorylierung definiert, welche gegenwärtig nicht von einer Liganden-induzierten Aktivierung zu unterscheiden ist (Schmidt-Ullrich et al., 1996; Goldkorn et al., 1997; Kavanagh et al., 1995; Schmidt-Ullrich et al., 2000; Carter et al., 1998). Zusätzlich folgt auf eine strahlen-induzierte EGFR Aktivierung eine dosisabhängige proliferative Zellantwort, welche *in vitro* sowohl nach Einzel- (Kavanagh et al., 1995) als auch nach wiederholten Bestrahlungen nachweisbar war (Contessa et al., 1999; Reardon et al., 1999). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die strahleninduzierte Aktivierung von EGFR zumindest in großen Teilen an den Mechanismen der akzelerierten Proliferation beteiligt ist (Schmidt-Ullrich et al., 2000; Schmidt-Ullrich et al., 1997; Schmidt-Ullrich et al., 1999; Withers et al., 1988). Die akzelerierte Proliferation oder Repopulierung nach wiederholten Bestrahlungen ist eine Antwort von akut reagierenden Normalgeweben und von Tumoren. Die Hinweise für eine akzelerierte Proliferation stammen aus experimentellen Daten an der Mausehaut

(Denekamp, 1973). Viele ähnliche Studien sind mittlerweile an akut reagierenden, schnell regenerierenden Normalgeweben durchgeführt worden und zeigen eine gleiche Regenerations- Zellkinetik (Withers et al., 1988; Bentzen und Thames, 1991). Die Erkenntnis, daß eine akzelerierte Proliferation die Effektivität der fraktionierten Bestrahlung in der klinischen Strahlentherapie negativ beeinflusst, beruht auf retrospektiven strahlenbiologischen Analysen und klinischen Erfahrungen. Tumorkontrolldaten für Plattenepithelkarzinome der Kopf- Halsregion mit einem breiten Spektrum verschiedener Fraktionierungsschemata und variierenden Behandlungszeiten zeigten eine inverse Beziehung von Gesamtbehandlungszeit und Tumorkontrollwahrscheinlichkeit. Unter der Annahme zuverlässiger Tumoransprechparameter besteht eine lineare Beziehung zwischen Behandlungszeit und Tumorkontrollwahrscheinlichkeit für die ersten 4 Wochen der Strahlentherapie. Nach der vierten Woche kommt es zu einem Wendepunkt. Danach nimmt die Rate an Therapieversagern mit Verlängerung der Behandlungszeit zu (Withers et al., 1988). Diese Beobachtung wurde als Dominanz der akzelerierten Proliferationsantwort von Tumorklonen in dem letzten Teil eines Strahlentherapieekurses bei Kopf- Halskarzinomen interpretiert und durch weitere klinische Analysen bestätigt (Withers et al., 1995). Obwohl das Konzept der akzelerierten Proliferation als eine der Ursachen für Therapieversagen breite Akzeptanz gefunden hat, wird der zeitliche Beginn dieser proliferativen Antwort während einer fraktionierten Strahlentherapie weiterhin kontrovers diskutiert. Es gibt einige Analysen, welche den Beginn der proliferativen Antwort zu einem erheblich früheren Zeitpunkt beschreiben (Bentzen et al., 1991; Fowler et al., 1992). Dieses Konzept wird durch neuere klinische Untersuchungen gestützt, welche zeitlich verkürzte Strahlentherapieekurse in der Form akzelerierter Regime erforschen. Ein akzeleriertes hyperfraktioniertes Regime und eine derzeit

laufende randomisierte klinische Studie, die verschiedene Therapieregime vergleicht, belegen um 10 bis 30% verbesserte Tumorkontrollraten und vereinzelt sogar verbesserte Überlebensraten im Vergleich zu Standardtherapieregimen mit einer einmal täglicher Bestrahlung (Ang und Peters, 1992; Schmidt-Ullrich et al., 1991; Wang, 1988).

Neuere strahlenbiologische Studien versuchen, die molekularen Mechanismen der strahlen- induzierten akzelerierten Proliferation zu ergründen. Es wurde ein Einfluß kritischer Wachstumsregulations- Genfaktoren bei der Antwort autokrin wachstumsregulierter humaner Karzinom- und Gliomzellen auf eine Einzelbestrahlung und wiederholte Bestrahlungen nachgewiesen. Es gibt aber auch zunehmend Hinweise darauf, daß die strahlen- induzierten Aktivierungen der existierenden Signaltransduktionswege wesentlich an der zellulären proliferativen Kontrolle beteiligt sind (Schmidt-Ullrich et al., 1997; Schmidt-Ullrich et al., 1999). Die unmittelbare strahlen- induzierte Aktivierung der ErbB- Rezeptor- Tyrosinkinasen und sekundäre Effekte der TGF- α - Absonderung zu einem späteren Zeitpunkt spielen eine kritische Rolle bei der Signaltransduktionskaskade, welche die MAPK, PI3K und Transkriptionsaktivierungen einbezieht und eine anti- apoptotische und pro- proliferative Antwort der Zelle zur Folge hat. Aus dem Zusammenhang zwischen strahlen- induzierter Aktivierung der ErbB Rezeptor- Tyrosinkinasen und MAPK/PI3-K wurde gefolgert, daß diese Aktivierung den zugrundeliegenden Mechanismus der akzelerierten Repopulation darstellt.

Die erhöhte biosynthetische Aktivität der rasch proliferierenden Tumorzellen führt sehr wahrscheinlich zu einer erhöhten Reparatur- Kapazität von DNA- Schäden. Da sowohl

die proliferative Reaktion als auch die DNA- Reparatur- Antwort der Tumorzelle den toxischen Effekten der Strahlentherapie entgegenwirken, haben wir diese als zytoprotektiv definiert. Die kritische Rolle von EGFR bei der Initiierung dieser zytoprotektiven Prozesse wird durch die Beobachtung gestützt, daß die Aktivierung der nachgeschalteten Komponenten auf jedem Niveau der zytoprotektiven Signalkaskade auf die Aktivierung des EGFR angewiesen sind. Das trifft für PLC γ , die Veränderungen in der Ca²⁺ Homeostase, MAPK, PI3-K, den Zellzyklusregulator p21 CIP-1, den Transkriptionsfaktor Elk-1 und die allgemeine zelluläre proliferative Antwort zu. (Schmidt-Ullrich et al., 1999). Somit müßte bei dieser besonderen Funktion des EGFR bei der Einleitung der zytoprotektiven Antworten auf eine Bestrahlung die Ausschaltung der EGFR- Funktion zu einer Verhinderung der zytoprotektiven Antwort der Tumorzelle und damit zu einer erhöhten Strahlensensitivität führen.

Die entscheidende Zielsetzung dieser Arbeit war somit, den therapeutischen Wert der Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung des EGFR als zukunftsweisende Strategie zur Erhöhung der Strahlensensibilität an einem breiten Spektrum verschiedener Tumorzellen zu überprüfen und zu testen.

Aus Gründen der Spezifität und breiten Anwendbarkeit entschieden wir uns zur Hemmung der EGFR- Funktion für einen genetischen Ansatz der Überexpression eines dominant-negativen EGFR-CD533. Bei EGFR-CD533 handelt es sich um eine dominant-negative Variante von EGFR, welcher die gesamte zytoplasmatische Domäne mit insgesamt 533 Aminosäuren fehlt. Hierdurch sind keine Transformations- oder Proliferationsaktivitäten mehr gegeben, es bleibt jedoch die transmembrane Lokalisation sowie die Fähigkeit zur Dimerisierung erhalten (Abb. 3). In früheren

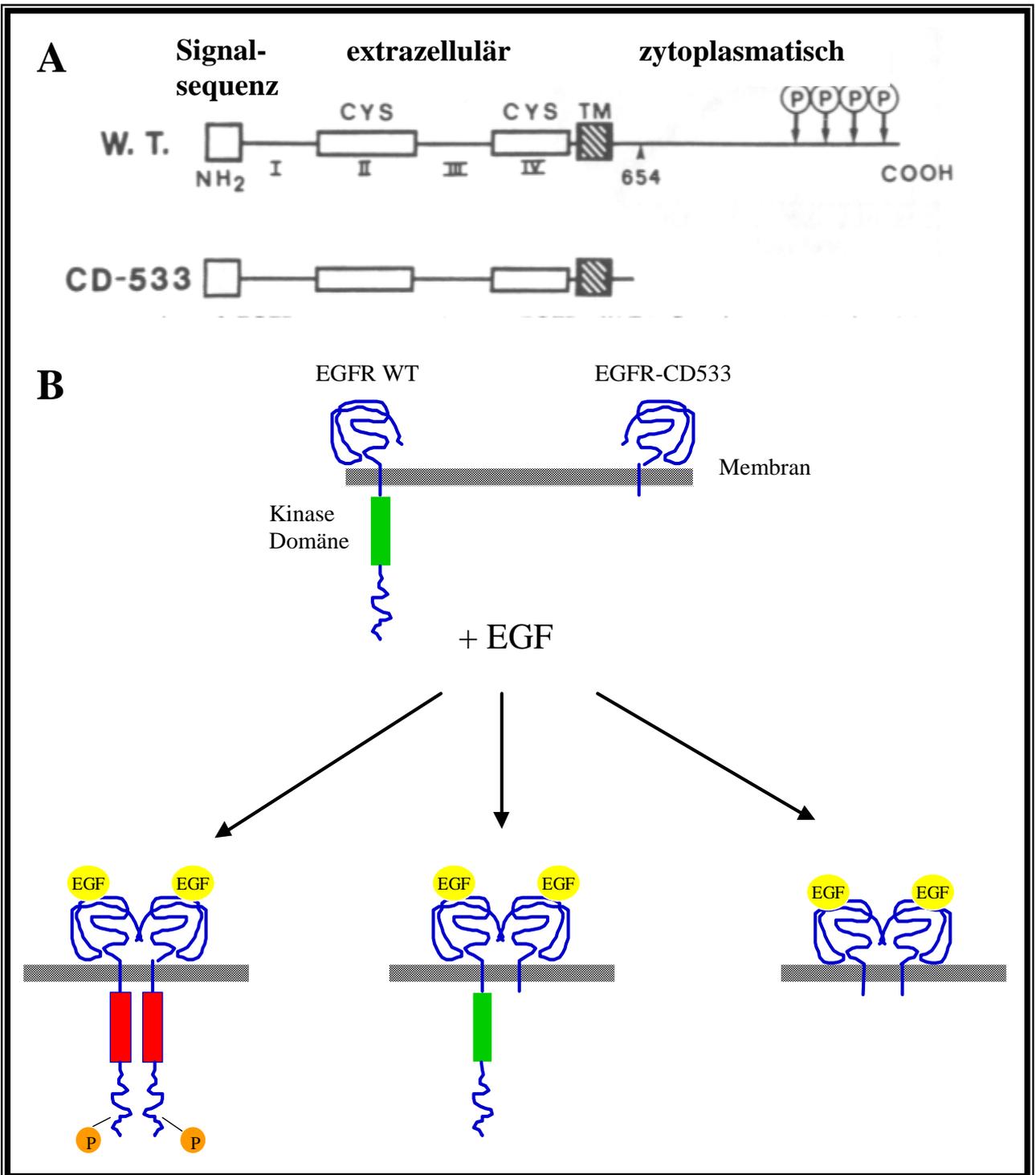


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus von EGFR und der dominant negativen Mutante des EGFR, EGFR-CD533. A: Beide Rezeptoren haben einen identischen extrazellulären und transmembranösen (TM) Aufbau. EGFR-CD533 fehlen die letzten 533 Aminosäuren im zytoplasmatischen Anteil ab Aminosäure 653. **B:** Modell der dominant-negativen Wirkung von EGFR-CD533. EGF induziert die Formation von Homodimeren mit EGFRwt- oder CD533- Rezeptoren (I,III) und Heterodimeren, die aus EGFRwt und EGFR-CD533- Rezeptoren zusammengesetzt sind. Nur Homodimere mit EGFRwt- Rezeptoren werden aktiviert und autophosphoryliert. Die Anwesenheit von defekten mutierten Rezeptoren erzeugt unproduktive Heterodimere, welche die Konzentration an aktiven Homodimeren reduzieren. Hierdurch wird die Funktion von normalem EGFRwt unterdrückt.

Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die Überexpression von EGFR-CD533 in

stabil exprimierenden MDA-MB-231 Zellen zu einer kompletten Hemmung der strahlen-induzierten Aktivierung des EGFR mit sekundärer Hemmung der MAPK- Aktivierung und der strahlen-induzierten Proliferationsantwort führt (Schmidt-Ullrich et al., 2000; Schmidt-Ullrich et al., 1999; Contessa et al., 1999; Reardon et al., 1999).

Wir entschieden uns aus zwei Gründen für einen genetischen Therapieansatz:

1. Ionisierende Strahlung aktiviert EGFR, aber auch alle anderen ErbB-Rezeptoren, die in einer vorgegebenen Tumorzelllinie exprimiert werden. Die Überexpression des dominant-negativen EGFR-CD533 unterbricht die Funktion des gesamten ErbB- Rezeptor- Tyrosinkinase- Netzwerkes über Rezeptor-Protein Interaktionen als Konsequenz der Homo- und Heterodimerisierung, welche unabhängig von den variierenden Rezeptor-Expressionsprofilen der verschiedenen Tumorzell- Linien Bestand hat.
2. Viele Karzinom - und maligne Gliomzell- Linien exprimieren weiterhin eine hohe Zahl an mutierten EGFR- Spezies *in vivo*, wie zum Beispiel EGFRvIII, welcher die NH₂-terminale EGF-Bindungsstelle fehlt. Diese Rezeptoren sind konstant aktiv und werden mit derzeitig verfügbaren monoklonalen Antikörpern kaum, dafür aber mit EGFR-CD533 gehemmt.

Um den genetischen Therapieansatz als geeignetes gentherapeutisches Verfahren an verschiedenen Zell- Linien *in vitro* und auch präklinisch *in vivo* testen und weiterentwickeln zu können, bedurfte es des Einsatzes eines Vektorsystems. Hierzu wählten wir replikations-inkompetente Adenoviren als die für unsere Untersuchungen

am besten geeignete Vektoren, da bereits hinreichende Erfahrungen mit diesem Vektorsystem bestanden und adenovirale Vektoren auch unter Berücksichtigung eines späteren klinischen Einsatzes eine Reihe von Vorteilen besitzen.

Diese sind:

- hohe Infektiosität,
- Replikations-Inkompetenz mit somit kurzer Verweildauer in der transduzierten Zelle,
- virale DNA (inclusive Transgen) bleibt extrachromosomal,
- transiente Expression des Transgens dauert maximal 4 Wochen.

Eine weitere wichtige Zielsetzung waren Untersuchungen zu modulierenden Effekten der natürlich vorkommenden mutierten EGFR- Spezies EGFRvIII auf die akuten zellulären Strahlenantworten und mögliche Einflüsse auf das zelluläre Überleben nach einer Bestrahlung. Des Weiteren sollte die Möglichkeit einer funktionellen Beeinflussung des EGFRvIII durch genetische Hemmung mittels EGFR-CD533 analysiert und überprüft werden.

Zusammenfassend lassen sich die Fragestellungen der nachfolgend dargestellten Untersuchungen wie folgt beschreiben:

1. Ist die gentherapeutische Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung des EGFR durch dominant-negatives EGFR-CD533 als ein Ansatz zur Erhöhung der Strahlensensibilität bei verschiedenen Tumorzellen geeignet ?

2. Führt die intratumorale Infusion EGFR-CD533 exprimierender adenoviraler Vektoren im Sinne eines weiterentwickelten gentherapeutischen Verfahrens zu einer Strahlensensibilisierung humaner Karzinome und maligner Gliome ?
3. Ist durch die Expression der natürlichen mutierten Variante des EGFR, d.h. des EGFRvIII, ein modulierender Effekt bei der akuten Strahlenantwort und dem Überleben der Zelle zu erreichen ?
4. Kann die adenovirale Expression des EGFR-CD533 die funktionelle Wirkung von EGFRvIII beeinflussen oder sogar hemmen ?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.2.1 Reagenzien und Zell- Linien

Protease- und Phosphatase- Inhibitoren sowie alle anderen verwendeten Reagenzien wurden, soweit nicht anderweitig vermerkt, von der Firma Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) bezogen. Den EGFR- Tyrosinkinase- Inhibitor Tyrphostin AG1478 erhielten wir von Calbiochem (San Diego, CA), und EGF von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Alle elektrophoretischen Reagenzien stammten von BioRad (Hercules, CA). Die Nährmedien MEM- α für die Gliomzellen sowie RPMI 1640 für die Karzinomzell- Linien und die Penicillin-Streptomycin Antibiotika lieferte GIBCO-BRL (Rockville, MD), fetales Rinderserum (FBS) stammte von Intergen (Purchase, NY) und Tetracyclin- freies FBS von Clontech Laboratories (Palo Alto, CA).

Die folgenden immunologischen Reagenzien von Neo Markers (Fremont, CA) wurden genutzt: Der monoklonale Antikörper (mAb) Cocktail (Ab14), welcher sowohl mit der COOH- als auch mit der NH₂- terminalen Domäne von EGFR reagiert, der anti-ErbB2 mAb Cocktail (Ab10), ebenfalls mit der extrazellulären und zytoplasmatischen Domäne von ErbB2 reagierend, und schließlich anti-ErbB3 mAb (Ab7) und anti-ErbB4 mAb (Ab4), beide mit der zytoplasmatischen Domäne von ErbB3 beziehungsweise ErbB4 reagierend. Andere mAb waren: anti-EGFR mAb von der Firma Transduction Laboratories (PharMingen/Transduction Laboratories, Lexington, KY), der anti-EGFRvIII mAb, DH8.3 (AbCam Limited, Cambridge), der mit der NH₂ terminalen Mutation des EGFR in Wechselwirkung trat. Der immunopräzipitierende anti-EGFR mAb (Ab5) und der anti-Tyr-P mAb (Ab2) wurde von Oncogene Science (Cambridge,

MA) und der sekundäre Ab, ein anti-Maus Alkalin Phosphatase Konjugat von Promega (Madison, WI) bezogen. Protein A Agarose stammte von BioRad (Hercules, CA) und Protein G Plus/ Protein A Agarose von Oncogene Science (Cambridge, MA). Die Ab gegen p42/44 MAPK (ERK2) (C-14) und Akt (N-19) wurden als Agarose Konjugate von der Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, CA) hergestellt. Myelin Basis Protein (MBP) als Substrat für MAPK (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) oder Akt (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) wurden als Vorrat von 10 mg/ml für MAPK und 5 mg/ml für Akt in H₂O verwendet.

Das pCL6- Plasmid wurde als leere Vektorkontrolle benutzt. Die cDNA's für EGFRwt und EGFR-CD533, welches die COOH- terminalen 533 Aminosäuren von EGFR nicht codiert (Redemann et al., 1992; Kashles et al., 1991), wurden von A. Ullrich (Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Das p β Ac.EGFRVIII Plasmid erhielten wir von D. Bigner (Dept. of Pathology, Duke University, Durham, NC; (Batra et al., 1995). Das pSL 1180-EGFRM- Plasmid zur Herstellung der Adenoviren für die EGFRVIII- Expression wurde von S. Batra (Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Universität Nebraska Medical Center, Omaha, NE) bezogen.

Die menschliche Mammakarzinomzell- Linien MDA-MB-231 und T-47D, die menschliche Plattenepithelkarzinomzelllinie A-431, die menschlichen Gliomzell- Linien U-373 MG und U-87 MG, die Chinesische Hamster Ovar Zelllinie (CHO) und die HEK 293 Zelllinie erhielten wir von der „American Type Tissue Collection“ (ATTC; Rockville, MD). Die MDA-TR15-EGFR-CD533 Zelllinie (MDA-EGFR-CD533) wurde durch stabile Transfektion der MDA-MB-231 Zellen mit einem Plasmid, welches EGFR-CD533 cDNA enthält, unter Kontrolle eines Doxycyclin (Dox)- induzierbaren Promotors entwickelt.

Alle Zell- Linien wurden bei 37°C in einem Gemisch aus 95% Luft und 5% CO₂ unterhalten, mit Ausnahme der Bestrahlung, welche bei 20°C Raumtemperatur in atmosphärischer Luft durchgeführt wurde. Die Zell- Linien MDA-MB-231, MDA-EGFR-CD533, A-431 und CHO wurden mit dem Nährmedium RPMI1640, 5% FBS (RPMI/5FBS), und einem Antibiotika- Zusatz aus Penicillin und Streptomycin gehalten. T-47 D Zellen benötigten RPMI/10 FBS, während die malignen Gliomzell- Linien U-87 MG und U-373 MG mit MEM- α /10FBS angereichert wurden. Vor einer Bestrahlung oder einer Behandlung mit EGF wurden die Zellen 16 Stunden lang in einem Medium mit reduziertem Serumgehalt von 0,5% FBS kultiviert (Contessa et al., 1999; Reardon et al., 1999). Alle Zell- Linien wurden monatlich mit Hilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) getestet, um eine Mycoplasma- Kontamination auszuschließen.

3.1.2 Rekombinante Adenoviren

Replikations- inkompetente Adenoviren wurden im Labor von K. Valerie am Medical College of Virginia im Dept. of Radiation Oncology produziert (Valerie, 1999; Valerie et al., 2000). Die adenoviralen Vektoren, welche EGFR-CD533 cDNA (Ad-EGFR-CD533), das bakterielle LacZ- Reporter- Gen als Kontrolle (Ad-LacZ), oder EGFRvIII cDNA (Ad-EGFRvIII) enthalten, wurden in HEK- 293 Zellen erzeugt und mit etablierten Techniken gereinigt (Valerie et al., 2000; Brust et al., 2000). Ad-EGFRvIII wurde zum Beispiel durch Transferierung eines SapI-XbaI Fragmentes aus dem Plasmid pSL- 1180-EGFRM hergestellt, welches die kodierende Sequenz für EGFRvIII in das pZeroTGCMV- Plasmid enthält, mit sequenzieller Rekombinierung in Bakterien (Valerie, 1999; Valerie et al., 2000). Die Titrierung durch Standard- Plaque- Assays ergab typische Titer von 2 bis 4 x 10¹¹ „plaque-forming-units“ (pfu) pro ml. Die

Adenoviren wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in kleinen Aliquots für einmaligen Gebrauch bei -70°C gelagert.

3.1.3 Versuchstiere und Tumoren

Athymische weibliche NCr-nu/nu Mäuse wurden von der Animal Production Area, National Cancer Institute, Frederick Cancer Research Facility (Frederick, MD) bezogen. Die Mäuse wurden unter apathogenen und behördlich genehmigten Bedingungen gehalten. Die Tumorzellsuspensionen wurden aus den Zell- Linien nach *in vitro* Kultivierung gewonnen. Solitäre Xeno- Transplantat- Tumoren wurden durch subkutane Injektion von $0,8$ bis $1,0 \times 10^7$ MDA-MB-231, MDA-EGFR-CD533, U-373 MG oder U-87 MG beziehungsweise $1,0 \times 10^6$ A-431 lebensfähigen Zellen in das rechte Hinterbein von 4 bis 6 Wochen alten Mäusen erzeugt. Tumoren von MDA-MB-231, A-431, U-373 MG und U-87 MG Zellen wuchsen bereits nach 3-6 Wochen bis zu einem Durchmesser von 6-10 mm, während Tumoren von MDA-EGFR-CD533 Zellen diesen Durchmesser erst nach 12 bis 16 Wochen erreichten. Alle Experimente wurden bei Tumordurchmessern von 6 bis 8 mm für die MDA-MB-231 und MDA-EGFR-CD533 Zell- Linien und 8 bis 10 mm für alle anderen Zell- Linien durchgeführt.

3.2 IN VITRO METHODEN

3.2.1 Adenovirale Transduktion und Bestimmung der Transduktionsrate

Die verwendeten Zell- Linien wurden in einer definierten Anzahl auf 60-mm Zellkulturplatten aufgebracht und für drei Tage im Inkubator belassen. Am Tag 3 erfolgte die adenovirale Transduktion der Zellen. Zunächst wurde die Anzahl der vorhandenen

Zellen für eine repräsentative Zellkulturplatte bestimmt, um hieraus den Anteil von Viruspartikeln (plaque forming unit = pfu) pro Zelle errechnen zu können. Dieses Verhältnis von Anzahl der verwendeten Viruspartikel pro Zelle ist definiert als “multiplicity of infection “ (MOI) und beschreibt die Anzahl an „plaque forming units“ (pfu) pro Zelle.

Ziel initialer Experimente war es, einen optimierten MOI- Wert für die jeweils verwendeten Zell- Linien zu ermitteln, bei welchem sich eine mehr als 80%ige Infektionsrate mit möglichst geringer Toxizität erzielen lässt, da es erfahrungsgemäß sehr große Schwankungsbreiten bei der Infektiosität von humanen Zell- Linien gibt (Valerie, 1999). Zunächst wurde der bei -80°C gelagerte Vorrat der adenoviralen Präparation in Abhängigkeit von dem verwendeten MOI mit PBS auf 1:100 oder 1: 1000 verdünnt. Die adenovirale Präparation wurde nach Bestimmung des verwendeten MOI

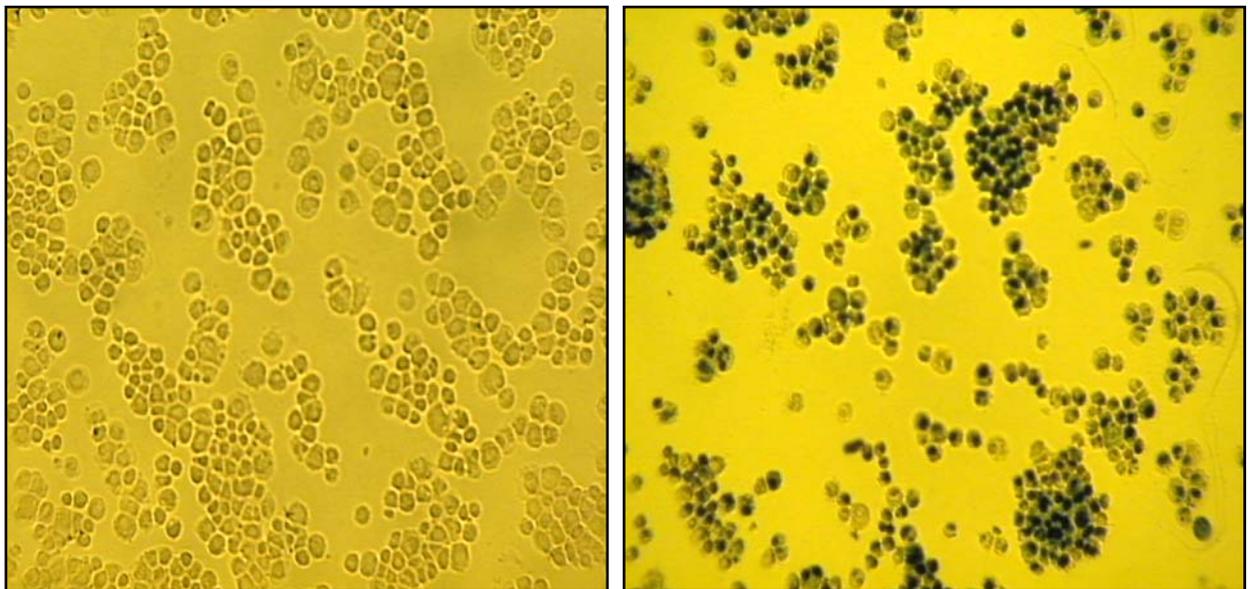


Abbildung 4: X-gal Kern-Anfärbung für β -gal Expression 48 Stunden nach Transduktion mit Ad-LacZ (10 MOI) in U-87 MG Zellen. Die Kernanfärbung von x-gal zeigt transduzierte Zellen mit einer blau-grünen Farbe. Safranin O, das zur Gegenfärbung benutzt wurde, färbt das Zytoplasma und den Kern hellrot an. Die Transduktionsrate wurde mit 86-89% errechnet. Die linke Seite zeigt eine x-gal Färbung und Safranin O Gegenfärbung für nicht transduzierte Zellen.

in dem berechneten Volumen dem Zellkulturmedium in den 60-mm Zellkulturplatten zugefügt. Danach wurden die Zellkulturplatten für 4 Stunden im Inkubator bei 37°C auf einer maschinellen Wippapparatur kontinuierlich bewegt. Anschließend wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht. Nach 48 Stunden erfolgte die Bestimmung der Transduktionsrate für die mit Ad-LacZ transduzierten Zellen. Diese wurden zunächst auf einen Objektträger gebracht und über 24 Stunden mit dem X-gal Farbstoff 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid bei 37°C inkubiert, um eine Darstellung der β -gal exprimierenden Zellen zu erreichen (Brust et al., 2000). Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der LacZ-Gen positiven Zellen aus einer Gesamtzahl von 500 Zellen, die an der grünblauen Färbung des Kernes zu erkennen sind (Abb. 4).

Zur besseren Identifizierung der LacZ-Gen negativen Zellen wurde zusätzlich eine kontrastierende Gegenfärbung mit Safranin O verwendet (Ho und Lin, 1997). Die durch adenovirale Transduktion induzierte Toxizität wurde mit Hilfe des Koloniebildungstests untersucht. Die Zellen wurden hierzu 48 Stunden nach der Transduktion für den Koloniebildungstest ausgesät (siehe unten). Aus der Reduzierung der Kolonien im Vergleich zur nicht transduzierten Kontrollgruppe errechnete sich die transduktionsbedingte Toxizität.

3.2.2. Transiente Transfektion der CHO Zellen

Es wurden 1.5×10^5 CHO-Zellen pro 60-mm Zellkulturplatte ausgesät und insgesamt 5 Tage lang in RPMI/5FBS inkubiert. Am dritten Tag erfolgte die transiente Transfektion. Zur Transfektion von DNA in CHO- Zellen verwendeten wir den Lipofectamin- Vektor nach dem Lipofectamin PlusTM- Protokoll (GIBCO-BRL, Gaithersberg, MD). Hierbei

wurde die DNA zunächst in serumfreies Medium gemischt und anschließend mit dem Plus-Reagens 15 Minuten inkubiert. Schließlich erfolgte über weitere 15 Minuten die Bindung an Lipofectamin. Der Lipofectamin-Plus-Reagens-DNA-Komplex wurde den Zellen in Volumen-reduziertem serumfreiem Medium über insgesamt drei Stunden zugefügt. Anschließend wurde frisches serumhaltiges Medium ausgewechselt.

Die Bedingungen für eine optimierte Transfektionseffektivität wurden anhand der Western Blot Analyse der Expressionsniveaus der transfizierten Gene 48 Stunden nach der Transfektion verschiedener DNA Mengen des Expressions- Plasmids ermittelt. Zusätzlich wurde in weiteren Experimenten ein pK7.GFP- Plasmid verwendet, mit dem die Transfektionsrate durch mikroskopische Quantifizierung der GFP- positiven Zellen bestimmt werden kann. Aus diesen Untersuchungen ergab sich eine mehr als 90%ige Transfektionseffektivität der CHO- Zellen nach dem Lipofectamin- PlusTM- Protokoll (GIBCO-BRL, Gaithersberg, MD, USA) bei Verwendung von 0.5 µg des Expressions- Plasmids (pβAc.EGFRvIII oder pCMV.EGFRwt) in Verbindung mit weiteren 1.5 µg eines leeren Vektors. Für die „Schein“- Transfektionen (Mock- Transfektionen) unter identischen experimentellen Bedingungen, jedoch ohne die zu untersuchende Komponente, die als CHO.mock bezeichnet wird, wurden 2 µg des leeren Vektors unter identischen Bedingungen transfiziert. Zur Herstellung von CHO- Zellen, welche EGFRvIII und EGFRwt in vergleichbarer Menge co- exprimieren, wurden verschiedene DNA- Mengen des pCMV.EGFRwt Expressions-Plasmids (0.01 bis 0.3µg) mit 0.3 µg des pβAc.EGFRvIII Expressions-Plasmids und einer entsprechenden DNA- Menge des leeren Vektors transfiziert, mit welcher die Gesamtmenge an DNA konstant bei 2 µg gehalten werden konnte. Die Western Blot Analyse der Expressionsmengen der exprimierten EGFRvIII und EGFRwt- Proteine ergab eine vergleichbare

Expressionsmenge bei Verwendung von 0.03 µg des pCMV.EGFRwt und 0.3 µg des phβAc.EGFRvIII- Expressions-Plasmids.

3.2.3 Behandlung und Bestrahlung der Zellen *in vitro*

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5 – 10 % auf 60-mm oder 100-mm große Zellkulturplatten aufgebracht und insgesamt 5 Tage bebrütet. Am dritten Tag erfolgte die adenovirale Transduktion oder die transiente Transfektion der Zellen. 16 – 18 Stunden vor der pharmakologischen Behandlung oder einer Bestrahlung an Tag 5 wurde das Zellkulturmedium durch serumreduziertes Medium RPMI/0.5FBS oder MEM α /0.5FBS ersetzt. Für die Behandlung mit AG1478 wurden die Zellen mit 5 µmol AG1478 über 30-60 Minuten inkubiert. Zur Behandlung mit EGF wurde den Zellen 5 Minuten lang 10 oder 100 ng/ml der Substanz zugefügt. In allen Bestrahlungsexperimenten wurden die Zellen mit einer ⁶⁰Co-Quelle bei einer Dosisleistung von 1.5 bis 2.0 Gy/min in Kulturplatten bei einer Raumtemperatur von 20°C bestrahlt. Die Zellkulturplatten wurden hierzu unterhalb der Strahlenquelle positioniert. Für alle immunchemischen Analysen nach der Bestrahlung wurden die Zellen in einem Inkubator unter 5% CO₂ –Begasung bei 37°C gehalten. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen auf Zellkulturplatten mit eiskaltem PBS gewaschen, umgehend auf Trockeneis gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei –70°C gelagert.

3.2.4. Western Blot und Immunpräzipitation

Die Protein- Expression von EGFR und EGFR-CD533 sowie die EGFR Tyr-P wurden mit Hilfe der Immunpräzipitation und der Western Blot Analyse quantifiziert. Hierzu wurden die Zellen in den gefrorenen Kulturplatten mit eiskaltem Lysierungs- Puffer (Contessa et al., 1999) unter wiederholter Passage durch 20-G Nadeln lysiert. Die Protein- Konzentration in den Überständen wurde nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 g mit Hilfe eines BIO-RAD Protein- Assay- Kit (Bio-Rad Labs, Richmond, CA) quantifiziert. Es wurden 100 - 200 µg Zell-Lysat für die Western Blot Analyse von ErbB1-4 und EGFR-CD533 verwendet. Für die Untersuchung der EGFR Tyr-P wurde das Zell-Lysat und eine definierte Proteinmenge mit dem anti-EGFR mAb bei 4°C 90 Minuten lang inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit Protein A-Agarose (BioRad, Hercules, CA) über weitere 45 Minuten. Die Agarose wurde durch Zentrifugation zurücksepariert. Die Immunpräzipitate wurden in mehreren Schritten herausgewaschen (Contessa et al., 1999). Die Proteine für die Western Blot Analyse beziehungsweise die Immunpräzipitate für die EGFR Tyr-P Analyse wurden anschließend elektrophoretisch mit Natrium- Dodecyl- Sulfat-Polyacrylamid- Gel (SDS-Page, 6%) fraktioniert und auf eine Nitrocellulose- Membran transferiert. Diese wurde bei der Western Blot Analyse mit den verschiedenen Antikörpern anti-EGFR, anti-ErbB2, anti-ErbB3 oder anti-ErbB4 sowie nachfolgend mit einem durch Peroxidase konjugierten zweiten anti- mouse Antikörper inkubiert. Bei der Tyr-P Analyse des immunpräzipitierten EGFR wurde nach der Transferierung der Immunpräzipitate auf Nitrozellulose eine Inkubation mit anti-Tyr-P und mit dem Peroxidase- konjugierten zweiten Antikörper durchgeführt. Die Banden wurden mit dem CDP-Star Kit (Tropix, Inc., Bedford, MA) entwickelt und dargestellt. Die

Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mit der Sigma Scan Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA; Schmidt-Ullrich et al., 1996)

3.2.5. Immunkomplex Kinase Assay

Die MAPK- Aktivität in MDA-MB231, U-373 MG und CHO Zellen wurde mit dem Immunkomplex- MAPK- Assay quantifiziert (Reardon et al., 1999). Die Messung der Aktivität der CHO- Zellen erfolgte mit dem Immunkomplex Akt- Assay. Zell-Lysat Proben mit gleicher Menge an Protein, die mit Hilfe des Bio-Rad- Protein- Assay- Kit (Bio-Rad Labs, Richmond, CA) quantifiziert worden waren, wurden mit anti-ERK2 (C-14) mAb beziehungsweise anti-Akt mAb bei 4°C über 3 Stunden beziehungsweise über Nacht inkubiert und anschließend einmal mit Lysierungspuffer und zweimal mit Kinasepuffer (25 mM β -Glycerophosphat, pH 7,4, 15mM MgCl₂) gewaschen (Reardon et al., 1999). Die Immunkomplexe wurden anschließend in 40 μ l H₂O, welches die entsprechenden Substrate für MAPK oder Akt enthielt, in Lösung gebracht. Für MAPK enthielt das Substrat 20 μ g Myelin- Basis- Protein (MBP), für Akt 1 μ g Akt- Substrat. Die Kinase Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l 5x Kinase Puffer, 500 μ M ATP und [³²P] γ -ATP (5000 cpm / pmol; ICN Biomedicals, Irvine, CA) eingeleitet und bei 37 °C 30 Minuten lang inkubiert. Proben des Gemisches wurden auf ein P81- Assay Papier aufgetragen und die unspezifische Bindung von [³²P] γ -ATP durch intensive Waschung in 180 mM Phosphorsäure entfernt. Die Inkorporation von ³²P in gebundenes MBP oder Akt Substrat wurde durch die Absorption von P 81 und Flüssig- Szintillations- Spektroskopie (Beckmann Instruments Inc., Schaumburg, IL) gemessen (Reardon et al., 1999).

3.2.6. Koloniebildungstest

Die *in vitro* Strahlensensibilität und die Toxizität einer Behandlung wurden jeweils 72 Stunden nach der adenoviralen Transduktion, der Transfektion, der Doxycyclin-Behandlung der MDA-EGFR-CD533 Zellen oder einer sonstigen Behandlung mit dem Koloniebildungstest ermittelt. Für die Bestimmung der *in vitro* Strahlensensibilität wurden die Zellen als Monolayer 48 Stunden nach der adenoviralen Transduktion oder anderweitiger Behandlung mit Einzeldosen von 1,2,3,4 und 8 Gy und bei fraktionierten Bestrahlungen einmal täglich mit 2 Gy an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestrahlt, unter Standard- Kulturbedingungen weitere 24 Stunden gehalten und anschließend mit Trypsin als Einzelzellen separiert und für den Koloniebildungstest inkubiert, um die klonogene Überlebensrate zu ermitteln. Die Anzahl der Zellen in 60-mm Zellkulturplatten wurde so gewählt, daß für eine jeweilige Bestrahlungsdosis nach 12-17 Tagen eine Gesamtzahl von 50 bis 300 Kolonien erreicht wurde. In Abhängigkeit von der Zelllinie wurden die Kolonien nach 12 – 17 Tagen mit Methanol fixiert und mit 0,5% Kristall- Violett angefärbt. Kolonien aus mehr als 50 Zellen wurden zur Bestimmung der Überlebensfraktion der klonogenen Zellen ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand halblogarithmischer Dosis-Effektkurven nach Korrektur der Angehrate der Zellen (plating efficiency) ohne Bestrahlung ermittelt. Die relative Strahlensensibilität wurde mit Hilfe der mittleren Inaktivierungsdosis (D) beschrieben. Die Überlebenskurven wurden mit Hilfe der „Graph Pad Prism“ Software unter Zuhilfenahme des linear-quadratischen Modells erstellt. Das linear- quadratische Modell trennt den Strahleneffekt auf Zellen in einen linearen (α) und einen quadratischen (β) Anteil. Die resultierenden α/β Werte, gemessen in Gray (Gy), sind ein Maß für akute und chronische Strahleneffekte.

3.3 METHODEN *IN VIVO*

3.3.1 Intratumorale Infusion der adenoviralen Vektoren, Bestimmung der

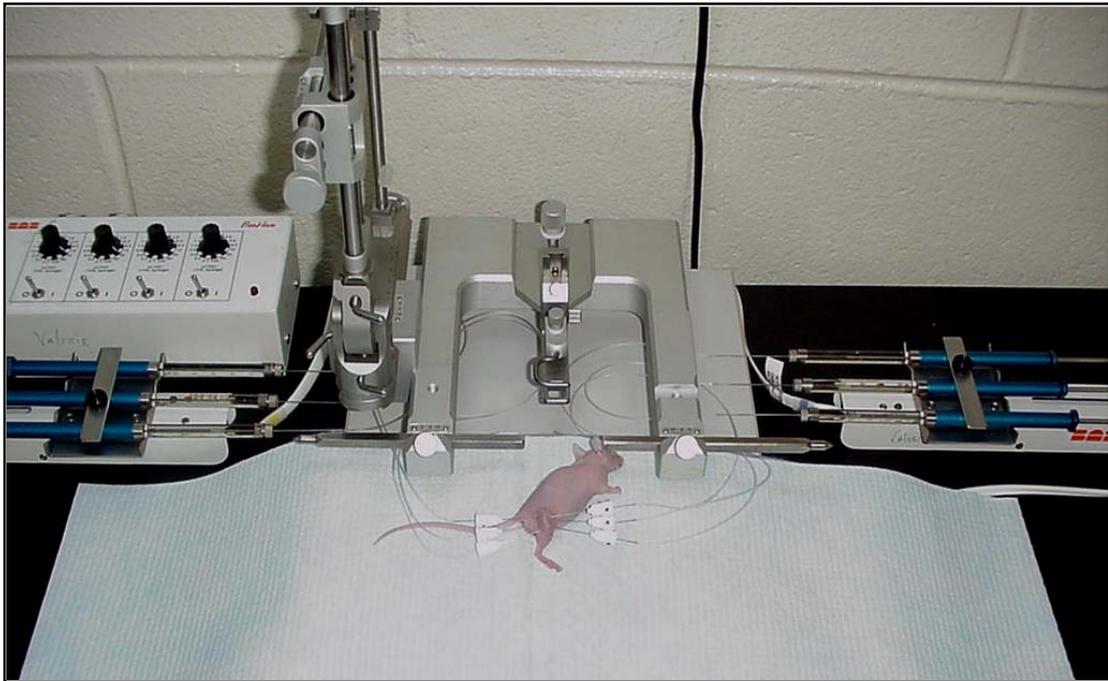


Abbildung 5: Darstellung des experimentellen Aufbaus einer intratumoralen Infusion. Das BEE- Hive- Kontrollsystem (Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN) am linken oberen Bildrand überwacht die Infusionsgeschwindigkeit mit $0,5 \mu\text{l} / \text{min}$. Über eine Baby- Bee- Spritzenpumpe (Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN) gelangt die Infusionsflüssigkeit mit den adenoviralen Vektoren über Schlauchsysteme und die 30 G Nadeln innerhalb eines Zeitraumes von 40 Minuten in den Tumor.

Transfektionsrate im Tumor und Bestrahlung der Tumoren

Die adenoviralen Vektoren Ad-LacZ (Kontrolle) oder Ad-EGFR-CD533 wurden intratumoral in A-431, MDA-MB-231, U-373 MG oder U-87 MG Tumor- Xenotransplantate mit Hilfe einer Druckvorrichtung bei kontrolliert konstanter Flußgeschwindigkeit von annähernd $0,5 \mu\text{l}$ pro Minute infundiert (Brust et al, 2000; Prabhu et al., 1998). Abbildung 5 zeigt den Aufbau dieser Infusionsvorrichtung.

Zunächst wurden insgesamt 10^{10} plaque-forming units (pfu) in 0,12 ml PBS innerhalb von 40 Minuten infundiert. Zur Bestimmung der Transfektionsrate wurden die Tumoren 48 Stunden nach der letzten Infusion herauspräpariert und nach scharfer Zerkleinerung in einer Nährlösung mit Enzymcocktail angedaut (s. 3.3.4). Nach 2-3- stündiger enzymatischer Andauung und Inkubation der Zellsuspension erfolgte die Filtrierung mit Maschenfiltern von 40 μ m Porengröße. Die isolierten Zellen wurden anschließend mit dem X-gal Farbstoff 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside bei 37°C über Nacht inkubiert. Hierdurch wurde ein Nachweis der β -gal exprimierenden Zellen erreicht (s. Kap. 3.2.1.; Brust et al., 2000). Zur besseren Identifizierung LacZ-Gen negativer Zellen wurde ebenfalls eine kontrastierende Gegenfärbung mit Safranin O durchgeführt (Ho und Lin, 1997).

Um die Effektivität der intratumoralen Vektorinfusion zu optimieren, wurde die Transduktionseffizienz nach einzeitiger Infusion mit 4 oder 6 Nadeln (30-G) mit der zweimaligen Infusion durch 6 Nadeln an zwei aufeinanderfolgenden Tagen verglichen. Die wirksamste Transduktion ließ sich bei den Tumoren der humanen Zell- Linien MDA-MB231 und A-431 mit einer zweimaligen Infusion der Vektoren mit 6 Nadeln an zwei aufeinanderfolgenden Tagen erzielen (s. Kap. 5.1). Dabei wurden 2 Sets von drei Nadeln in entgegengesetzter Richtung in den Tumor eingebracht, die etwa 60% des Tumordurchmessers erfaßten (Abb. 6). Die Abstände der Nadeln untereinander wurde einheitlich gewählt, um eine möglichst homogene Verteilung des adenoviralen Vektors im Tumor zu erzielen. Jede Nadel wurde während der 40- minütigen Infusion alle 10 Minuten um ca. 1 mm zurückgezogen. Die wiederholte Infusion am nächsten Tag erfolgte mit dem Unterschied, daß die Nadeln im rechten Winkel zur initialen Infusion in den Tumor eingebracht wurden (Abb. 6). Für die Tumoren der malignen Gliomzell-

Linien U-87 MG und U-373 MG ergab bereits eine einmalige Infusion der Vektoren mit 6 Nadeln eine ausreichende Transduktionsrate. Das Gesamtvolumen pro Infusion lag jeweils konstant bei 0,12 ml. Für alle adenoviralen Infusionen wurden ein BEE- Hive-Kontrollsystem und eine Baby- Bee- Spritzenpumpe (Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN) verwendet.

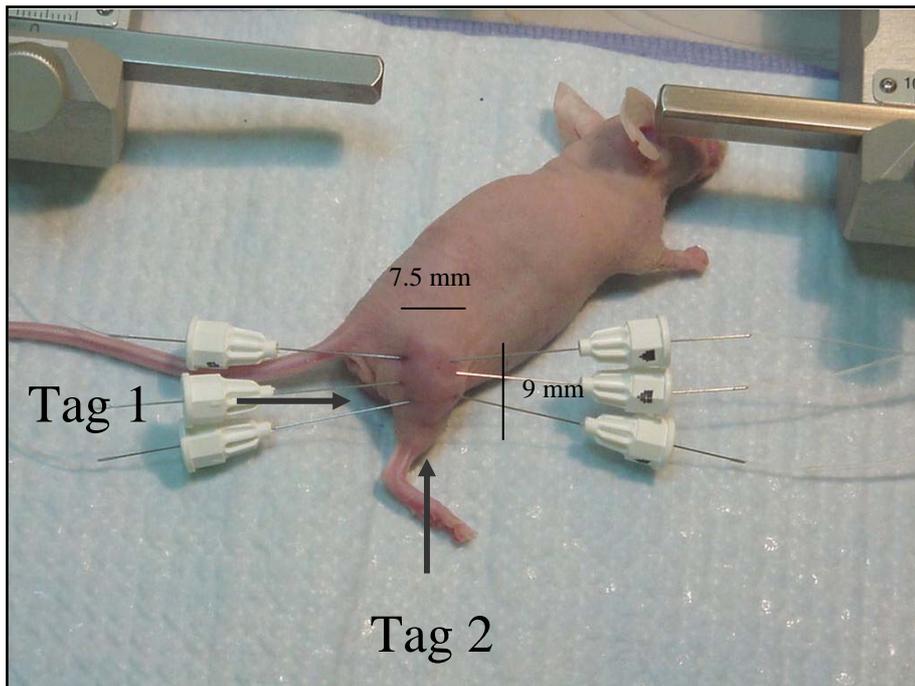


Abbildung 6: Darstellung der 6 Nadel-Infusionstechnik. 2 Sets von drei 30-G Nadeln sind in entgegengesetzter Richtung positioniert und erfassen 60% des Tumordurchmessers. Die wiederholte Infusion am folgenden Tag erfolgte in identischer Weise mit dem Unterschied, daß die Nadeln im rechten Winkel zur initialen Infusion in den Tumor eingebracht wurden (Tag 2).

Die Bestrahlung der Tumoren begann 2 Tage nach der letzten Infusion der adenoviralen Vektoren. Die Mäuse wurden bei der Ganzkörperbestrahlung, welche bei den *ex vivo* - *in vitro* Experimenten angewandt wurde (Kap. 5.3), in einen Plastikbehälter verbracht, um sicherzustellen, daß der gesamte Körper die gleiche Strahlendosis erhielt. Bestrahlt wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen in 24-stündigen Abständen mit 1,5 Gy pro Fraktion. Bei den Analysen zur Tumor-

Wachstumsverzögerung wurden die Mäuse ca. 20 Minuten anästhesiert und so unter die Strahlenquelle positioniert, daß jeweils nur die tumortragenden rechten Hinterbeine im Bestrahlungsfeld lagen. Die Bestrahlung erfolgte abhängig vom Tumortyp mit 2 oder 3 Gy Einzeldosis an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Mock- Bestrahlungen (Schein-Bestrahlungen, d.h. identische experimentelle Bedingungen, jedoch ohne die Bestrahlung durchzuführen) erfolgten unter identischen Bedingungen entweder im Plastikbehälter oder nach Anästhesie der Maus gezielt im Bereich des tumortragenden Hinterbeines.

3.3.2 Induktion der EGFR-CD533 Expression in Xeno-Transplantat- Tumoren von stabil transfizierten MDA-EGFR-CD533 Zellen und Bestrahlung der Tumoren

Die EGFR-CD533- Expression in MDA-EGFR-CD533- Xeno-Transplantat-Tumoren wurde durch intraperitoneale Injektionen von Doxycyclin induziert. Zwei verschiedene Injektionsprotokolle wurden bei den MDA-EGFR-CD533 Tumoren angewandt, abhängig von der anschließenden Bestrahlung. In einem Protokoll erfolgten sieben intraperitoneale Injektionen von je 0,3 mg bei einer Konzentration von 1µg/µl Doxycyclin in 12- stündigen Abständen über einen Zeitraum von insgesamt 90 Stunden. Anschließend wurde mit einer Ganzkörper-Einzeitdosis von 4 Gy bestrahlt. In einem zweite Protokoll wurden die zweimal täglichen Injektionen von Doxycyclin 24 Stunden vor der ersten Ganzkörper-Bestrahlung mit 1,5 Gy begonnen und während der folgenden zwei Bestrahlungstage in 12 stündlichen Abständen fortgesetzt. Die Doxycyclin- Injektionen wurden bis 20 Stunden nach der letzten Bestrahlung fortgesetzt. 24 Stunden nach Ende der fraktionierten Bestrahlung, d.h. 4 Stunden

später, wurden die Tumoren herauspräpariert, um Einzeltumorzellsuspensionen für die weiteren Analysen zu gewinnen.

3.3.3 Western Blot Analyse und Immunpräzipitation von Tumorzellen

Die Proteinexpression von EGFR und EGFR-CD533 sowie die EGFR Tyr-P der Tumorzellen wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse und der Immunpräzipitation des EGFR quantifiziert. Dabei erfolgte die Analyse aus Tumorgewebe, welches unmittelbar nach der Präparation in Flüssigstickstoff schockgefroren worden war. Das Tumorgewebe wurde in Flüssigstickstoff mit Hilfe eines Mörsers pulverisiert (Dent et al., 1990) und in eiskaltem Puffer lysiert (25 mM β -Glycerophosphat, 25 mM Tris (pH 7.4), 10% (v/v) Glycerol, 1.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM Na-Pyrophosphat, 15 μ g/ml Aprotinin, 15 μ g/ml Leupeptin, 2 μ M Benzamidin, 150 μ g/ml PMSF). Die Zellsuspension wurde dabei durch 16 G bis 21 G Nadeln geleitet, um den Prozeß der Zell- Lysierung zu unterstützen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch 10- minütige Zentrifugation mit 14000 G bei 4°C entfernt. Der anfallende Protein-Überstand der Tumorzellen stand anschließend für die Immunpräzipitation von EGFR oder die Western Blot Analyse der EGFR und EGFR-CD533 Protein- Expression zur Verfügung.

3.3.4 Ex Vivo Koloniebildungstest

Die *in vivo* Strahlensensitivität von Xeno- Transplantat- Tumoren wurde mit Hilfe des *ex vivo* Koloniebildungstests quantifiziert (Brown et al., 1990). Hierzu wurden die Nacktmäuse 24 Stunden nach der letzten Bestrahlung getötet und die Tumoren

herauspräpariert. Eine Einzelzellsuspension wurde durch enzymatische Andauung des Tumorgewebes mit 1,5 ml Kollagenase Typ IA (280U/ml) und 1,5 ml eines Enzymcocktails erhalten, welcher Deoxyribonuclease (31 U/ml), Pronase (225 U/ml) und Kollagenase Typ IA (3280 U/ml) enthielt, die mit RPMI/5FCS und Antibiotika bis zu einem Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt wurde. Nach 2- bis 3- stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Filtration durch einen 40 µm Maschenfilter. Die Einzelzellsuspensionen wurden 2 mal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen analog zum Koloniebildungstest ausgezählt und auf 60- mm Zellkulturplatten aufgebracht. (s 3.6.2).

3.3.5 Tumorwachstumsanalyse

Bei wachsenden Xeno- Transplantat- Tumoren wurden mit einer kalibrierten Messapparatur die Breite (a) und Länge (b) in dreitägigen Abständen gemessen. Das Tumolvolumen wurde entsprechend der Formel: $a^2 b / 2,5$; $a < b$ (Lee et al., 1992) berechnet. Nur Tumoren mit einer Breite oder Länge von wenigstens 4 mm wurden als palpable Tumoren definiert. Tumoren mit Durchmessern zwischen 8 und 10 mm für A-431-, 6-8 mm für MDA-MB-231- und 8-10 mm für U-373 MG Zell- Linien wurden mit den adenoviralen Vektoren infundiert und anschließend bestrahlt oder mock- bestrahlt. Der erste Tag der Bestrahlung wurde für das Tumolvolumen als Tag 0 gewählt und für die weitere relative Volumenbetrachtung als 1 definiert. Alle weiteren Tumorumfänge wurden in 3- tägigen Abständen bestimmt und in Relation zum Referenzvolumen an Tag 0 gesetzt.

3.4 Statistische Analyse

Alle beschriebenen Messungen sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM), sofern nicht anderweitig vermerkt. Die statistischen Vergleichsanalysen der klonogenen Überlebenskurven und der Tumorwachstumskurven wurden mit Hilfe des *F*-Testes durchgeführt. Alle anderen statistischen Berechnungen wurden mit dem Student- *t*-Test durchgeführt. Der „dose-enhancement ratio“ (DER) der behandelten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen wurde bei den klonogenen Überlebensanalysen durch den Quotienten der mittleren Inaktivierungsdosis (*D*) der zu vergleichenden Gruppen ermittelt. Der DER bei *ex vivo* Koloniebildungstests nach wiederholter Bestrahlung *in vivo* wurde durch den Quotienten aus der Überlebensrate der Kontrollgruppen und der Therapiegruppen errechnet. Ein *p*-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit der SAS Software durchgeführt (Version 8.0; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER *IN VITRO* UNTERSUCHUNGEN ZUR STRAHLENSENSIBILISIERUNG VERSCHIEDENER KARZINOM- UND GLIOMZELL- LINIEN MITTELS ADENOVIRALER EXPRESSION DES DOMINANT- NEGATIVEN EGFR-CD533

4.1 Charakterisierung der ErbB- Expressionsprofile der untersuchten Zell- Linien

Für die Untersuchungen zur potenziellen Strahlensensibilisierung mittels adenoviral vermittelter Überexpression des EGFR-CD533 wurden verschiedene repräsentative humane Tumorzell- Linien ausgewählt, die qualitativ und quantitativ unterschiedliche Expressionsprofile des EGFR und der übrigen ErbB- Rezeptoren aufweisen, um die Möglichkeit einer breiten Anwendung dieser Therapieform testen zu können (Bowers et al., 2001; Earp et al., 1995; Lammering et al., 2001). Da die Bedingungen, unter denen die Zell- Linien bebrütet wurden, die relative Expression der ErbB- Moleküle beeinflussen können (Gulliford et al., 1997; Todd et al., 1999; Bowers et al., 2001), wurden die ErbB- Expressions- Profile für die verwendeten fünf Zell- Linien erneut definiert und gegenübergestellt (Abb. 7). Die dargestellte Western Blot Analyse repräsentiert die ErbB-Expressions- Profile der Zell- Linien zu dem Zeitpunkt, an dem unter identischen Bedingungen bestrahlt wurde (Kap. 4.3 bis 4.5).

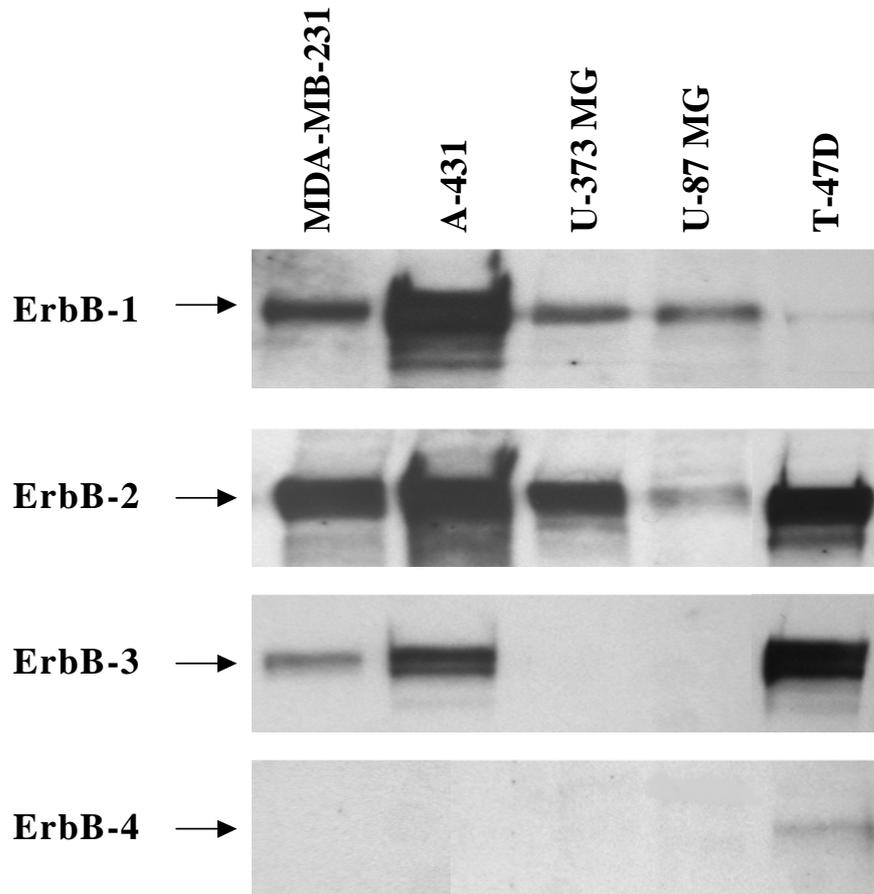


Abbildung 7: Western Blot Analyse der Expressionsprofile von ErbB-1 (EGFR), ErbB-2, ErbB-3 und ErbB-4 für die untersuchten Zell- Linien. Die Analyse erfolgte mit Zell-Lysat nach Größenfraktionierung mit SDS-Page- Elektrophorese und monoklonalen Antikörpern spezifisch für jedes ErbB Molekül. Die untersuchte geladene Proteinmenge wurde nach Quantifizierung im Protein- Assay auf 0,2 mg Protein standardisiert.

Ein Immunblotting mit anti-EGFR- mAb ergab eine deutliche Variabilität der Intensität der 170kDa- EGFR- Bande. Wie beschrieben, waren die EGFR- Expressionsniveaus für die Zell- Linien MDA-MB-231, T-47D, U-373 MG und U-87 MG geringer als für die Zelllinie A-431 (Lammering et al., 2001; Bowers et al., 2001). Diese Zelllinie ist durch eine ausgeprägte Überexpression des EGFR definiert, wohingegen T-47D Zellen nur eine geringfügige Expression des EGFR im Bereich der Nachweisgrenze zeigen (Lammering et al., 2001; Bowers et al., 2001). Die Western Blot Analyse mit einem anti-ErbB2- mAb identifizierte die höchsten Expressionsniveaus des 185 kDa ErbB2-

Protein für T-47D- und A-431 Zellen, gefolgt von MDA-MB-231-, U-373 MG- und U-87 MG- Zellen. Das ErbB4- Protein ließ sich nur für T-47D- Zellen nachweisen. Diese Zelllinie wurde für unsere Studien ausgewählt, da sie nur sehr geringfügig EGFR, aber deutlich nachweisbar ErbB4 exprimiert.

4.2 Optimierung der Transduktionsbedingungen und Expression des dominant- negativen EGFR-CD533 nach adenoviralem Gentransfer

Replikations- inkompetente adenovirale Vektoren haben sich für den Gentransfer in menschliche Zell- Linien als besonders geeignet erwiesen und werden daher bereits in klinischen Studien eingesetzt (Valerie, 1999; Hemminki und Alvarez, 2002; Kuball et al., 2002; Nemunaitis et al., 2001). Wegen der präklinischen gentherapeutischen Fragestellung dieser Arbeit und nachfolgender Untersuchungen am Tumormodell

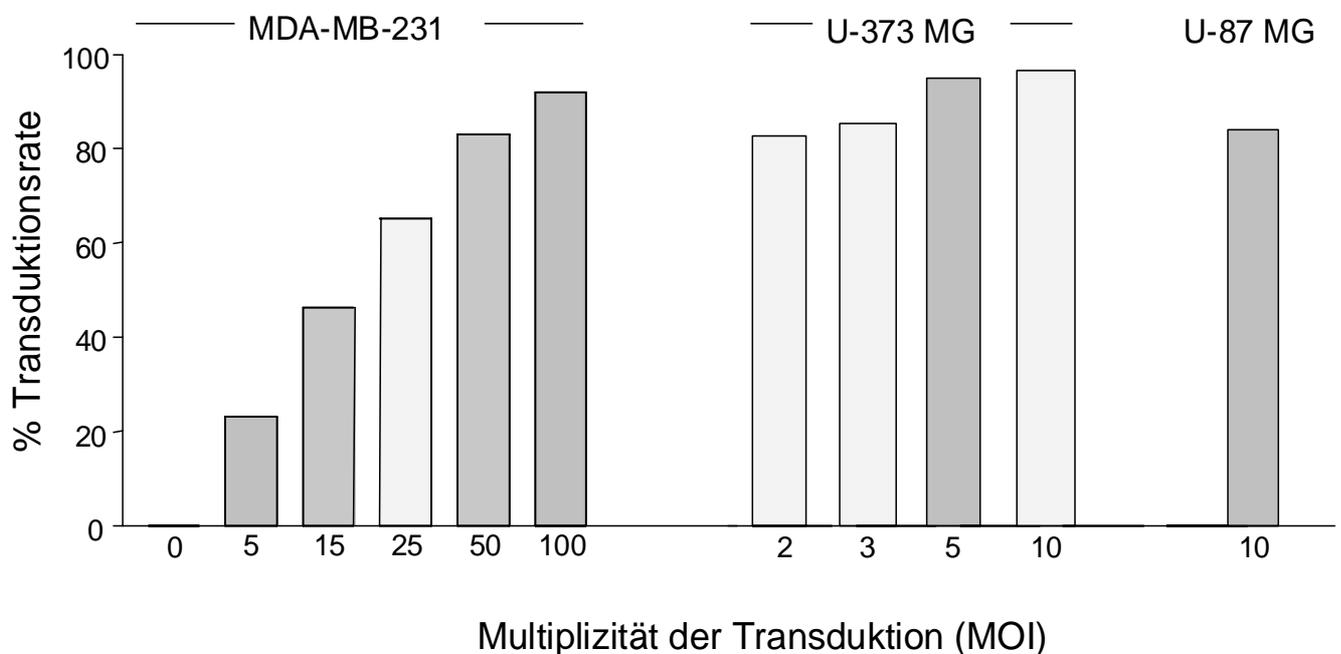


Abbildung 8: Quantifizierung der Transduktionsrate nach adenoviraler Transfektion von LacZ in Abhängigkeit von der MOI für MDA-MB-231- und U-373 MG- Zellen.

verwendeten wir entsprechende Adenoviren als Vektoren für den Gentransfer des EGFR-CD533. Hierbei ist die Infektiosität von Zell- Linien sehr variabel. Deswegen war es erforderlich, die Transduktionsbedingungen (Multiplizität der Transduktion (MOI)) für jede Zelllinie zu optimieren, um eine maximale Transduktionsrate bei geringer Toxizität zu erzielen. Zur Ermittlung der Transduktionsrate verwendeten wir Ad-LacZ, welches ein Protein exprimiert, daß mit x-gal angefärbt und dargestellt werden kann. Abb. 4 zeigt exemplarisch die Anfärbung von U-87 MG Zellen 48 Stunden nach Transduktion der Zellen mit Ad-LacZ. Aus der Anzahl x-gal positiver Zellen ließ sich die Transduktionsrate ermitteln, während die Toxizität der Transduktion mit dem Koloniebildungstest analysiert wurde. Abb. 8 illustriert exemplarisch die Transduktionsraten für die Zell- Linien MDA-MB-231 und U-373 MG, die für unterschiedliche MOI's erzielt wurden.

Während die malignen Gliomzellen eine vergleichsweise hohe Sensitivität für Adenoviren aufwiesen, ließen sich für A-431, T-47D und MDA-MB-231 Zellen erst bei höheren MOI-Werten vergleichbare Transduktionsraten erzielen. Wir haben nachgewiesen, daß 3 MOI für U-373 MG, 10 MOI für U-87 MG, 10 MOI für T-47D, 50 MOI für MDA-MB-231 und 100 MOI für A-431 eine Transduktionsrate von mehr als 80% bei einer Toxizität von weniger als 30% erzielen. Ausgenommen sind T-47D-Zellen, bei welchen mit 10 MOI eine Toxizität von weniger als 50% auftrat.

Nach Bestimmung der MOI- Werte für die Zell- Linien wurde die Kinetik der EGFR-CD533 Expression nach Transduktion der Karzinom- und Gliomzellen mit dem Ad-EGFR-CD533 zu verschiedenen Zeitpunkten durch Western- Blot- Analyse quantifiziert (Abb. 9). Dabei ließ sich eine Expression von EGFR-CD533 bereits 24 Stunden nach

der Transduktion nachweisen. Eine maximale Expression wurde jedoch erst nach 48 Stunden erreicht. Alle nachfolgenden Bestrahlungs-Experimente wurden deswegen 48 Stunden nach der Transduktion begonnen.

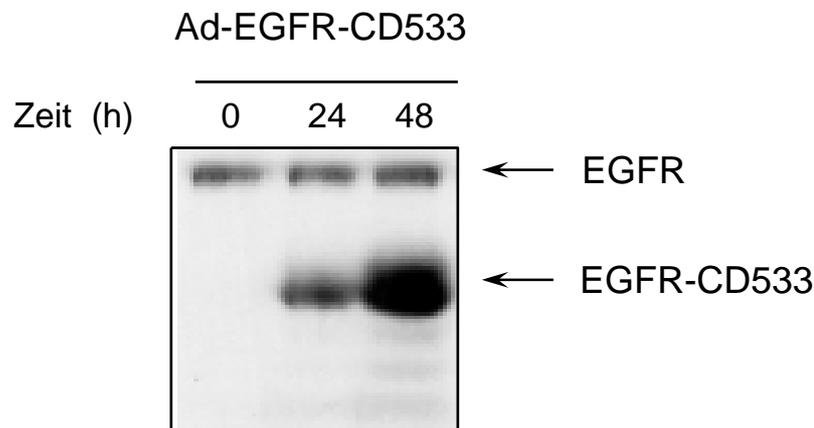


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Expression des Transgens EGFR-CD533 nach adenoviraler Transduktion von MDA-MB-231 Zellen. EGFR-CD533- Protein- Expression wurde durch Immunblotting nachgewiesen und zu den dargestellten Zeitpunkten mit der EGFRwt- Protein- Expression verglichen (Transduktion bei 0 Stunden).

Wie in Abbildung 10 dargestellt ist, ergab die Transduktion der Zell- Linien mit Ad-EGFR-CD533 zu den ermittelten Bedingungen eine deutlich höhere Expression des EGFR-CD533 im Vergleich zu dem endogenen EGFRwt, definiert als die relative Intensität der Proteinfärbung im Western Blot. Für die Dauer der dargestellten Experimente ließ sich keine Beeinflussung von EGFR-CD533 auf die endogene Expression des EGFRwt feststellen, wie der Vergleich der EGFRwt Expression bei Ad-LacZ transduzierten Zellen zeigt (Abb. 10). Die vergleichbare Überexpression von EGFR-CD533 für alle untersuchten Zell- Linien verdeutlicht das einheitliche Wirkungsprinzip des adenoviralen Gentransfers.

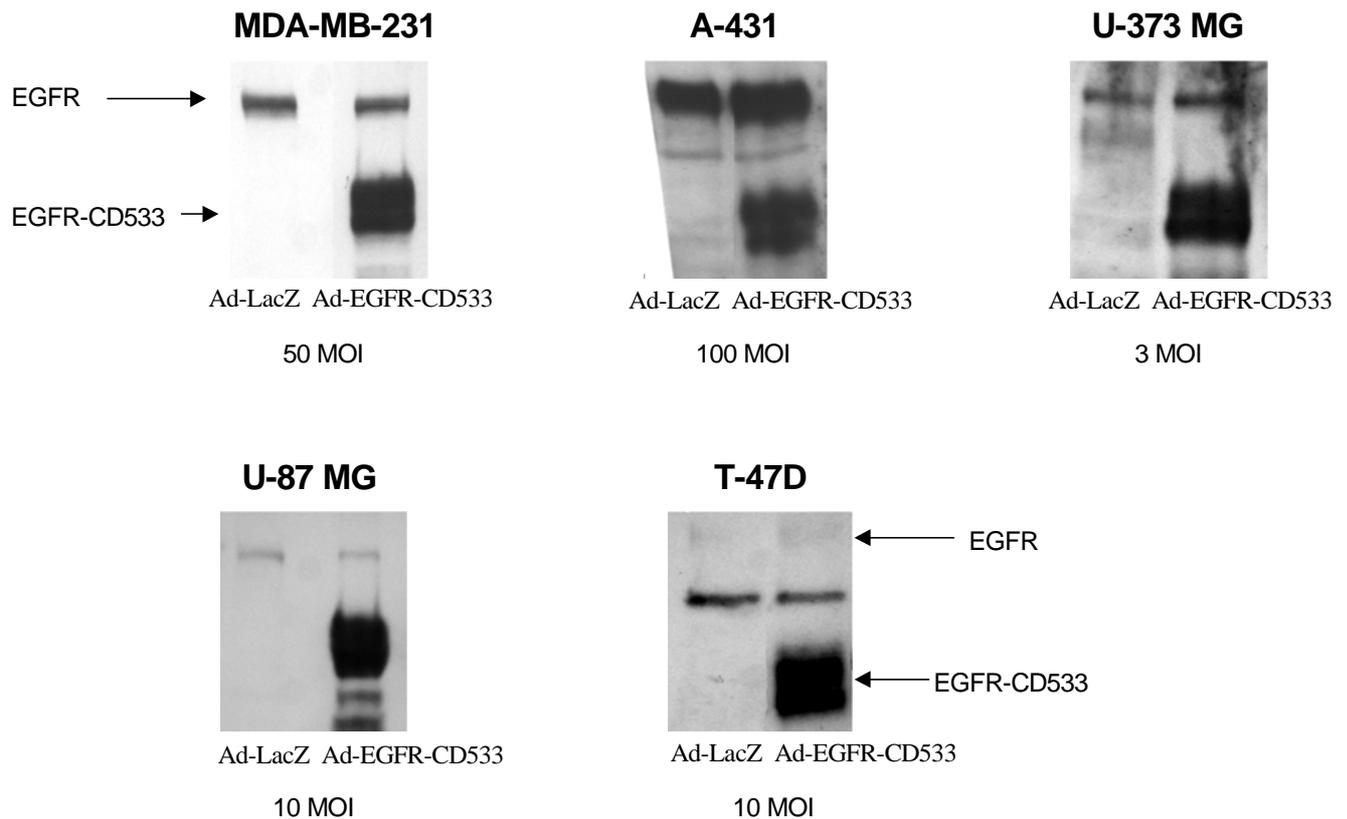


Abbildung 10: Adenoviral- vermittelte Expression von EGFR-CD533 in den untersuchten Zell- Linien. Western Blot Analyse der Expressionsniveaus von EGFR- und EGFR-CD533, 48 Stunden nach Transduktion der Zellen mit Ad-LacZ oder Ad-EGFR-CD533 zu einem Zeitpunkt, an dem in nachfolgenden Experimenten die Bestrahlung durchgeführt wurde. Das Zell-Lysat wurde elektrophoretisch mit SDS-Page fraktioniert. Die Western Blots wurden mit einem Cocktail aus monoklonalen Antikörpern durchgeführt, welche COOH- und NH₂- terminale Bindungsstellen des EGFR aufwiesen.

4.3 Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase mittels adenoviraler Expression des dominant-negativen EGFR-CD533

In früheren Untersuchungen mit der stabil transfizierten EGFR-CD533 Zelllinie wurde gezeigt, daß die Überexpression des dominant-negativen EGFR-CD533 die Funktion und Autophosphorylierung des EGFR durch Protein-Protein Interaktionen ausschaltet (Kashles et al., 1991; Reardon et al. 1999; Contessa et al., 1999). Um zu untersuchen,

ob die Adenovirus- vermittelte Überexpression des EGFR-CD533 eine Auswirkung auf die strahlen- induzierte Aktivierung des EGFR hat, transduzierten wir alle beschriebenen Karzinom- und Gliomzell- Linien, welche eine deutliche Variation im EGFR- Expressionsniveau aufweisen, mit Ausnahme der T-47D Zelllinie (Abb. 7). Das Kontrollvirus Ad-LacZ wurde zusätzlich verwendet, um auch den Einfluß des adenoviralen Vektors auf die strahlen- induzierte Aktivierung des EGFR untersuchen zu können. Die strahlen-induzierte Aktivierung des EGFR wurde anhand der Zunahme der EGFR- Tyr-P gemessen.

Wie in Abbildung 11 dargestellt ist, hatte die Transduktion mit dem Kontrollvektor Ad-LacZ keinen Einfluß auf die strahlen-induzierte Aktivierung des EGFR in den untersuchten Zell- Linien. Die Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy führte zu einer unmittelbaren Stimulation der EGFR- Tyr-P, erkennbar an einem 2.4- bis 5- fachen Anstieg der EGFR-Tyr-P Niveaus relativ zur Kontrolle innerhalb der ersten 5-10 Minuten nach der Bestrahlung. Dieses Aktivierungsprofil des EGFR nach Bestrahlung entspricht für alle untersuchten Zell- Linien dem Effekt, der auch ohne eine adenovirale Transduktion nachweisbar war (Daten nicht gezeigt, Contessa et al., 1999; Reardon et al., 1999; Bowers et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde die strahlen- induzierte Aktivierung des EGFR nach adenoviraler Überexpression des EGFR-CD533 in allen untersuchten Zell- Linien vollständig gehemmt (Abbildung 11). Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Expression von EGFR-CD533 die strahlen- induzierte Aktivierung des EGFR in humanen Karzinom- und malignen Gliomzellen komplett zu hemmen vermag. Des weiteren reduzierte die Expression des EGFR-CD533 signifikant die basale Tyr-P (s. Kontrolle, EGFR-Tyr-P Niveau, in Abb. 11) im Vergleich zu den mit Ad-LacZ transduzierten Kontrollen, ohne daß die EGFR- Expression beeinflußt wurde (Abb. 8). Diese Daten unterstützen frühere Ergebnisse zur stabil transfizierten MDA-

MB- 231- Zelllinie, welche unter Doxycyclin-Kontrolle EGFR-CD533 exprimiert

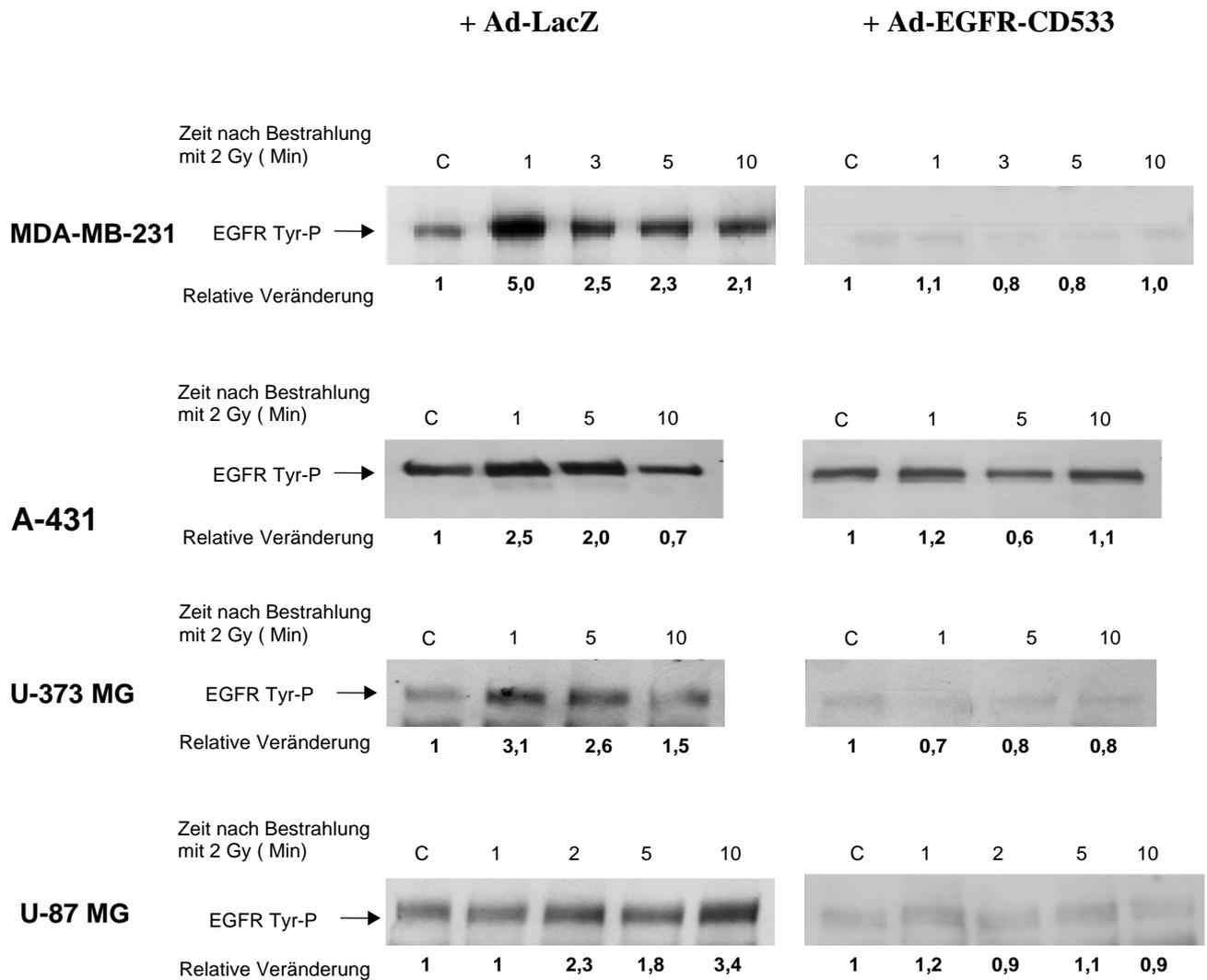


Abbildung 11: Western Blot Analyse des EGFR Tyr-P Niveaus im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung mit 2 Gy für 4 verschiedene Zell- Linien. Links sind die EGFR Tyr-P- Niveaus der mit Ad-LacZ transduzierten Zellen dargestellt, rechts die EGFR Tyr-P- Niveaus der mit Ad-EGFR-CD533-transduzierten Zellen. Nach Immunpräzipitation des EGFR im Zell- Lysat erfolgte die elektrophoretische Fraktionierung und das anschließende Immunblotting mit einem mAb gegen Tyr-P. Die korrespondierenden relativen Veränderungen der Intensitäten der EGFR Tyr-P repräsentieren Veränderungen gegenüber den nicht bestrahlten Kontrollen (C) vor Beginn der Bestrahlung. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

(Contessa et al., 1999). Es zeigte sich, daß EGFR-CD533 die Funktion des EGFR nahezu vollständig hemmt.

4.4 Hemmung der strahlen- induzierten, EGFR- vermittelten pro- proliferativen Aktivierung der MAPK mittels adenoviraler Expression des EGFR-CD533

In früheren Untersuchungen war die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) als eine wichtige nachgeordnete Signalstation für die strahlen-induzierte Aktivierung des EGFR identifiziert worden (Reardon et al., 1999; Schmidt-Ullrich et al., 1997; Carter et al., 1998). Die pharmakologische Hemmung der MAPK- Aktivierung durch den Hemmstoff PD98059 korrelierte mit einer Aufhebung der strahlen-induzierten zellulären Proliferationsantwort (Schmidt-Ullrich et al., 1997; Kavanagh et al., 1995). Zusätzlich zeigten die genetisch hergestellten MDA-CD533 Zellen nach Induktion der EGFR-CD533- Expression eine verminderte strahlen-induzierte MAPK- Antwort (Contessa et al., 1999; Reardon et al., 1999). Um festzustellen, ob die adenovirale Transduktion des

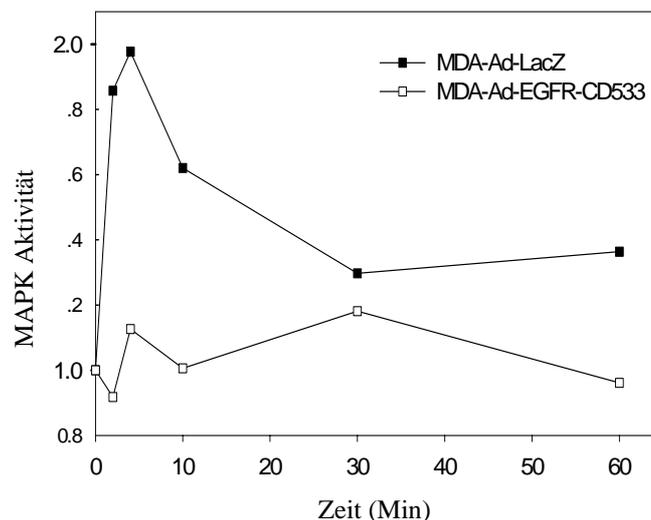


Abbildung 12: MAPK- Aktivität nach Bestrahlung der MDA-MB-231 Zellen mit einer Dosis von 2 Gy. Die MAPK- Aktivität von Zell-Lysat wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung gemessen. Die korrespondierenden relativen Zunahmen der MAPK- Aktivität repräsentieren Veränderungen gegenüber den nicht bestrahlten Kontrollen zum Zeitpunkt 0. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

EGFR-CD533 bei den hier untersuchten Zell- Linien ebenfalls eine Hemmung der strahlen-induzierten MAPK- Aktivierung bewirkt, wurde die MAPK- Aktivität der MDA-

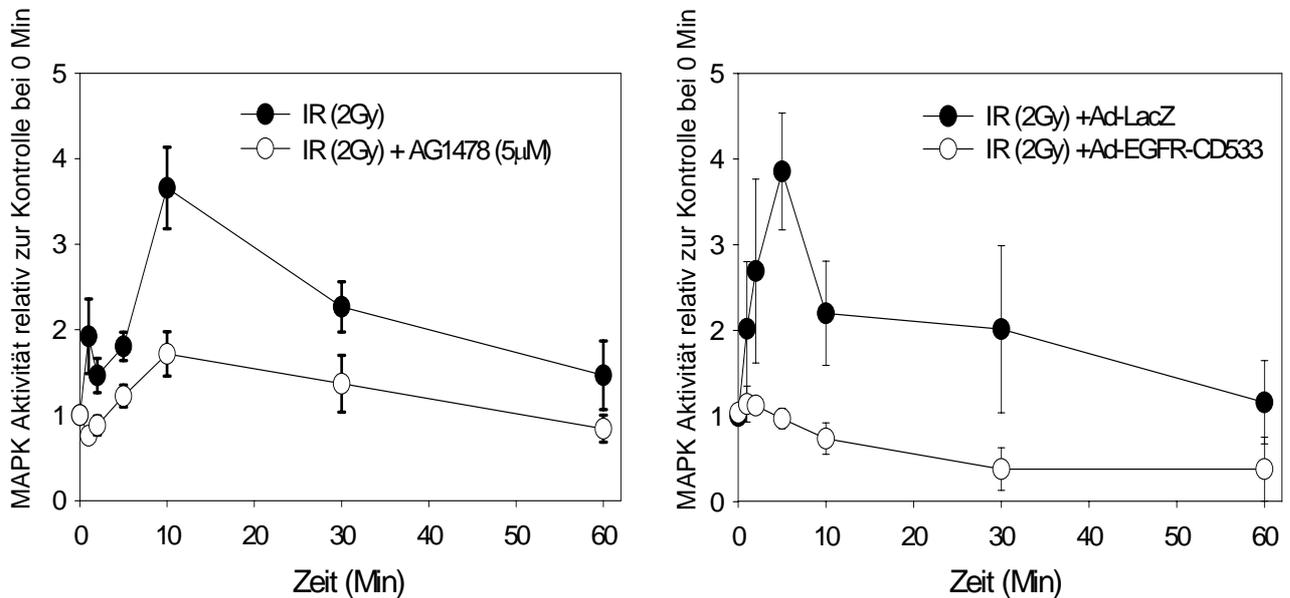


Abbildung 13: Vollständige Hemmung der strahlen- induzierten MAPK- Aktivierung nach 2 Gy Bestrahlung in U-373- MG- Zellen durch adenovirale Überexpression von EGFR-CD533. Die MAPK- Aktivität wurde 48 Stunden nach adenoviraler Transduktion von Ad-LacZ bzw. Ad-EGFR-CD533 oder AG1478- Behandlung zu den angegebenen Zeitpunkten nach einer Einzeitbestrahlung mit 2 Gy gemessen. Die korrespondierenden relativen Zunahmen der MAPK- Aktivität repräsentieren Veränderungen gegenüber den nicht bestrahlten Kontrollen zum Zeitpunkt 0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von je drei unabhängigen Experimenten.

MB-231 und der U-373 MG- Zellen für die Kontroll- und Ad-EGFR-CD533- transduzierten Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 12 und 13). Kontroll- transduzierte MDA-MB-231- Zellen zeigten eine unmittelbare Aktivierung der MAPK bereits fünf Minuten nach der Bestrahlung mit einer maximal 2.0- fachen Aktivierung der MAPK. Demgegenüber ließ sich für die Ad-EGFR-CD533- behandelten Zellen eine Reduktion der MAPK- Aktivität um 77% nach 5 Minuten errechnen.

Auch für die kontroll- transduzierten malignen Gliomzellen wurde eine unmittelbare strahlen- induzierte bis 4-fache Aktivierung der MAPK festgestellt. Die EGFR-CD533- Expression blockierte die Aktivierung der MAPK für U-373 MG Zellen vollständig, während für U-87- MG- Zellen noch eine minimale Restaktivierung der MAPK bis zum 1.8 fachen des Ausgangswertes verblieb. In weiteren Untersuchungsreihen wurde für die malignen Gliomzellen der indirekte Beweis erbracht, daß die Hemmung der strahlen-induzierten MAPK- Aktivierung durch EGFR-CD533 größtenteils auf eine Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung des EGFR zurückzuführen ist (Abb. 13).

Die Behandlung der Zellen mit dem pharmakologischen Hemmstoff der EGFR- Tyrosinkinase, AG1478, führte zu einer mit Ad-EGFR-CD533 vergleichbaren Ausschaltung der strahlen- induzierten Aktivierung des MAPK, wenn auch die Hemmung der MAPK Aktivierung für Ad-EGFR-CD533 behandelte Zellen vollständiger ausfiel. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, daß die Behandlung der untersuchten Zellen mit Ad-EGFR-CD533 die strahlen- induzierte pro-proliferative Aktivierung der MAPK effektiv blockiert. Dies ist in erster Linie auf eine Ausschaltung der EGFR- Funktion zurückzuführen.

4.5 Klonogene Überlebensanalysen zur Strahlensensibilisierung verschiedener Zell- Linien mittels adenoviraler Genexpression des dominant- negativen EGFR nach Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung

Nachdem gezeigt wurde, daß die Überexpression von EGFR-CD533 die strahlen- induzierte Aktivierung der EGFR/MAPK Kaskade aufhebt, untersuchten wir, ob die

Expression von EGFR-CD533 eine Strahlensensibilisierung zu induzieren vermag. Hierzu wurden klonogene Überlebensanalysen nach Bestrahlung mit Einzeildosen zwischen 1 und 8 Gy oder mit fraktionierten Dosen von 2 Gy durchgeführt.

Tabelle 3: Strahlenbiologische Parameter

	Mock	Ad-LacZ	Ad-EGFR-CD533	DER [†]	p [‡]
Einzeit Bestrahlungen (1 – 8 Gy)					
MDA-MB-231					
D ₃₇ [§]	4,01 ± 0,13	4,12 ± 0,21	2,95 ± 0,16	1,40	
\bar{D} ^{//}	3,54 ± 0,13	3,56 ± 0,17	2,63 ± 0,13	1,35	< 0,001
A-431					
D ₃₇	4,55 ± 0,18	4,79 ± 0,31	2,87 ± 0,45	1,67	
\bar{D}	4,03 ± 0,15	4,24 ± 0,26	2,67 ± 0,29	1,59	< 0,001
U-373 MG					
D ₃₇	6,00 ± 0,12	5,18 ± 0,29	3,23 ± 0,60	1,60	
\bar{D}	5,32 ± 0,13	4,60 ± 0,25	3,01 ± 0,34	1,53	< 0,001
U-87 MG					
D ₃₇	7,21 ± 0,14	7,36 ± 0,22	4,93 ± 0,53	1,49	
\bar{D}	6,12 ± 0,16	6,33 ± 0,21	3,42 ± 0,32	1,85	< 0,001
T-47D (4Gy)					
Überlebensrate %		41,74 ± 0,76	26,11 ± 1,33	1,60	< 0,001
		- Dox	+ Dox	DER [†]	p [‡]
MDA-EGFR-CD533					
D ₃₇		3,39 ± 0,23	2,02 ± 0,36	1,68	
\bar{D}		2,94 ± 0,13	1,93 ± 0,25	1,52	< 0,001

Fraktionierte Bestrahlungen (3 x 2 Gy)

	Mock	Ad-LacZ	Ad-EGFR-CD533	DER [†]	p [‡]
MDA-MB-231					
Alpha*	0.17 ± 0.04	0.14 ± 0.06	0.26 ± 0.04		
Alpha Quotient				1.86	
D ₃₇	4.58 ± 0.28	4.91 ± 0.57	3.07 ± 0.09	1.60	
\bar{D}	4.26 ± 0.12	4.64 ± 0.77	2.80 ± 0.14	1.66	< 0.001
U-373 MG					
Alpha	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.18 ± 0.07		
Alpha Quotient				2.00	
D ₃₇	9.25 ± 1.09	9.82 ± 1.65	5.65 ± 0.61	1.74	
\bar{D}	9.06 ± 1.94	8.58 ± 1.55	5.47 ± 0.72	1.57	< 0.001
		- Dox	+ Dox	DER [†]	p [‡]
MDA-EGFR-CD533					
Alpha		0.25 ± 0.10	0.46 ± 0.07		
Alpha Quotient				1.84	
D ₃₇		3.28 ± 0.46	2.30 ± 0.20	1.43	
\bar{D}		3.55 ± 0.39	2.54 ± 0.23	1.40	< 0.001

Fußnote:

* Alle Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichung

[†] DER: "dose enhancement ratios" wurden aus den Quotienten der D₃₇ oder D Werte für Ad-LacZ transduzierte und Ad-EGFR-CD533 transduzierte Zellen ermittelt. DER's für MDA-EGFR-CD533 Zellen wurden aus den Quotienten der D₃₇ - oder D- Werte für unbehandelte und Dox behandelte Zellen errechnet. Der DER- Wert für T-47D Zellen beschreibt den Quotienten aus den Überlebensraten nach 4 Gy Einzeldosis zwischen den Gruppen Ad-LacZ und Ad-EGFR-CD533.

[‡] Statistische Vergleiche der klonogenen Überlebenskurven wurden mit Hilfe des F-Testes durchgeführt; der statistische Vergleich für die Überlebensraten der T47D Zellen nach einer Bestrahlung mit 4 Gy erfolgte mit dem Student' t-Test .

[§] D₃₇: Strahlendosis für eine Zell-Überlebensrate von 37%.

// D: mittlere Inaktivierungsdosis

* Alpha Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes aufgeführt

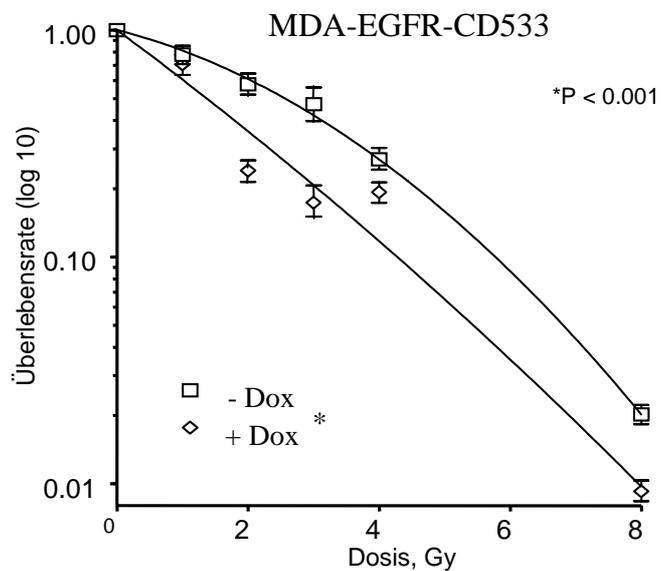
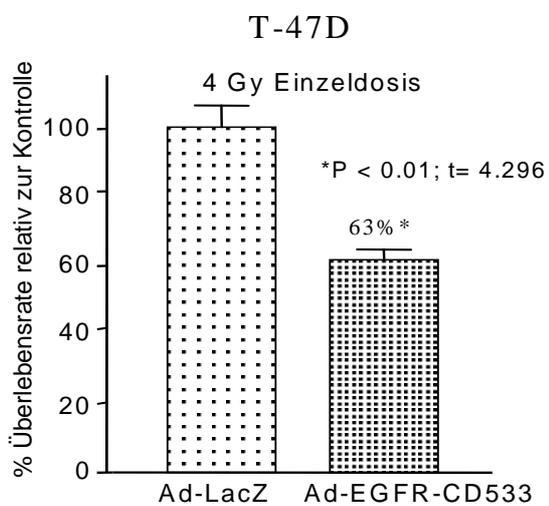
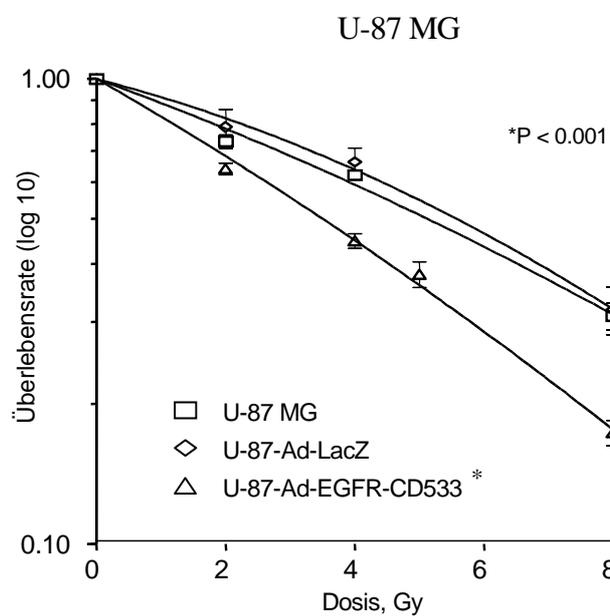
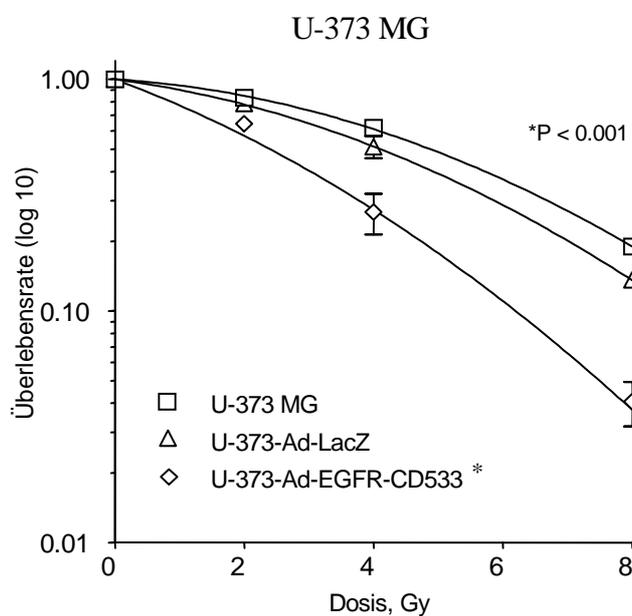
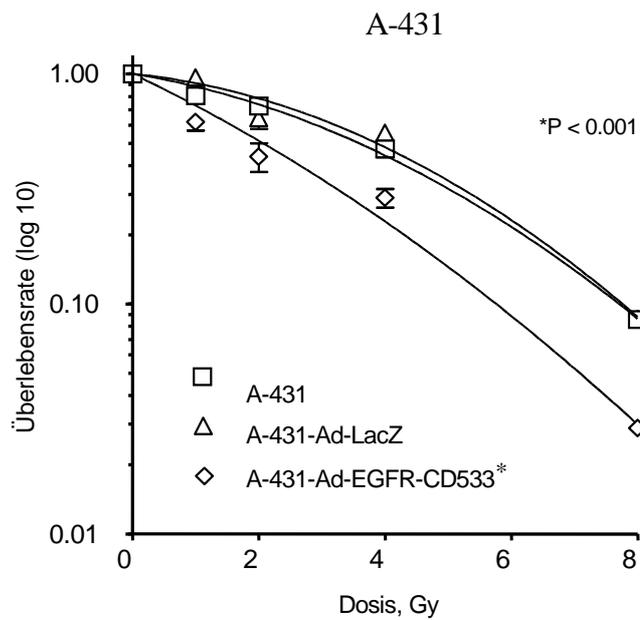
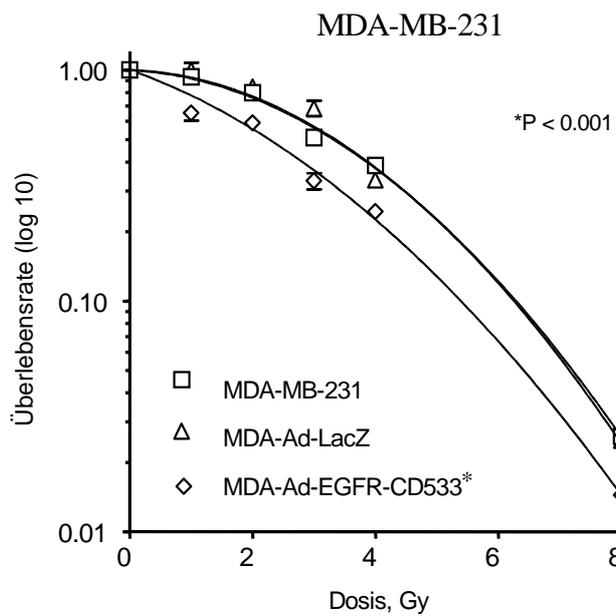
Die Bestrahlungen erfolgten 48 Stunden nach der Transduktion mit dem Kontrollvektor Ad-LacZ, Ad-EGFR-CD533 oder unter Transduktions-identischen Bedingungen (mock). Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen zur Messung des klonogenen Überlebens inkubiert. T-47D Zellen wurden in die Untersuchungen einbezogen, da sie eine Prävalenz von ErbB4 gegenüber EGFR zeigen. Wegen der relativ hohen Zytotoxizität nach adenoviraler Transduktion beschränkten wir uns bei T-47D auf eine Einzeitbestrahlung mit 4 Gy. Als Vergleichsgruppe wurde die stabil transfizierte, unter Doxycyclin-Kontrolle EGFR-CD533 exprimierende Zelllinie MDA-CD533 verwendet, um bei einer erwarteten Expressionsrate des EGFR-CD533 von 100 % für alle Zellen eine optimierte Vergleichsgrundlage zu haben.

Für alle untersuchten Zell- Linien zeigte sich ein identischer Verlauf der Überlebenskurven zwischen kontroll- transduzierten (Ad-LacZ) und mock- behandelten Zellen (Abb. 14). Im Gegensatz dazu wiesen die mit Ad-EGFR-CD533 transduzierten Zellen eine signifikant erhöhte Strahlensensibilität für den gesamten Bereich der getesteten Bestrahlungsdosen auf ($p < 0.001$). In Tabelle 3 sind die anhand der Überlebenskurven für Ad-LacZ oder Ad-EGFR-CD533 transduzierte Zellen berechneten mittleren Inaktivierungsdosen (D) aufgeführt. Des Weiteren sind die für eine Überlebensrate von 37% erforderlichen Bestrahlungsdosen (D_{37}) für die jeweiligen Behandlungsgruppen angegeben. Die DER (Dose Enhancement Ratio)- Werte nach der Behandlung mit Ad-EGFR-CD533 betragen 1.4 für MDA-MB-231 Zellen, 1,7 für A-431 Zellen und annähernd 2,0 für die malignen Gliomzellen U-87 MG und U-373 MG. Der Vergleich der Überlebenskurven von MDA-MB-231 Zellen nach Ad-EGFR-CD533-Transduktion und MDA-CD533 Zellen nach Doxycyclin- Behandlung zeigt nahezu identische Verläufe mit DER-Werten von 1.4 für beide Zell- Linien. Dies ist ein weiterer

Beleg für die hohe Effektivität der adenoviral vermittelten Expression des EGFR-CD533.

Die erhöhte Strahlensensibilisierung nach Ad-EGFR-CD533 Behandlung ließ sich auch bei einem klinisch angelegten Behandlungsprotokoll von 3 fraktionierten Bestrahlungen mit je 2 Gy Einzeldosis feststellen. Dieser erhöhten Strahlensensibilität nach Ad-EGFR-CD533- Transduktion entsprechen DER-Werte von 1.6 bis 2.0 für die untersuchten Zell- Linien (Abb. 14). Daneben erwies sich die Strahlensensibilisierung durch EGFR-CD533 Expression nach fraktionierter Bestrahlung als eine Erhöhung der alpha-Komponente der Überlebenskurven mit „alpha-enhancement- ratio“- Werten von 1.9 bis 2.0 (Tab. 3). Zum Vergleich mit den Ergebnissen der MDA-MB-231 wurden ebenfalls die MDA-CD533 Zellen untersucht. Es ergab sich wiederum ein nahezu identischer Verlauf der Überlebenskurven für die Zellen, welche EGFR-CD533 exprimieren.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß die adenoviral vermittelte Expression des EGFR-CD533 zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung der untersuchten Zell-Linien führt, unabhängig von den unterschiedlichen Expressions-Profilen der ErbB-Rezeptoren der Zellen (Abb. 7). Die adenoviral vermittelte Expression von EGFR-CD533 führt zu identischen Strahlensensibilisierungen in MDA-MB-231 Zellen im Vergleich zur genetisch induzierten Expression in MDA-CD533 Zellen.



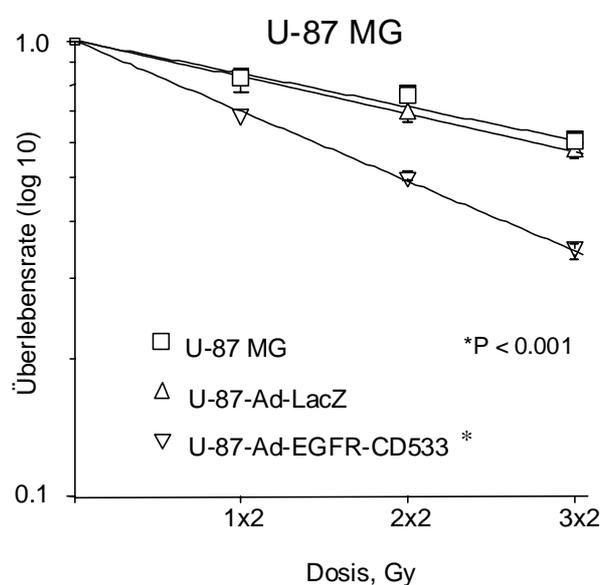
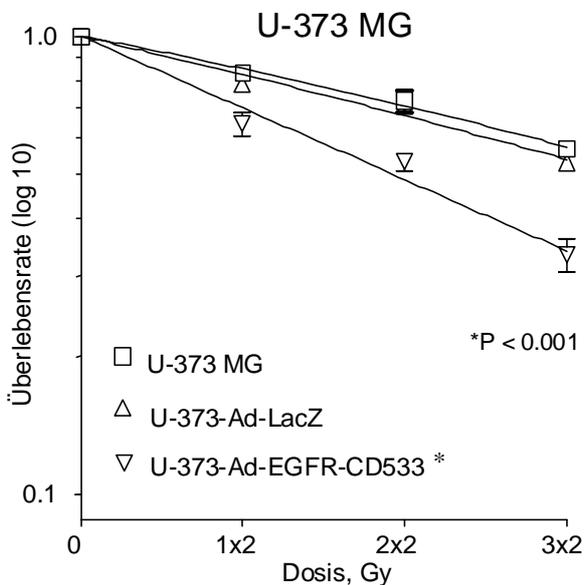
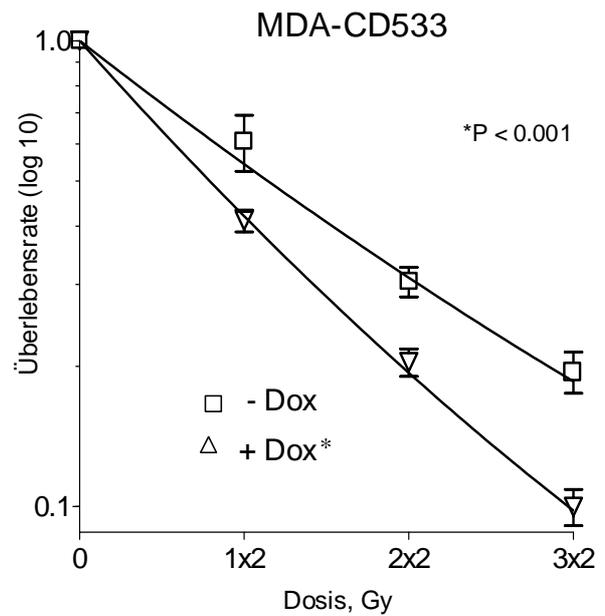
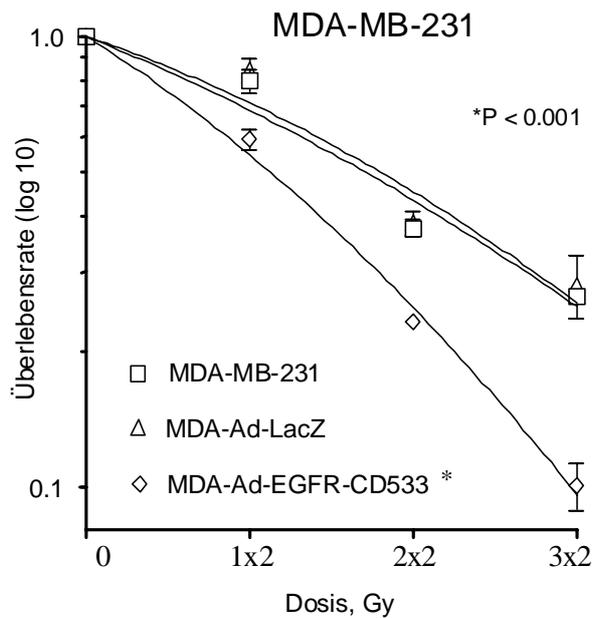


Abbildung 14: Klonogene Überlebensanalysen zur Strahlensensibilisierung verschiedener Zell-Linien mittels adenoviraler oder Doxycyclin-induzierter Expression des EGFR-CD533 nach Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung. 48 Stunden nach der Transduktion mit Ad-LacZ, Ad-EGFR-CD533, unter transduktions-identischen Bedingungen oder nach Dox-Induktion erfolgte die Bestrahlung. 24 Stunden später wurden die Zellen für die klonogene Überlebensanalyse ausgesät. Das logarithmische Überleben errechnete sich relativ zu der Anzahl an ausgesäten Zellen nach Korrektur der Angeheate. Die Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten. Das klonogene Überleben der T-47 D Zellen nach einer Einzeitdosis von 4 Gy ist als Überlebensrate (%) relativ zur kontroll-transduzierten Zellgruppe dargestellt.

4.6 Diskussion

Für ionisierende Bestrahlung war in vorausgehenden Untersuchungen im Dosisbereich von 0,5 bis 5 Gy eine aktivierende Wirkung auf den EGF- Rezeptor in menschlichen Karzinomzell- Linien sowie eine proliferative Antwort in A431 Zellen nachgewiesen worden (Schmidt-Ullrich et al., 1997; Kavanagh et al., 1995). Um hieraus neue therapeutische Ansätze ableiten zu können, entwickelten wir eine genetische Modulation der EGFR- Funktion, da vorausgehende Arbeiten die Vermutung nahe legten, daß durch die strahlen- induzierte EGFR- Aktivierung eine zytoprotektive Antwort über MAPK- Signalvermittlung induziert wird, welche den toxischen Effekten der Bestrahlung entgegenwirkt.

Es wurde anhand der vorgelegten Ergebnisse nachgewiesen, daß die adenoviral vermittelte Überexpression eines dominant-negativen EGFR-CD533 in fünf repräsentativen Zell- Linien, bei denen ein grundlegend unterschiedliches Profil der ErbB- Rezeptor- Expression vorlag, zu einer signifikant erhöhten Radiosensibilität führte. Dabei wurden Verstärkungsfaktoren (dose enhancement ratios) von 1,4 bis 1,9 für alle untersuchten Zell- Linien gefunden. Diese dosisverstärkenden Effekte waren sowohl für Einzelbestrahlungen als auch für fraktionierte Bestrahlungen nachzuweisen. Die Erhöhung der Strahlensensibilität wurde mit der adenoviral- vermittelten Überexpression des EGFR-CD533 erzielt, welche effektiv in allen Zell- Linien induziert werden konnte und die strahlen-induzierte Aktivierung des EGFR und der anderen ErbB- Rezeptoren zu hemmen vermochte. Daneben ließ sich auch eine Hemmung der strahlen-induzierten pro-proliferativen Aktivierung der MAPK nachweisen, so daß es durch EGFR-CD533 Überexpression zu einer funktionellen Inaktivierung der

ErbB/MAPK- Kaskade kommt. Zusammenfassend wurde erstmalig eine direkte strahlensensibilisierende Wirkung des EGFR-CD533 in einem breiten Spektrum humaner Tumorzell- Linien nachgewiesen, nachdem für die EGFR-CD533 Expression bislang nur eine Hemmung der akzelerierten Proliferation der Zelle durch eine Hemmung der strahlen- induzierten zytoprotektiven Antwort beschrieben worden war (Contessa et al., 1999).

Die beschriebenen radiosensibilisierenden Effekte von EGFR-CD533 waren nur möglich, weil die Zellen als Monolayer- Kultur bestrahlt und erst 24 Stunden später für den klonogenen Überlebenstest geerntet worden waren. Diese Bedingungen des verzögerten Aussäens der Zellen für den Koloniebildungstest waren in vorhergehenden Untersuchungen nicht angewandt worden. Deswegen war eine direkte Strahlensensibilisierung durch EGFR-CD533 nicht nachweisbar (Contessa et al., 1999; Kavanagh et al., 1995). Es gibt eine Vielzahl von Erklärungen für die beschriebene erhöhte Strahlensensibilität der Zellen nach EGFR-CD533- Expression. In den vorausgegangenen Untersuchungen waren die Zellen in Suspension innerhalb von 60 Minuten nach der Bestrahlung trypsinisiert worden. Bei dieser Prozedur wurde die Funktionalität der Oberflächenrezeptoren beeinträchtigt. Daher sind die vorgetragenen Ergebnisse ein Hinweis auf die Bedeutung der Integrität und Funktion der Rezeptoren für die zytoprotektive Antwort der Tumorzelle nach einer Bestrahlung. Des weiteren erlaubt die verzögerte Trypsinisierung der Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung, zwischen dem PLDR (potential lethal damage repair) der Kontrollzellen mit funktioneller endogener ErbB- Rezeptor- Expression und den mit EGFR-CD533 behandelten Zellen zu unterscheiden. Der nach wiederholter Bestrahlung mit 2 Gy beobachtete radiosensibilisierende Effekt von EGFR-CD533, welcher durch einen erhöhten alpha-

Koeffizienten gekennzeichnet ist (Tab. 3), unterstützt die Hypothese einer Assoziation von PLDR und strahlen- induzierter Aktivierung der ErbB- Rezeptoren.

Diese Schlußfolgerung wird durch neuere Untersuchungen gestützt, welche einen direkten Zusammenhang zwischen strahlen- induzierter Aktivierung von EGFR/MAPK und einer vermehrten DNA- Reparatur durch eine generelle Stimulierung biosynthetischer Prozesse beschreiben (Huang et al., 2000; Carter et al., 1998; Sale et al., 1999; Kawasome et al., 1998; Yacoub et al., 2001). Eine Unterbrechung dieser Stimulierung durch Ausschaltung der ErbB- Funktionen könnte daher mit einer verminderten DNA- Reparatur und damit verbundenen erhöhten Strahlensensibilität einhergehen. Dieser Zusammenhang wurde auch für Mamma- und Prostatakarzinomzell- Linien nach Blockade des Her-2 (ErbB-2) Rezeptors oder der MAP- Kinase vermutet (Pietras et al, 1999; Hagan et al., 2000)

Die genauen Mechanismen, die einer Strahlensensibilisierung durch EGFR-CD533 zugrunde liegen, sind gegenwärtig nur unzureichend geklärt. Der beschriebene Zusammenhang von strahlen- induzierter ErbB- Aktivierung und Proliferation der Zelle ist möglich. Ein weiterer Mechanismus könnte in der Hemmung der zytoplasmatischen MAPK- Kaskade und weiterer zytoplasmatischer Protein- Kinasen begründet sein, welche eine Reihe von Transkriptionsfaktoren kontrollieren, die mit Zellproliferation und Reparatur assoziiert sind. Diese sind wiederum indirekt mit einer Erhöhung von biosynthetischen Prozessen verbunden. (Sale et al, 1999; Kawasome et al., 1998; Lobenhofer et al., 2000). Auch kann die zelluläre Antwort auf eine ionisierende Bestrahlung von einer veränderten Kontrolle des Zellzyklus beeinflusst sein. Zum Beispiel könnten Verzögerungen in der G₁-S Phase und der G₂-M Transition auftreten,

welche als Tendenz der Zelle zu deuten sind, verbesserte Bedingungen und mehr Zeit für die Reparatur der DNA Schäden zu erzielen (Carter et al., 1998; Liu et al., 1996). Diese Annahmen werden durch neuere direkte experimentelle Ergebnisse unterstützt, die eine Verbindung zwischen der EGFR/MAPK- Aktivierung und der Induktion des Zyklin- abhängigen Kinase- Hemmers p21^{WAF/CIP1} nachgewiesen haben (Dent und Grant, 2001).

Die variierenden Expressionsniveaus der ErbB- Moleküle in den untersuchten Zell-Linien hatten keinen nennenswerten Einfluß auf die strahlensensibilisierende Wirkung der adenoviral-vermittelten Überexpression von EGFR-CD533. Die EGFR-CD533 Expression führte sogar für T-47D Zellen, welche eine sehr geringe Expression von EGFR aufweisen (Abb. 8), zu einer vergleichbar erhöhten Strahlensensibilisierung wie für die anderen untersuchten Zell- Linien (Abbildung 14, Tab. 3). Dies bestätigt Ergebnisse früherer Untersuchungen, die postulierten, daß EGFR-CD533 ebenso mit ErbB-2, ErbB-3 und ErbB-4, welche alle auf relativ hohem Niveau in T-47 D Zellen exprimiert werden, interagieren und deren Funktion durch Heterodimerisierung auf Proteinebene hemmen können (Earp et al., 1995; Redemann et al., 1992; Kashles et al., 1991). Da ionisierende Strahlen alle ErbB Moleküle, die von einer bestimmten Zelllinie exprimiert werden, gleichwertig zu aktivieren vermögen, erweist sich der therapeutische Ansatz einer Trans- Rezeptor- Hemmung durch EGFR-CD533 als ein vorteilhafter Mechanismus zur umfassenden Radiosensibilisierung verschiedener Karzinom- und maligner Gliomzellen, unabhängig von deren jeweiligem ErbB- Expressionsprofil. Diese Trans- Rezeptor- Hemmung von EGFR-CD533 könnte auch die Funktion anderer natürlicher mutierter Varianten des EGFR modulieren. (siehe Kapitel 7,8).

Gegenwärtig werden noch weitere experimentelle Ansätze einer gezielten Hemmung der ErbB- Rezeptoren zur Verbesserung der Strahlensensibilität von Tumorzellen verfolgt (Rao et al., 2000). CI-1033, ein pharmakologischer Tyrophostin- Hemmstoff der EGFR/ErbB Rezeptor Tyrosinkinase Domäne, hemmte das Wachstum von ErbB-exprimierenden Mammakarzinomzell- Linien und erhöhte synergistisch deren Strahlensensibilität (Rao et al., 2000). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen einer erhöhten Strahlensensibilität durch Blockade der EGFR/ErbB- Rezeptor- Tyrosinkinase- Aktivität. Weitere Forschungsaktivitäten konzentrieren sich zur Zeit auf die Anwendung monoklonaler Antikörper gegen EGFR, welche die Bindung an der Liganden- Bindungsstelle blockieren sollen. Der am besten untersuchte und charakterisierte humanisierte mAb-C225 zeigte radio- und chemosensibilisierende Wirkungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und wird deshalb bereits erfolgreich in klinischen Studien untersucht (Bonner et al., 1994; Huang et al., 1999; Milas et al., 2000). Im Vergleich zu EGFR-CD533 zielt der therapeutische Ansatz des C-225 jedoch nur auf einen der vier Rezeptoren der ErbB-Familie (EGFR). Hierdurch könnte eine breitere klinische Anwendung des mAb erschwert werden.

Zusammenfassend belegen diese Daten, daß sowohl humane Mamma- als auch Plattenepithelkarzinom- und maligne Gliomzell- Linien mit Hilfe eines gentherapeutischen Ansatzes unter Verwendung von Ad-EGFR-CD533 transduziert werden, dabei EGFR-CD533 überexprimieren und sowohl für Einzel- als auch für fraktionierte Bestrahlungen in gleichem Maße wirksam sensibilisiert werden können. Dieser therapeutische Ansatz einer funktionellen Ausschaltung der ErbB- Rezeptoren mit dem Ziel einer Strahlensensibilisierung ist für ein breites Spektrum neoplastischer

Zellen anzuwenden, die sowohl in ihren histopathologischen Subtypen als auch in ihren ErbB- Expressionsprofilen variieren. Dadurch konnte die gezielte genetische Ausschaltung der strahlen-induzierten Aktivierung der ErbB- Rezeptoren durch EGFR-CD533 als ein potenziell wirkungsvoller therapeutischer Ansatz zur Strahlensensibilisierung maligner Tumorzellen identifiziert werden.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄKLINISCHEN STUDIEN ZUR STRAHLENSENSIBILISIERUNG HUMANER KARZINOME UND MALIGNER GLIOME MITTELS ADENOVIRALER EXPRESSION DES DOMINANT- NEGATIVEN EGFR-CD533

5.1 Optimierung der intratumoralen Infusion von Ad-EGFR-CD533 in MDA-MB-231 Xeno- Transplantat- Tumoren

Um die gentherapeutische Wirkung von EGFR-CD533 zu optimieren, wurde in weiterführenden präklinischen Studien geprüft, ob die Wirkungsmechanismen *in vivo* denen *in vitro* gleichen und ob der Anteil der mit Ad-EGFR-CD533- transduzierten Tumorzellen die Strahlensensibilität des Tumors beeinflussen kann. Um möglichst günstige Bedingungen für die Verabreichung des adenoviralen Vektors in Xeno-Transplantat- Tumoren etablieren zu können, wurde eine konstante Menge von 10^{10} pfu Ad-LacZ intratumoral in MDA-MB-231- Xeno-Transplantat- Tumoren infundiert. Hierbei verwendeten wir eine unterschiedliche Anzahl an Infusionsnadeln (siehe Methoden). Die Transduktionseffektivität, ermittelt anhand der β -gal positiven Zellen 2 Tage nach der letzten Ad-LacZ- Infusion, ergab 18% (95% Vertrauensbereich 12.6 - 25.8) und 24% (95% Vertrauensbereich 14.7 - 32.1) für die 4- beziehungsweise 6-Nadeltechnik, während die Transduktionseffektivität für die 2x6-Nadeltechnik 44% (95% Vertrauensbereich 38.4 - 52.6) erreichte und damit signifikant höher war als nach einer Einzelinfusion mit 6-Nadeln ($p=0.012$; Abb. 15 A).

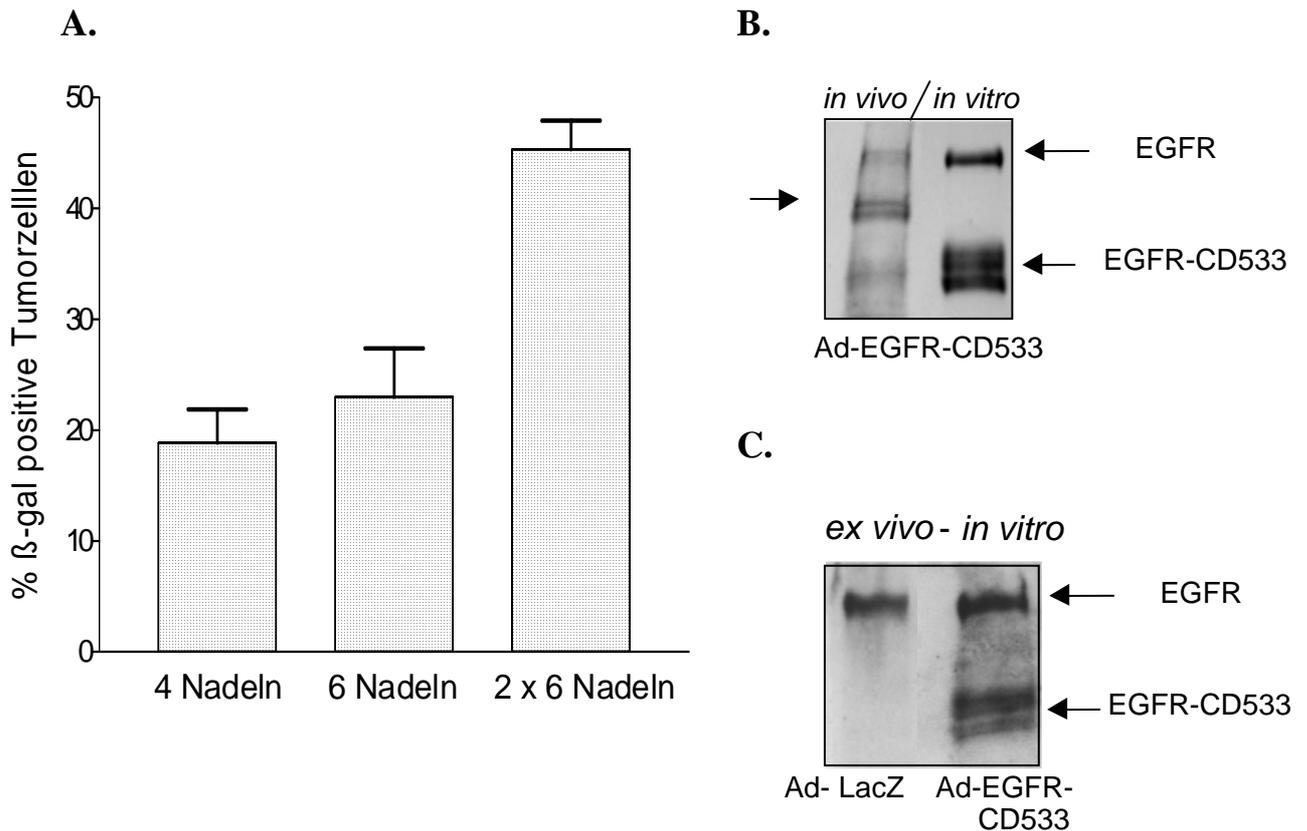


Abbildung 15: Optimierung der intratumoralen Infusion des adenoviralen Vektors in MDA-MB-231 Xeno-Transplantat- Tumoren und Expression von EGFR-CD533 in diesen Tumoren. **A:** MDA-MB-231- Tumoren wurden *in vivo* mittels verschiedener Techniken der intratumoralen Infusion (4,6, und 2 x 6 Nadeln) mit der gleichen Quantität an Ad-LacZ (10^{10} pfu) transduziert. Die Tumoren wurden 48 Stunden nach der letzten Infusion isoliert. In Einzelzellsuspensionen wurde der Prozentsatz β -gal positiver Tumorzellen quantifiziert. **B,C:** Induktion der EGFR-CD533 Expression in MDA-MB-231- Tumoren 48 Stunden nach der intratumoralen 2 x 6 Nadel- Infusion von Ad-EGFR-CD533. **B:** EGFR und EGFR-CD533 Expressionsniveaus *in vivo* in gefrorenem Tumorgewebe im Vergleich zu *in vitro* Expressionsniveaus. **C:** EGFR und EGFR-CD533- Expressionsniveaus 96 Stunden nach Isolierung der Tumorzellen aus dem Tumor und Aussaat in Kultur *in vitro* (*ex vivo* – *in vitro*)

Mit Hilfe dieser 2x6-Nadel- Infusion von Ad-EGFR-CD533 ließ sich durch Western-Blot- Analyse im Tumor eine Expression des EGFR-CD533 nachweisen, die der Expressionsmenge des endogenen EGFRwt entspricht (Abb. 15 B). Die Expressionsmenge des exogen transduzierten EGFR-CD533 und des endogenen EGFRwt war in Zellen von MDA-MB-231- Tumoren deutlich niedriger als in MDA-MB-231 Zellen, bei denen eine Transduktion des EGFR-CD533 *in vitro* erfolgte. Dies war bereits vorher für

EGFRwt an A-431 Plattenepithelkarzinomen beschrieben worden (Mansbridge et al., 1994). Des weiteren exprimierten Tumorzellen, welche *in vivo* mit Ad-LacZ oder Ad-EGFR-CD533 transduziert worden waren, nach Kultivierung *in vitro* über weitere 96 h deutlich höhere Mengen an EGFRwt und EGFR-CD533- Protein (Abb. 15 C). Diese Ergebnisse zeigen, daß die intratumorale Verabreichung des Ad-EGFR-CD533 zu einer effektiven Transduktion und Expression des Transgens in Tumorzellen führt.

5.2 EGFR-CD533 Expression und Funktion in menschlichen Mammakarzinomzellen *in vivo*

Durch die beschriebenen Ergebnisse wurde nachgewiesen, daß die EGFR-CD533 Expression die strahlen- induzierte Aktivierung des EGFR *in vitro* zu hemmen vermag. Wir untersuchten nun in weitergehenden präklinischen Studien, ob diese Effekte der EGFR-CD533 Expression auch für MDA-MB-231 Xeno- Transplantat- Tumoren gültig sind. Zunächst war festzustellen, ob eine strahlen- induzierte Aktivierung des EGFR auch *in vivo* auftritt. Hierzu wurden etablierte MDA-MB-231 Xeno-Transplantat- Tumoren mit einer Einzeitdosis von 4 Gy bestrahlt (siehe Methoden). Während diese Bestrahlung die Menge des exprimierten EGFR- Proteins in den Tumorzellen nicht veränderte, induzierte sie eine unmittelbare Aktivierung des EGFR innerhalb von 2 bis 10 Minuten, die am 2.5 bis 5-fachen Anstieg der EGFR Tyr-P zu erkennen ist (Abb. 16 A). Um die funktionelle Konsequenz der EGFR-CD533 Expression auf die strahlen- induzierte Aktivierung von EGFR *in vivo* untersuchen zu können, verwendeten wir MDA-EGFR-CD533 Tumoren, da alle Tumorzellen nach intraperitonealer Verabreichung des Doxycyclin zur Expressierung des EGFR-CD533 angeregt werden können. Nachdem die Voraussetzungen für eine optimale Induzierung der EGFR-CD533 Expression durch wiederholte Injektionen des Doxycyclin in MDA-EGFR-CD533

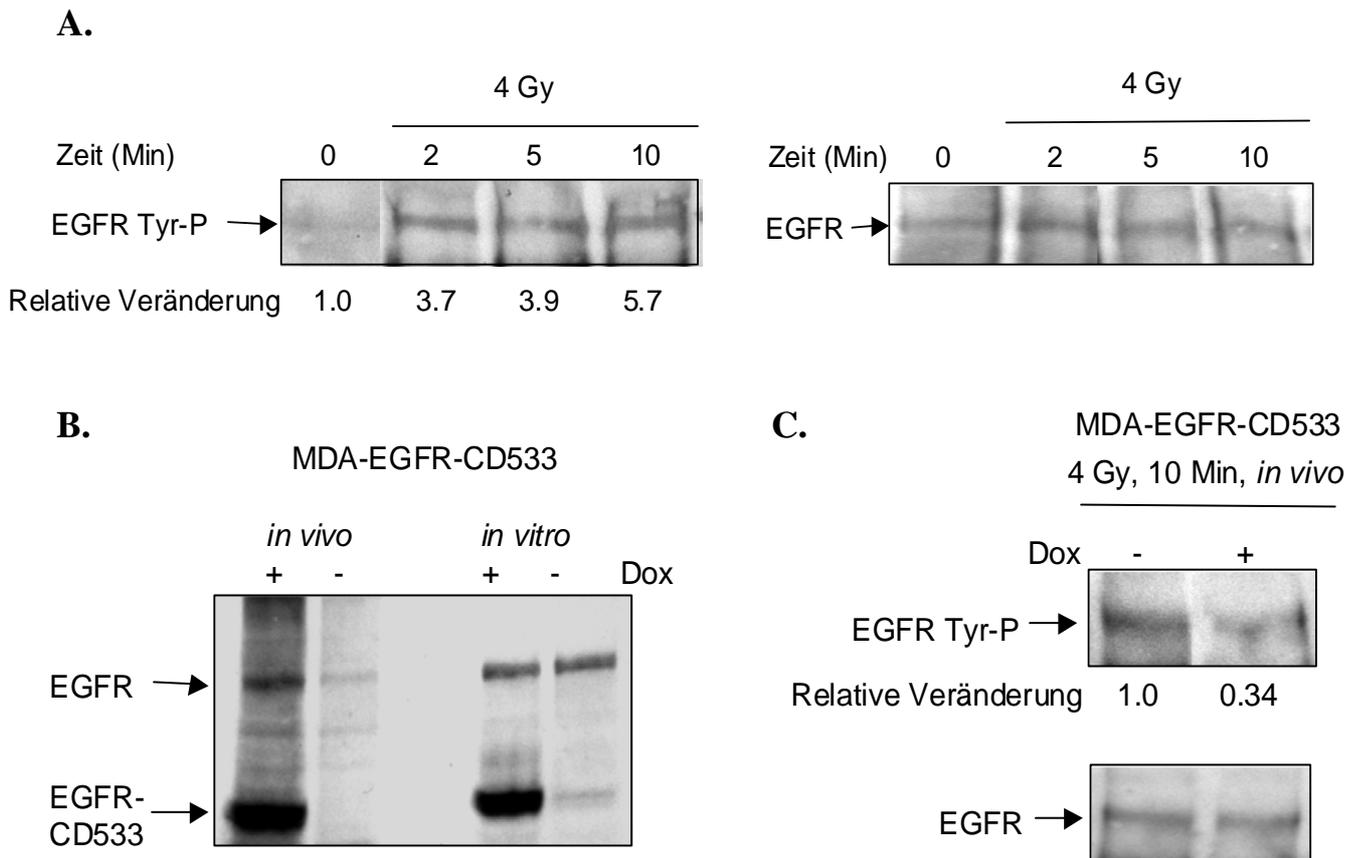


Abbildung 16: Strahlen-induzierte Aktivierung von EGFR *in vivo* sowie Expression und Funktion von EGFR-CD533 in MDA-EGFR-CD533 Xeno-Transplantat- Tumoren. A: MDA-MB-231 Tumoren wurden mit einer Einzeitdosis von 4 Gy bestrahlt. Die EGFR Tyr-P sowie die EGFR Proteinmenge wurde zu den dargestellten Zeitpunkten nach der Bestrahlung gemessen. **B:** EGFR-CD533 Proteinexpression wurde in stabil transfizierten MDA-EGFR-CD533 Zellen nach Dox Behandlung *in vivo* und *in vitro* untersucht. **C:** MDA-EGFR-CD533 Tumoren wurden mit (+Dox) und ohne (-Dox) Dox- induzierte EGFR-CD533 Expression mit 4 Gy bestrahlt. Die EGFR Tyr-P wurde 10 Min. nach der Bestrahlung gemessen. Die Blots wurden ebenfalls mit einem anti-EGFR- mAb behandelt, um für beide Proben die gleiche Menge an EGFR- Protein zu überprüfen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten

Tumoren geschaffen worden waren (siehe Methoden), wurde die maximal induzierbare Expressionsrate des EGFR-CD533 in MDA-EGFR-CD533 Tumoren mit der von *in vitro* induzierten MDA-EGFR-CD533 Zellen verglichen (Abb. 16 B). Von den insgesamt 20 untersuchten MDA-EGFR-CD533 Tumoren wiesen mehr als 80% EGFR-CD533 Expressionsraten auf, die mit den *in vitro* Ergebnissen vergleichbar waren (Abb. 16 B). Die übrigen Tumoren wiesen dagegen intermittierende oder niedrige Expressionsraten

des Transgens auf. Nur solche Tumoren, bei denen eine hohe Expressionsrate des EGFR-CD533 nachweisbar war, wurden für Experimente verwendet, die die funktionellen Konsequenzen der EGFR-CD533 Expression untersuchten. Wie in Abbildung 16 C gezeigt ist, wurde die strahlen-induzierte Aktivierung von EGFR 10 Minuten nach der Bestrahlung in MDA-EGFR-CD533 Tumoren, welche mit Doxycyclin induziert worden waren, um das dreifache reduziert (2.94; 95% Vertrauensbereich 2.23-4.14):

Dies bedeutet, daß die strahlen-induzierte Aktivierung des EGFR bei Tumoren *in vivo* in identischer Weise erfolgt wie bei *in vitro* kultivierten Zellen. Die Expression von EGFR-CD533 hemmt somit die strahlen-induzierte Aktivierung des EGFR sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

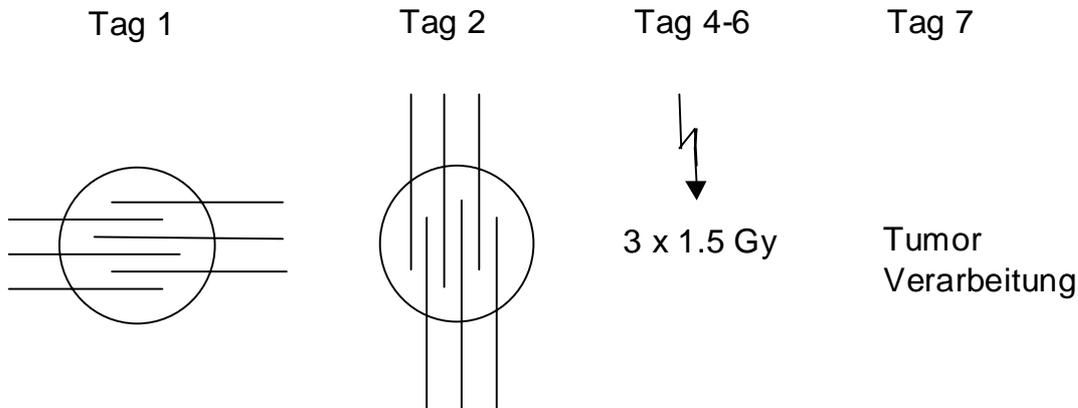
5.3 EGFR-CD533 Expression *in vivo* und Quantifizierung der Strahlensensibilisierung der Tumoren

Es wurde gezeigt, daß die *in vitro* Induktion der EGFR-CD533 Expression MDA-MB-231 Zellen strahlensensibilisiert, unabhängig davon, ob die EGFR-CD533 Induktion durch stabile Integration des Gens in MDA-EGFR-CD533 Zellen oder durch Transduktion von MDA-MB-231 Zellen durch Ad-EGFR-CD533 erfolgt (Abb. 14). Diese Studien wurden auf präklinische Untersuchungen ausgeweitet, bei denen die Möglichkeit der Strahlensensibilisierung von MDA-MB-231 Tumoren bei *in vivo* Expression des EGFR-CD533 getestet worden war. Hierbei wurde nach der Bestrahlung der Tumoren eine *ex vivo* klonogene Überlebensanalyse durchgeführt, um die Effekte der Behandlung speziell für Tumorzellen untersuchen und quantifizieren zu können (siehe Methoden). Basierend auf vorausgegangenen Arbeiten zur strahlen-

induzierten Aktivierung des EGFR und der Proliferationsaktivierung nach wiederholten Bestrahlungen (Contessa et al., 1999; Kavanagh et al., 1995; Schmidt-Ullrich et al., 1997) wählten wir ein Bestrahlungsprotokoll von 3 Einzeldosen von 1.5 Gy an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Es resultierte eine 50%ige klonogene Überlebensrate der bestrahlten Tumorzellen im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Bestrahlungssequenz wurde ausgewählt, um eine mögliche Erhöhung der Strahlensensibilität durch die EGFR-CD533 Expression erfassen zu können. Die Untersuchungen zur Strahlensensibilisierung der MDA-MB-231 Tumorzellen nach Transduktion mit Ad-EGFR-CD533 wurden mit Hilfe der beschriebenen optimierten Ad-Infusionstechnik von 2x6-Nadel- Infusionen (44% Transduktionsrate; Abb. 15 A) und dem Bestrahlungsprotokoll von 3 x 1.5 Gy durchgeführt (Abb. 17 A). Die Tumorzellen, welche *in vivo* mit Ad-EGFR-CD533 transduziert worden waren, zeigten eine statistisch signifikante 46%ige Reduktion des klonogenen Überlebens ($p < 0.001$), woraus ein DER- Wert von 1.85 (95% Vertrauensbereich = 1.54 - 2.51; Abb. 17 B) im Vergleich zu den Ad-LacZ transduzierten Kontroll- Tumorzellen errechnet wurde.

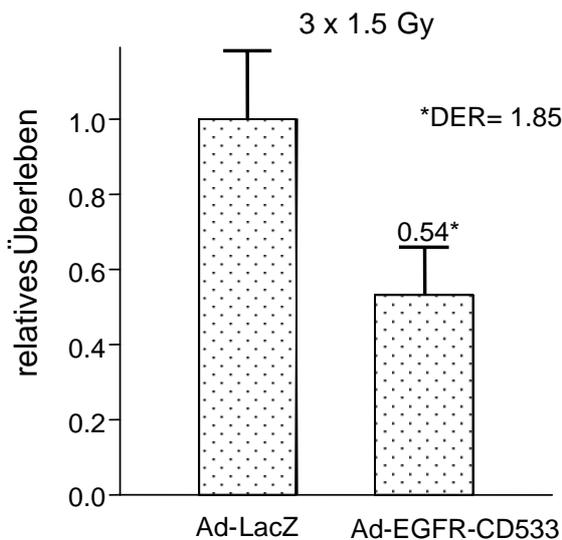
Diese Strahlensensibilisierungsparameter der Ad-EGFR-CD533 Behandlung wurden mit denen verglichen, die für die stabil hergestellten MDA-EGFR-CD533 Tumoren nach EGFR-CD533 Induktion durch Doxycyclin ermittelt wurden. Die klonogenen Überlebensdaten nach Korrektur der Angehrate ergaben, daß MDA-EGFR-CD533 Tumorzellen nach Induktion der EGFR-CD533- Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe eine statistisch signifikante, 38%ige Reduktion des klonogenen Überlebens aufwiesen ($p < 0.001$). Hieraus ergab sich ein DER- Wert von 1.61 (95% Vertrauensbereich = 1.51 - 1.70; Abb. 17 C).

A.



B.

MDA-MB-231 Tumoren, Ad Transduktion *in vivo*



C.

MDA-EGFR-CD533 Tumoren

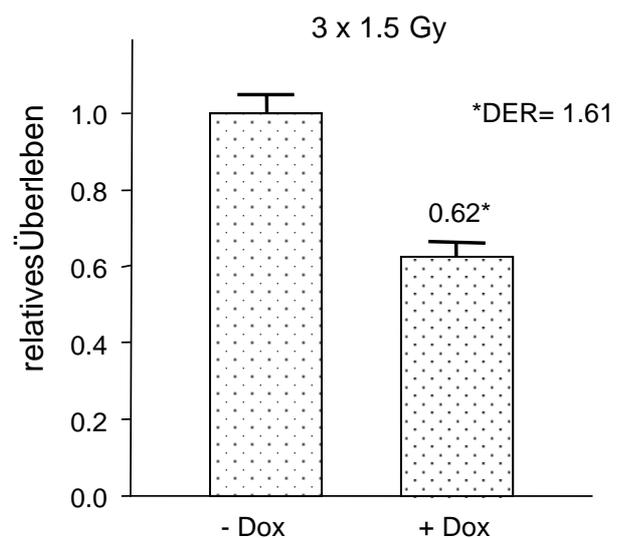


Abbildung 17: Strahlensensibilisierung von MDA-MB-231 Xeno-Transplantat-Tumoren nach intratumoraler Infusion von Ad-EGFR-CD533. A: Schematische Darstellung der 2 x 6 Nadeltechnik zur experimentellen *in vivo* Testung der strahlensensibilisierenden Effekte der intratumoralen Infusion von Ad-EGFR-CD533. B,C: Darstellung der Effekte der EGFR-CD533 Expression *in vivo* auf die Strahlensensibilität von MDA-MB-231 und MDA-EGFR-CD533 Tumoren nach Bestrahlung mit 1,5 Gy an drei aufeinanderfolgenden Tagen mittels *ex vivo* Koloniebildungstest.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß eine 44%ige Transduktion der MDA-MB-231 Tumorzellen mit Ad-EGFR-CD533 einen Grad der Strahlensensibilisierung erzielen kann, der dem bei MDA-EGFR-CD533 Tumoren gleichwertig ist. Bei diesen ist

nach Induktion eine 100%ige Expression des EGFR-CD533 zu erwarten. Ferner konnte die Durchführbarkeit der adenoviral vermittelten Gentherapie zur Erzielung einer Strahlensensibilisierung demonstriert werden. Die Strahlensensibilisierung nach fraktionierten Bestrahlungen unterstreicht die klinische Relevanz dieser Ergebnisse.

5.4 Tumor-Strahlensensibilisierung durch adenoviral vermittelte Gentherapie mit EGFR-CD533

Nachdem wir die Durchführbarkeit der adenoviral vermittelten Gentherapie mittels EGFR-CD533 Transduktion der Tumorzellen nachgewiesen haben und die Strahlensensibilisierungseffekte der Behandlung speziell für die Tumorzelle quantifiziert wurden, zielten unsere weiteren Untersuchungen auf eine klinisch orientierte Analyse des Tumorwachstums nach Gentherapie und Strahlenbehandlung verschiedener Xeno-Transplantat- Tumoren. Diese Analysen zur Wachstumsverzögerung sind der klinischen Behandlungssituation angenähert und stellen allgemein übliche präklinische Untersuchungen einer neuen Behandlungsform zur Tumorkontrolle dar. A-431 und MDA-MB-231 Xeno-Transplantat- Tumoren wurden wie in „Material und Methoden“ beschrieben produziert. Bei einem maximalen Tumordurchmesser von 6-10 mm erfolgte die Infusion von Ad-LacZ als Vektor für die Kontrollgruppe beziehungsweise Ad-EGFR-CD533 für die Therapiegruppe mit der 2x6 Nadeltechnik (Abb. 17 A und „Material und Methoden“). Zwei Tage nach der letzten Vektorinfusion begann die fraktionierte Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 2 Gy an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Im Gegensatz zur *ex vivo* klonogenen Überlebensanalyse mußte die Bestrahlung bei der Wachstumsverzögerungsanalyse als lokale fokale Bestrahlung des Tumors bei der anästhesierten Nacktmaus erfolgen, um die Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Der erste Tag der Bestrahlung wurde als Referenztag für das

Tumorvolumen an Tag 0 gewählt und entsprechend der Darstellung in Abbildung 18 gleich 1 gesetzt. Nachfolgend wurde in ca. 3 tägigen Abständen das Tumorvolumen bestimmt und relativ zum Referenzvolumen berechnet.

Abbildung 18 A zeigt die Ergebnisse der Tumorzvolumenanalyse für A-431 Tumoren, welche zunächst nur mit den Kontroll- beziehungsweise Therapievektoren infundiert wurden, ohne anschließend zu bestrahlen. Es ergab sich hier eine initiale Wachstumsverzögerung der mit Ad-EGFR-CD533 infundierten Tumoren über ein Zeitintervall von 7,5 Tagen bis zum Erreichen des doppelten Tumorzvolumens gegenüber 4 Tagen für Ad-LacZ infundierte Tumoren. Diese initiale Wachstumsverzögerung war im weiteren Verlauf nicht mehr nachweisbar mit nahezu identischen Zeitintervallen beider Gruppen bis zum Erreichen des vierfachen Tumorzvolumens nach 25 Tagen. Dagegen führte die Bestrahlung der Tumoren beider Gruppen in einem weiteren experimentellen Aufbau zu einer konstanten signifikanten Wachstumsverzögerung der mit Ad-EGFR-CD533 infundierten Tumoren (Abbildung 18 B). Eine Tumorverdopplungszeit von ca. 15 Tagen gegenüber 4 Tagen und eine zweifache Tumorverdopplungszeit von ca. 28 gegenüber 13,5 Tagen für die mit Ad-EGFR-CD533 therapierten Tumoren markiert eine signifikante Wachstumsverzögerung von mehr als dem 2-fachen gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0.001$; F-Test). Wegen des zuvor beschriebenen nur grenzwertigen Einflusses der Ad-EGFR-CD533-Therapie auf die Tumorzvolumengeschwindigkeit der A-431 Tumoren ohne Bestrahlung konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen mit MDA-MB231 Xeno-Transplantat-Tumoren auf den Vergleich der beiden Gruppen mit zusätzlicher Bestrahlung. Abbildung 19 verdeutlicht den signifikanten Unterschied der Tumorzvolumengeschwindigkeiten für die beiden Gruppen ($p < 0.001$; F-Test).

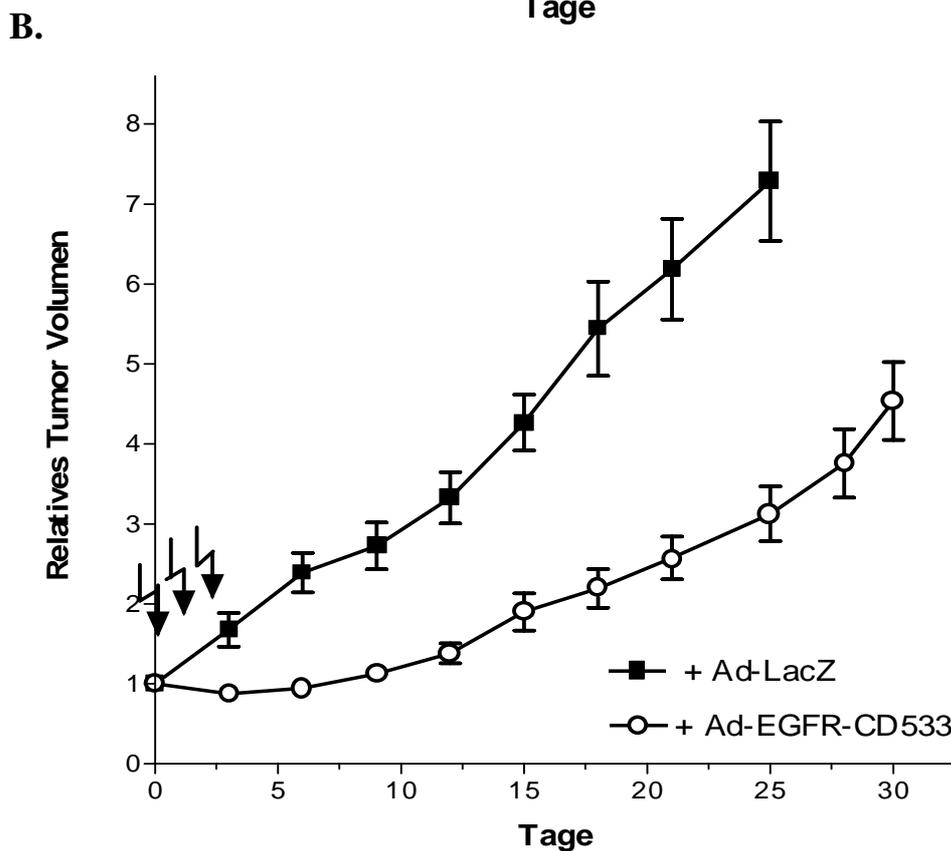
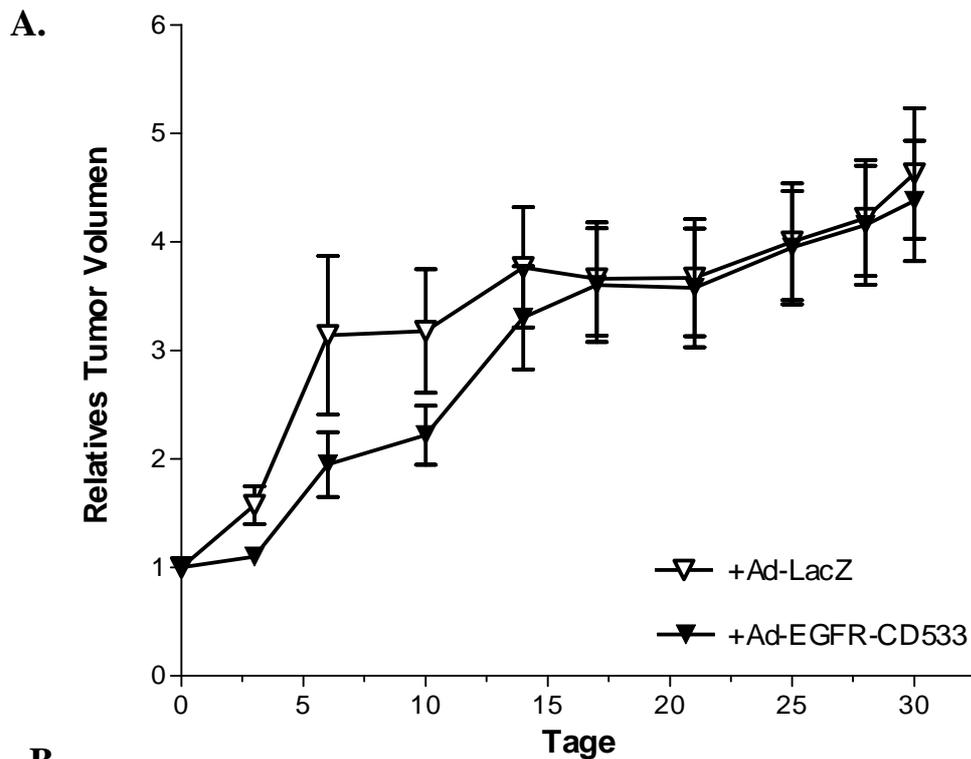


Abbildung 18: Tumorwachstumsanalyse für A-431 Xeno-Transplantat- Tumoren nach intratumoraler Infusion von Ad-LacZ oder Ad-EGFR-CD533 ohne (A) oder mit (B) Bestrahlung der Tumoren mit einer Dosis von jeweils 2 Gy an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Das Tumolvolumen 2 Tage nach der letzten Ad- Infusion bei Verwendung der 2 x 6 Nadeltechnik wurde als relatives Tumolvolumen gleich 1 gesetzt (= Tag 0). Alle nachfolgenden Volumenmessungen in dreitägigen Abständen wurden in Relation zu diesem Referenzvolumen an Tag 0 gesetzt. Es wurden 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

Während die Kontrollgruppe bereits nach ca. 20 Tagen die Tumorverdopplungszeit erreichte, war dies für die mit Ad-EGFR-CD533 therapierte Gruppe im Beobachtungszeitraum nicht nachzuweisen. Eine Extrapolation der Wachstumskurve ergab eine Tumorverdopplungszeit von ca. 60 Tagen. Die Gruppe der mit Ad-EGFR-CD533 therapierten MDA-MB-231 Tumoren erreichte das initiale Referenzvolumen erst nach ca. 30 Tagen. Somit konnte auch für die MDA-MB-231 Tumoren ein signifikant verzögertes Wachstum durch Ad-EGFR-CD533- Therapie mit simultaner Bestrahlung ermittelt werden.

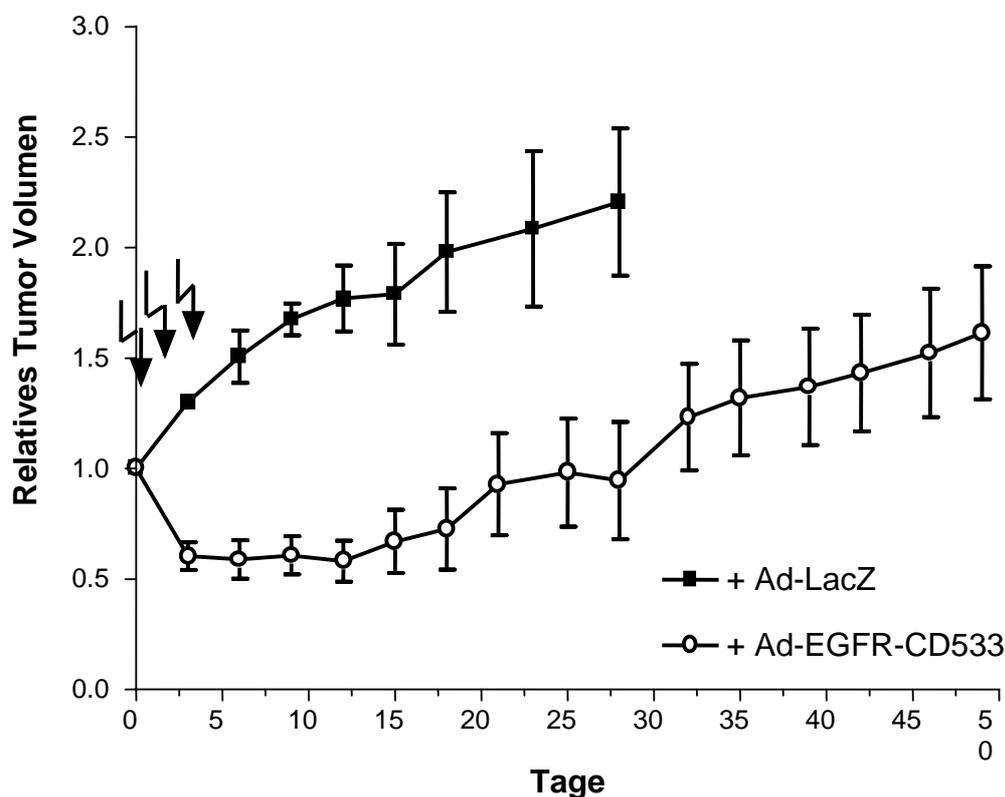


Abbildung 19: Tumorwachstumsanalyse für MDA-MB-231 nach intratumoraler Infusion von Ad-LacZ oder Ad-EGFR-CD533 und 3- tägiger Bestrahlung mit jeweils 2 Gy. Das Tumolvolumen 2 Tage nach der letzten Ad-Infusion bei Verwendung der 2 x 6 Nadeltechnik wurde als relatives Tumolvolumen gleich 1 gesetzt (= Tag 0). Alle nachfolgenden Volumenmessungen in dreitägigen Abständen wurden in Relation zu diesem Referenzvolumen an Tag 0 gesetzt. Es wurden 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

5.5 Diskussion

Es wurde gezeigt, daß MDA-MB-231 Xeno-Transplantat- Tumoren durch intratumorale Gabe von Ad-EGFR-CD533 effektiv *in vivo* transduziert werden. Hierdurch kam es zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung der Tumorzellen. Dies ist vergleichbar mit der Strahlensensibilisierung von MDA-CD533 Xeno- Transplantat- Tumoren, die unter der Kontrolle eines Doxycyclin- induzierbaren Promotors EGFR-CD533 exprimieren (Contessa et al., 1999). Auch im Tumorwachstums- Verzögerungstest ließen sich durch *in vivo* Transduktion von Ad-EGFR-CD533 signifikante Strahlensensibilisierungen der MDA-MB-231 und A-431 Xeno-Transplantat- Tumoren feststellen. Somit erweist sich auch in den dargestellten präklinischen Xeno-Transplantat- Modellen die genetische Ausschaltung der EGFR- Funktion als ein potenziell wirksamer therapeutischer Ansatz zur gezielten Strahlensensibilisierung von Tumoren.

Die *ex vivo* – *in vitro* Experimente erlaubten es, die *in vivo* Effekte der Strahlensensibilisierung zu quantifizieren und die zuvor *in vitro* etablierten Mechanismen auch *in vivo* zu verifizieren (Schmidt-Ullrich et al., 1996; Contessa et al., 1999; Reardon et al., 1999). Unsere Ergebnisse legen nahe, daß es mindestens zwei Mechanismen gibt, die an den *in vivo* Effekten der Strahlensensibilisierung beteiligt sind. Diesen war vorher auch die Expression von EGFR-CD533 zugeschrieben worden. Ein Mechanismus besteht in der gezielten Ausschaltung der strahlen- induzierten proliferativen Antwort der Zelle, welche zuvor durch fraktionierte Bestrahlungen nachgewiesen worden war (Schmidt-Ullrich et al., 1996; Contessa et al., 1999). Ein weiterer Mechanismus wäre durch einen Einfluß von EGFR-CD533 auf den Zellzyklus und/oder die DNA Reparatur zu erklären, welche zu einer erhöhten Strahlensensitivität

im Koloniebildungstest führen (Khandelwal et al., 1999). Sowohl die direkte Strahlensensibilisierung als auch die Hemmung der Zellproliferation könnten somit an einer erhöhten Strahlensensitivität *in vivo* beteiligt sein.

Wir verwendeten in unseren präklinischen Untersuchungen zunächst die *ex vivo* Koloniebildungstests, da sie einen direkten Vergleich der zellulären Strahlenüberlebensdaten mit den zuvor beschriebenen *in vitro* Koloniebildungstests erlaubten. Zudem ließ sich ein direkter quantitativer Vergleich der Strahlensensibilisierungseffekte an den Tumorzellen *in vivo* durch adenoviral induzierte EGFR-CD533 Expression und durch EGFR-CD533 Expression in allen Tumorzellen durchführen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die erzielte 44%ige Transduktion der MDA-MB-231 Tumorzellen mit Ad-EGFR-CD533 bereits eine biologische Effektivität erreicht, die einer 100%igen Expression des Transgens entsprechen würde. Dies legt nahe, daß die therapeutische Wirkung der EGFR-CD533 Expression über einen sogenannten „Bystander Effekt“ an alle Tumorzellen im Xenon-Transplantat-Tumor vermittelt wird, und daß somit eine etwa 40%ige Transduktionsrate der Tumorzellen in der Gentherapie der EGFR-CD533 Transduktion ausreichen könnte (Namba et al., 2001; Ahonen et al., 2002; Wilson et al., 2002). Es ließ sich auch für die U-87 MG Xeno-Transplantat-Tumoren trotz der mit 70% deutlich höheren Transduktionsrate im Vergleich zu den MDA-MB-231 Tumoren eine Erhöhung der Strahlensensibilität der Tumorzellen um etwa 50% nachweisen.

Nach der im *ex vivo* Koloniebildungstest quantifizierten Strahlensensibilisierungseffekte zielten die weiteren Untersuchungen auf ein klinisch orientiertes Behandlungsregime der Tumorstadiumsverzögerungsanalyse. Während die Behandlung der A-431 Tumoren mit Ad-EGFR-CD533 nur zu einer initialen

Beeinträchtigung des Tumorwachstums führte, zeigte sich in Verbindung mit einer fraktionierten Bestrahlung eine signifikante additive Wachstumsverzögerung der Tumoren über den gesamten Zeitraum der Untersuchung. Die zuvor in den ex vivo Koloniebildungstests quantifizierte signifikante Halbierung der Überlebensraten für die MDA-MB-231 Tumorzellen nach Ad-EGFR-CD533 Transduktion fand sich auch in den Tumorwachstumsverzögerungsanalysen im Sinne einer deutlichen Beeinträchtigung des Wachstums der Tumoren wieder. Direkte Vergleiche der beiden Testverfahren sind aufgrund der unterschiedlichen Endpunkte und der unterschiedlichen Einflußfaktoren aber nicht möglich.

Zahlreiche weitere Ansätze einer Hemmung der ErbB- Rezeptor Funktion zur Modulation der Tumorzellantwort werden derzeit untersucht. Hierbei ist die Erforschung eines monoklonalen Antikörpers C225, welcher die EGF-Liganden Domäne des EGFR blockiert und dadurch das Rezeptorsignal hemmt (Park et al., 2000; Huang et al., 2000; Milas et al., 2000), derzeit in der experimentellen und klinischen Entwicklung am weitesten fortgeschritten. Bei dem Vergleich der zugrundeliegenden Mechanismen der Blockade von EGFR durch C225 oder EGFR-CD533 besteht kein Zweifel daran, daß beide die Funktion des EGFR modulieren. Es gibt jedoch indirekte Hinweise darauf, daß die genaue Wirkungsweise dieser beiden Therapieformen ganz unterschiedlich ist. Für C225 wurde beispielsweise nachgewiesen, daß es zu einer erhöhten Expression des Zyklin abhängigen Kinase Hemmers $p27^{KIP-1}$ kommt. Dies wurde als ein Mechanismus gedeutet, durch den C225 das Tumorzellwachstum reduziert und die Radiosensitivität erhöht (Huang et al., 2000). Demgegenüber reduziert EGFR-CD533 das Tumorzellwachstum und erhöht die Strahlensensitivität über eine Hemmung der strahlen-induzierten MAPK Aktivität, gefolgt von erhöhter $p21^{Cip-1/WAF1}$ Expression (Park

et al., 1999). Des Weiteren beeinflussen C225 und EGFR-CD533 ganz unterschiedliche Funktionen des EGFR. Während C225 die EGFR- Kinase- Aktivität durch EGFR- Internalisierung und Degradierung hemmt (Prewett et al., 1996) und der pharmakologische Hemmstoff Tyrphostin AG1478 die EGFR- Kinase- Aktivität durch direkte Bindung an der katalytischen zytoplasmatischen Domäne blockiert, hemmt EGFR-CD533 die Aktivität aller ErbB- Rezeptoren durch Vermeidung von funktioneller Heterodimerisierung und Transphosphorylierung (Schmidt-Ullrich et al., 2000; Kashles et al., 1991; Bowers et al., 2001). Diese unterschiedlichen Ansatzpunkte in der Hemmung der EGFR- Funktion von EGFR-CD533 und C225 könnten bei Kombination dieser unterschiedlichen Therapieformen einen zusätzlichen therapeutischen Vorteil erbringen.

Zusammenfassend ergeben unsere Daten eindeutige Hinweise auf eine effektive Modulation der EGFR- Funktion durch einen gentherapeutischen Ansatz der adenoviral vermittelten *in vivo* Überexpression von EGFR-CD533. Hierbei kommt es zu einer Tumorzellsensibilisierung *in vivo*, welche auf einer Unterbrechung der zytoprotektiven Antwort auf strahlen-induzierte Proliferation und Erholungskapazität der Zelle beruht, die über eine strahlen-induzierte Aktivierung der EGFR/MAPK- Kaskade vermittelt wird. Die vergleichbaren Daten der *in vivo* / *in vitro* Experimente demonstrieren, daß die genetische Unterbrechung der EGFR- Funktion in der Zellkultur und in Xeno-Transplantat Tumoren auf denselben Mechanismen beruhen. Hierdurch wird das therapeutische Potenzial dieses Ansatzes bestätigt.

6. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER FUNKTIONELLEN BEDEUTUNG EINER NATÜRLICHEN VARIANTE DES EGFR, EGFRVIII, UND SEINE BEDEUTUNG FÜR DIE ZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION NACH IONISIERENDER BESTRAHLUNG ANHAND EINES TRANSIENT TRANSFIZIERTEN CHO- ZELLSYSTEMS

6.1 Natürliche Expression des EGFRVIII *in vivo*

Die mutierte Variation des EGFR, EGFRVIII, ist die am meisten verbreitete Variante des EGFR in menschlichen Tumoren (Huang et al., 1997). Strukturell weist die EGFRVIII Form eine Deletion der Exone 2 bis 7 (cDNA Nukleotide 275 bis 1075) auf, wodurch es zu einem Verlust extrazellulärer Anteile des Rezeptors kommt. EGFRVIII wird in einer großen Anzahl verschiedener menschlicher Tumoren und maligner Gliome exprimiert (Moscatello et al., 1995). Somit müsste EGFRVIII auch bei den hier untersuchten Tumorzell- Linien in Xeno-Transplantaten *in vivo* nachweisbar und identifizierbar sein. Hierzu wurden MDA-MB-231, A-431, U-87 MG und U-373 MG Xeno-Transplantat-Tumoren mit Hilfe von Western Blot Analysen auf die Expression von EGFRVIII untersucht. Die EGFRVIII- Expression wurde zum einen in Zell-Lysat von frisch präparierten Tumoren gemessen. Zusätzlich wurden MDA-MB-231 Tumorzellen *ex vivo* - *in vitro* über 5 Tage kultiviert und anschließend untersucht. Wie in Abbildung 20 A dargestellt, wurde EGFRVIII in erheblicher Menge in MDA-MB-231 Tumoren exprimiert, konnte jedoch nicht in MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen werden, die *in vitro* kultiviert worden waren. Dies gelang auch dann nicht, wenn die Zellen aus EGFRVIII exprimierenden Tumoren gewonnen worden waren. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit A-431, U-373 MG und U-87 MG Zellen erzielt (Abb. 20 B,C). Transiente mit pβhAc.EGFRVIII transfizierte CHO Zellen dienten als Positivkontrollen zur besseren

Identifikation des EGFRvIII- Proteins. Diese Daten bestätigen an einem Spektrum verschiedener menschlicher Zell- Linien, daß EGFRvIII nur *in vivo* in Xeno-Transplantat- Tumoren exprimiert wird, und daß diese Expression umgehend nach Aussaat der Zellen *in vitro* zurückreguliert wird.

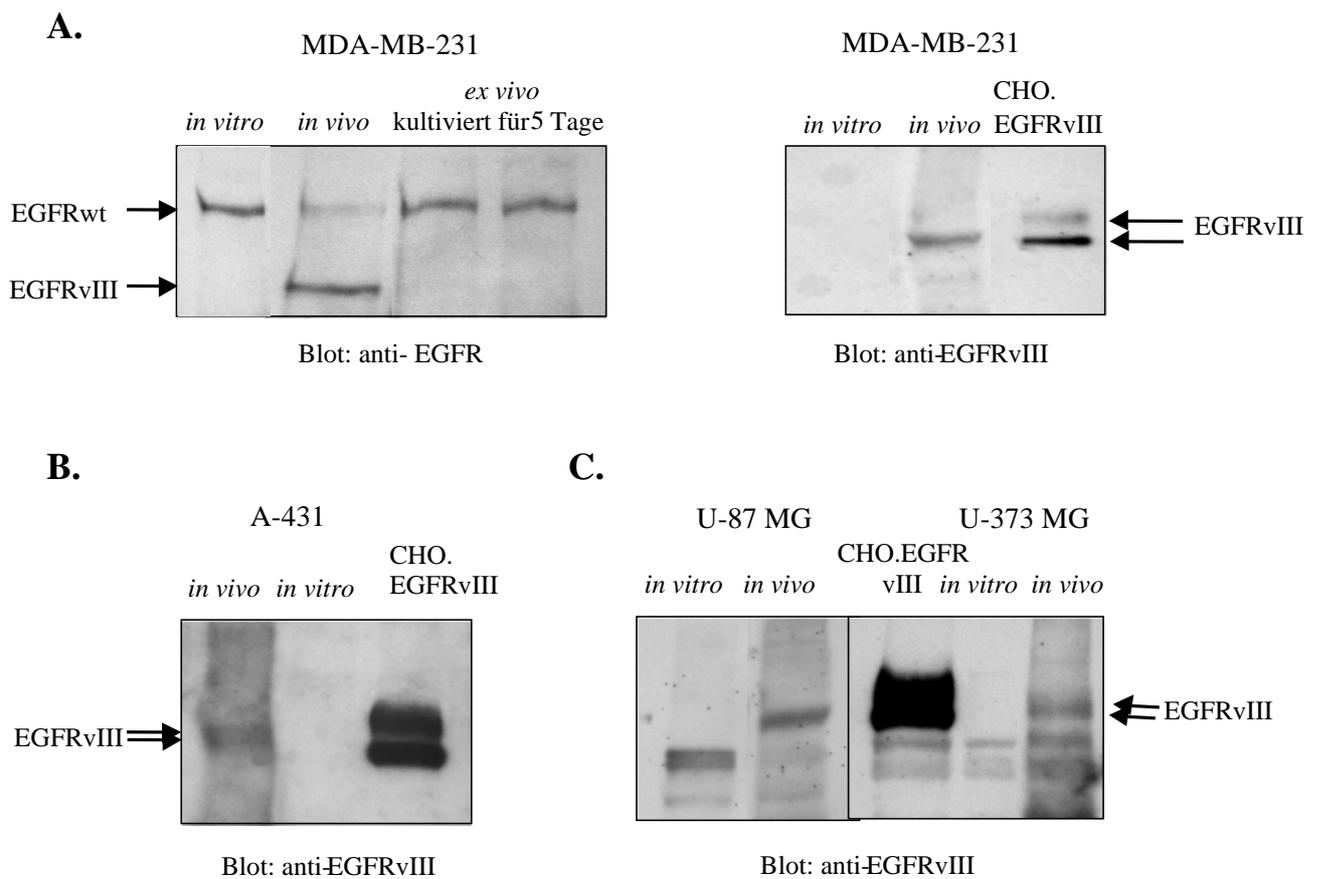


Abbildung 20: Expression einer mutierten Form des EGFR, EGFRvIII, in malignen Karzinom – und Gliom- Xeno-Transplantat- Tumoren, nicht aber in den korrespondierenden Zellen unter *in vitro* Bedingungen. Western Blot Analyse der EGFRvIII Expression in MDA-Mb-231, A-431, U-87 MG und U-373 MG Xeno-Transplantat- Tumoren und der jeweiligen Zellen *in vitro*. Transiente mit phβAc.EGFRvIII transfizierte CHO- Zellen dienten als Positiv-Kontrolle zur Identifikation von EGFRvIII. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

6.2 Ligandenunabhängigkeit von EGFRvIII und funktionelle Hemmung

Da wie beschrieben eine natürliche Expression von EGFRvIII unter *in vitro* Bedingungen in kultivierten Zellen nicht zu erzielen ist, bedienten wir uns bei unseren weiteren mechanistischen Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Expression

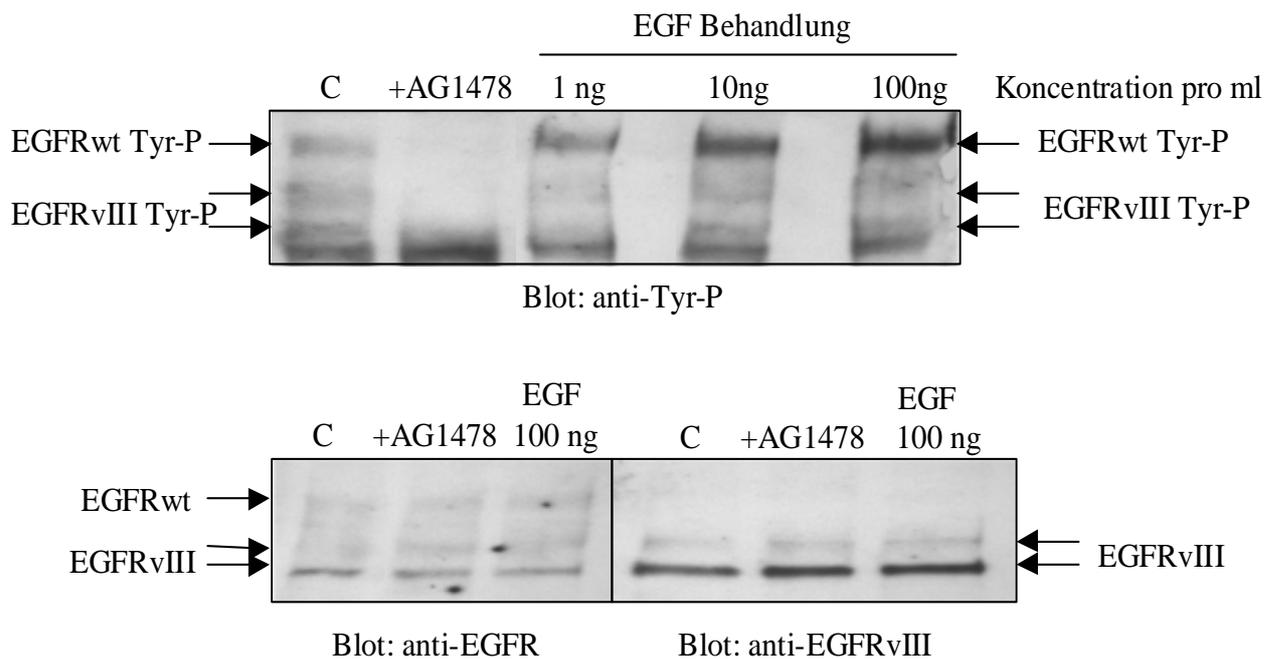


Abbildung 21: EGF- Behandlung der mit p β Ac.EGFRvIII und pCMV.EGFRwt co-transfizierten CHO Zellen und Hemmung der Tyr-P durch AG 1478. CHO- Zellen, welche EGFRvIII und EGFRwt co- exprimieren, wurden mit 1, 10 oder 100 ng/ml EGF für 5 Min inkubiert. Die Tyr-P Niveaus wurden mit Hilfe eines Western Blot quantifiziert. Die Behandlung der Zellen mit 5 μ M AG1478 über 30 Min führte zu einer vollständigen Hemmung der Tyr-P sowohl von EGFRvIII als auch EGFRwt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

von EGFRvIII eines transient transfizierten Zellsystems. Weil CHO- Zellen leicht zu transfizieren sind und keine natürliche ErbB- Expression aufweisen, wurden sie für die weiteren *in vitro* Studien zum EGFRvIII verwendet.

Die ersten Experimente wurden konzipiert, um die Unabhängigkeit des EGFRvIII von dem EGFR- Liganden EGF (Moscatello et al, 1996) und die effektive pharmakologische Hemmung durch AG1478 in unserem Zellsystem zu definieren. Dazu wurden die CHO-Zellen mit 0,3 μ g p β Ac.EGFRvIII und 0,03 μ g pCMV.EGFRwt co-transfiziert. Dies führte zu einer gleichwertigen Expression von EGFRvIII und EGFRwt. Anschließend wurden nach Behandlung der Zellen mit EGF und/oder AG1478 die Tyr-P Niveaus von EGFRvIII und EGFRwt quantifiziert. Die Behandlung der co-transfizierten CHO- Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 1, 10 oder 100 ng EGF über 5 Minuten führte zu einem erwarteten dosisabhängigen Anstieg der Tyr-P von EGFRwt. Dagegen wurden die Tyr-P Niveaus des EGFRvIII nur unwesentlich beeinflusst (Abb. 21). Die Behandlung der Zellen mit 5 μ M AG1478 über 30 Minuten ergab eine vollständige Hemmung der Tyr-P von EGFRwt und EGFRvIII (Abb. 21). Diese Ergebnisse demonstrieren die EGF-Unabhängigkeit der EGFRvIII Aktivität und die Sensitivität der Tyr-P Hemmung durch AG1478.

6.3 Ligandenunabhängige strahlen- induzierte Aktivierung von EGFRvIII

Die funktionellen Konsequenzen der Expression von EGFRvIII auf die zelluläre Strahlenreaktion wurden im folgenden mit p β Ac.EGFRvIII transfizierten CHO- Zellen (CHO.EGFRvIII) untersucht. Als Kontrolle unter identischen Bedingungen wurden CHO- Zellen verwendet, welche nur mit EGFRwt- cDNA transfiziert worden waren (CHO.EGFRwt). Bei einer cDNA Menge von 0,5 μ g p β Ac.EGFRvIII für die Transfektion von CHO.EGFRvIII- Zellen und 0,5 μ g pCMV.EGFRwt für die Transfektion von CHO.EGFRwt Zellen ließen sich, durch quantitative Analyse bestätigt, identische

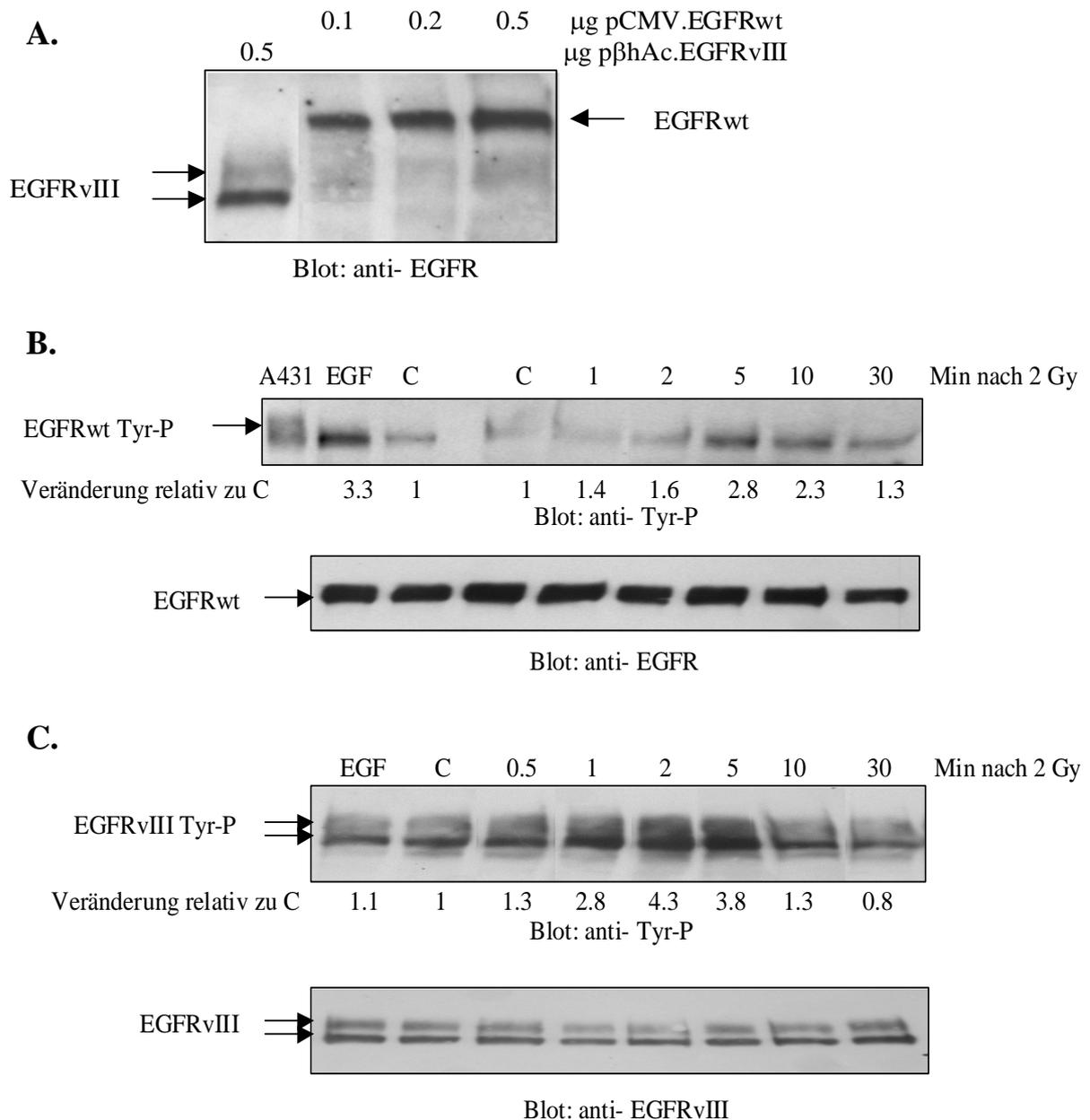


Abbildung 22: Strahlen- induzierte Aktivierung von EGFRwt und EGFRvIII in mit pCMV.EGFRwt (B) oder p β hAc.EGFRvIII (C) transfizierten CHO- Zellen. A: identische Expressionsniveaus von EGFRwt und EGFRvIII bei Verwendung von 0,5 μg des jeweiligen Plasmids. **B:** strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRwt nach Bestrahlung der CHO.EGFRwt Zellen mit 2 Gy Einzeldosis. **C:** strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII nach Bestrahlung der CHO.EGFRvIII-Zellen mit einer Einzeildosis von 2 Gy. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Expressionsprofile der jeweiligen Moleküle erzielen (Abb. 22 A). Das EGFRvIII- Protein zeigte die typische elektrophoretische Darstellung von zwei Banden der Größe 140-155

kD (Nishikawa et al, 1994), wohingegen EGFRwt- Proteine sich in Form einer zu erwartenden 170kD Bande darstellten. Es war somit eine gleichwertige Anzahl an EGFRwt- beziehungsweise EGFRvIII- Rezeptoren in den beiden CHO- Zellgruppen zu erwarten.

Wie bereits mehrfach für verschiedene Zell- Linien gezeigt wurde (Abb. 11), führt die Bestrahlung ebenso wie die Behandlung mit EGF zu einer Erhöhung der Tyr-P des EGFRwt (Abb. 22 B). Die Behandlung der CHO.EGFRwt- Zellen mit 10 ng/ml EGF über 5 Minuten führte zu einer 3,3- fachen Erhöhung der Tyr-P von EGFRwt, welche mit der Aktivierung des EGFRwt nach Bestrahlung mit 2 Gy vergleichbar ist (2,8- fach; $p=0,0015$). Trotz der fehlenden Aktivierung des EGFRvIII durch EGF führte eine einzelne Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy zu einem sofortigen maximal 4,3 fachen Anstieg der Tyr-P des EGFRvIII ($p=0,001$). Diese kurzfristige strahlen- induzierte Reaktion bildete sich innerhalb von 30 Minuten wieder zur Ausgangs- Phosphorylierung zurück (Abb. 22 C). Zusammenfassend ergab sich eine vergleichbare unmittelbare Aktivierung von EGFRwt oder EGFRvIII in den CHO.EGFRwt beziehungsweise CHO.EGFRvIII- Zellen nach einmaliger Bestrahlung mit 2 Gy. Die maximale Aktivierung durch die Bestrahlung war jedoch für EGFRvIII signifikant höher (4,3- fach gegenüber 2,8- fach; $p=0,003$). Die Western Blot- Analyse der EGFRvIII Banden mit einem anti-EGFRvIII mAb ergab bei gleicher Protein-Ladung aller Proben, daß beide molekularen Gewichtspezies des EGFRvIII, p140 und p155 auf die Bestrahlung mit einer Erhöhung der Tyr-P reagierten (Abb. 22). Eine Behandlung der Zellen mit dem EGFR- spezifischen Liganden EGF vermag keine Aktivierung des EGFRvIII zu induzieren.

6.4 EGFRvIII abhängige strahlen- induzierte Aktivierung von MAPK und Akt

Nachdem EGFRvIII als ein Ziel der strahlen- induzierten Aktivierung identifiziert worden war, untersuchten wir, inwieweit EGFRvIII in CHO.EGFRvIII Zellen ein strahlen- induziertes Signal in die MAPK- Kaskade zu transduzieren vermag. Diese Untersuchungen wurden mit der bekannten strahlen- induzierten EGFRwt abhängigen Aktivierung der MAPK in CHO.EGFRwt- Zellen verglichen. Neben den in Kapitel 6.3 beschriebenen identischen Bedingungen für CHO.EGFRvIII und CHO.EGFRwt fügten wir noch eine weitere CHO-Gruppe hinzu, welche als CHO.mock Gruppe mit einem leeren Vektor transfiziert worden war, um so eine von EGFRwt beziehungsweise

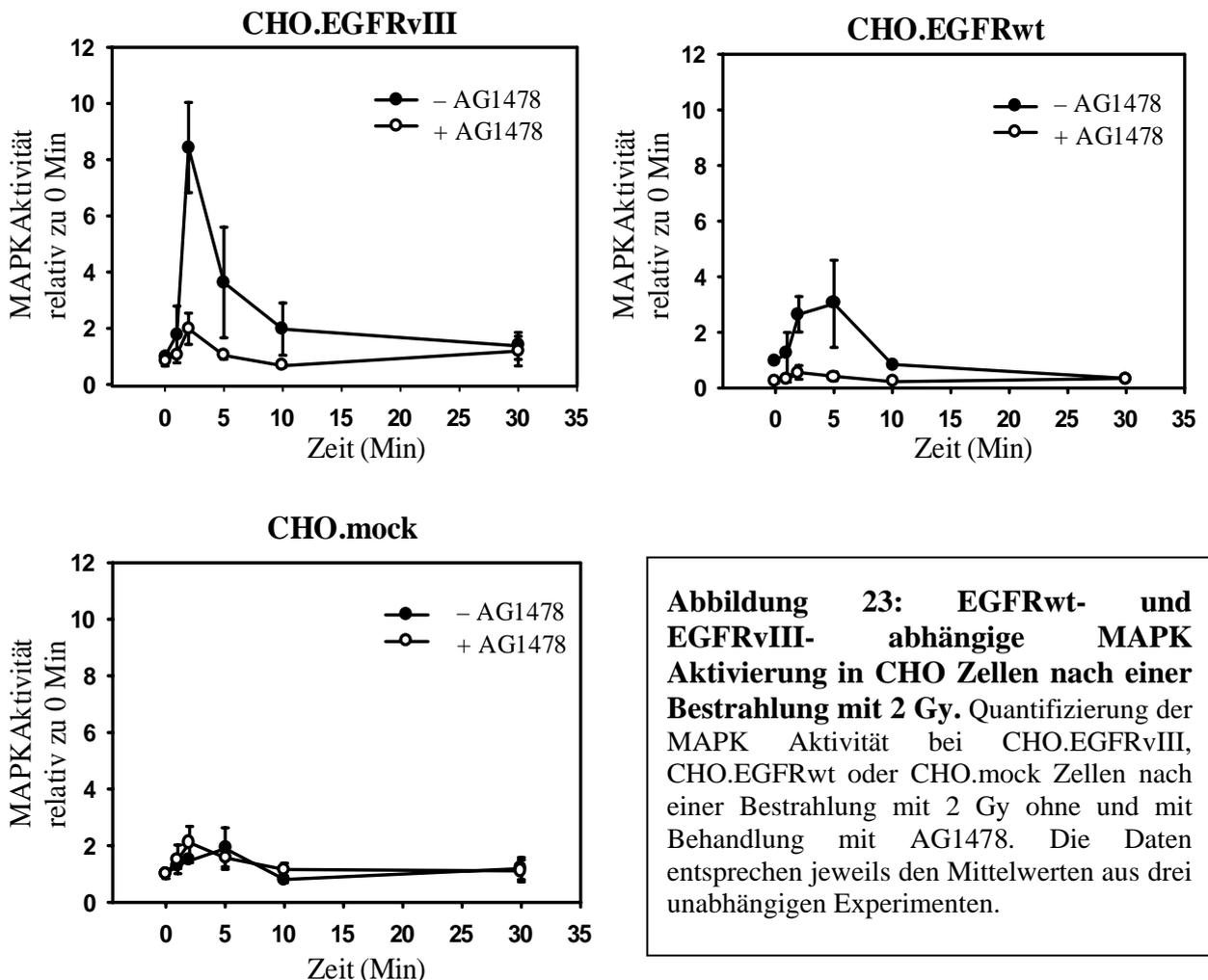


Abbildung 23: EGFRwt- und EGFRvIII- abhängige MAPK Aktivierung in CHO Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy. Quantifizierung der MAPK Aktivität bei CHO.EGFRvIII, CHO.EGFRwt oder CHO.mock Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy ohne und mit Behandlung mit AG1478. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

EGFRvIII unabhängige strahlen- induzierte Aktivierung der MAPK messen zu können. In CHO.EGFRvIII ließ sich bereits 2 Minuten nach der Bestrahlung mit 2 Gy eine transiente maximal 8,5 fache Aktivierung der MAPK ermitteln ($p=0,009$), welche

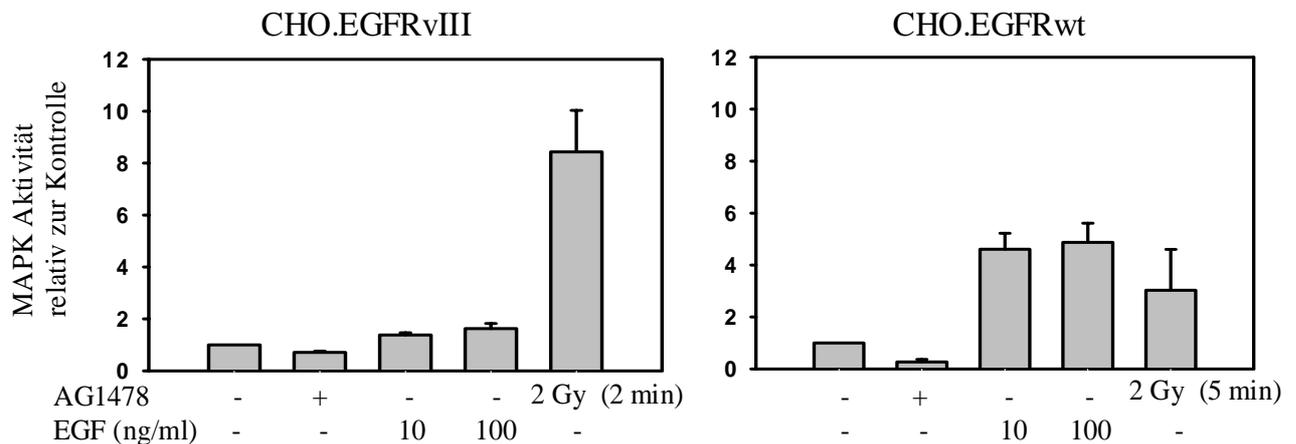


Abbildung 24: Vergleich der durch Bestrahlung oder EGF- Behandlung induzierten MAPK- Aktivierung für CHO.EGFRvIII- und CHO.EGFRwt- Zellen. Dargestellt sind MAPK Aktivitäten der CHO.EGFRvIII- oder CHO.EGFRwt- Zellen nach EGF Behandlung (10 oder 100 ng/ml) über 5 Min mit und ohne AG1478 Behandlung, verglichen mit der MAPK Aktivität nach einer Bestrahlung mit 2 Gy. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

innerhalb von 30 Minuten entsprechend der Tyr-P Antwort des EGFRvIII Rezeptors wieder zu den Ausgangswerten zurückkehrte (Abb. 23). Eine zuvor durchgeführte Behandlung der Zellen mit AG1478 reduzierte dieses Aktivierungsprofil auf eine bis 2-fache Erhöhung der strahlen-induzierten Aktivierung der MAPK. Dies unterstreicht die Bedeutung der EGFRvIII Funktion für die beschriebene strahlen-induzierte Aktivierung der MAPK in den CHO.EGFRvIII. Im Vergleich hierzu vermittelte EGFRwt in den CHO.EGFRwt Zellen nach 2 Gy eine bis 3,5- fache Aktivierung der MAPK innerhalb von 5 Minuten ($p=0,045$; Abb. 23), welche ebenfalls durch eine Therapie mit AG1478 blockiert werden konnte. Die moderate, bis 2- fache strahlen- induzierte Aktivierung der MAPK in CHO.mock- Zellen wurde als Hintergrund- Aktivierung interpretiert, zumal sie

nicht durch die Behandlung mit AG1478 beeinflusst werden konnte. Das MAPK-Aktivierungsprofil in CHO.mock- Zellen entspricht der verbleibenden MAPK- Antwort in den mit AG1478 behandelten CHO.EGFRvIII- und CHO.EGFRwt- Zellen und ist somit wahrscheinlich unabhängig von einer EGFRwt- oder EGFRvIII- Expression vorhanden. Die unterschiedlichen Antworten der CHO.EGFRvIII- und CHO.EGFRwt- Zellen auf eine EGF- Behandlung wurden in den MAPK- Analysen eindrucksvoll bestätigt. Während die EGF- Behandlung in den CHO.EGFRvIII- Zellen nur eine moderate, aber signifikante bis 1,4- fache Aktivierung der MAPK induzierte ($p=0,004$; Abb. 24) , führte EGF zu einer 5- fachen Aktivierung der MAPK in CHO.EGFRwt- Zellen.

Der PI3 Kinase- Signaltransduktionsweg wurde als ein weiteres bedeutendes nachgeschaltetes Ziel der EGFRvIII- Signalvermittlung beschrieben (Moscatello et al., 1998). Es wurde daher die Möglichkeit einer EGFRvIII abhängigen strahlen-induzierten Aktivierung der PI3- Kinase- Kaskade durch Analyse der strahlen-induzierten Antwort der CHO.EGFRvIII- Zellen auf die PKB/Akt Proto- Onkogene studiert. Eine Bestrahlung

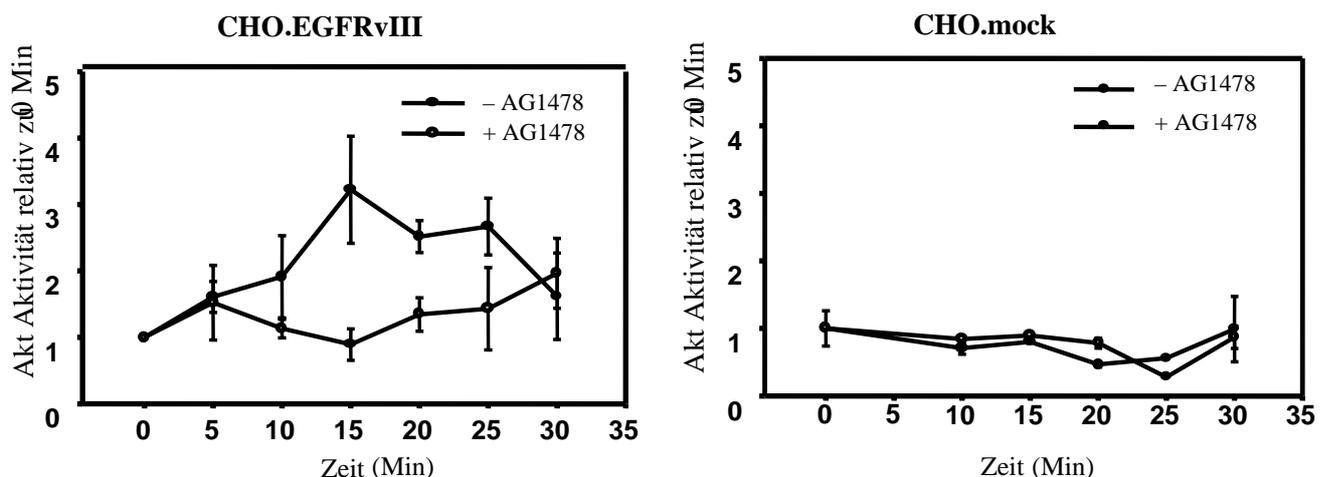


Abbildung 25: Strahlen- induzierte Aktivierung von Akt in CHO.EGFRvIII Zellen. Akt Aktivitäten in CHO.EGFRvIII oder CHO.mock Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy ohne und mit pharmakologischer Hemmung von EGFRvIII durch AG1478. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten

mit 2 Gy führte in den CHO.EGFRvIII- Zellen innerhalb von 15 Minuten zu einer 3,2 fachen signifikanten Aktivierung der Akt (Abb. 25; $p=0,009$). Die komplette Hemmung dieser Aktivierung durch eine Behandlung der Zellen mit AG1478 deutet darauf hin, daß sie auf dem EGFRvIII Rezeptor- Niveau eingeleitet wurde. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, daß in CHO.mock Zellen keine strahlen-induzierte Aktivierung von Akt auslösbar war.

Die Ergebnisse belegen, daß die Expression von EGFRvIII eine wesentliche strahlen-induzierte Aktivierung des Rezeptors auf die zelluläre Strahlenantwort bewirkt, welche ihrerseits eine verstärkte Signaltransduktion der MAPK- und PI3K- Kaskaden induziert.

6.5 Erhöhte Zytoprotektion nach strahlen- induzierter Aktivierung von EGFRvIII

Um die beschriebene strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII auf ihre funktionelle Bedeutung für die Strahlensensitivität der Zellen untersuchen zu können, wurde das zelluläre Überleben der CHO- Zellen nach Strahlendosen von 2 und 4 Gy mit Hilfe des Koloniebildungstests untersucht. Die Bedeutung der EGFRvIII- Signalvermittlung auf das zelluläre Überleben nach einer Bestrahlung wurde durch quantitative Hemmung der EGFRvIII- Funktion mittels AG1478 untersucht. Die Koloniebildungstests ergaben für CHO.EGFRvIII- Zellen nach Dosen von 2 und 4 Gy eine geringere Strahlensensibilität als für CHO.mock Zellen (Abb. 26). Die Expression von EGFRvIII erhöhte die klonogene Überlebensrate signifikant auf das annähernd 2- fache ($p<0.001$; Abb. 26) Die Therapie von CHO.EGFRvIII mit AG1478 eliminierte diese erhöhte

Strahlenresistenz der CHO.EGFRvIII nahezu vollständig und verdeutlicht somit die Bedeutung der EGFRvIII vermittelten zytoprotektiven Antwort der Zellen nach der

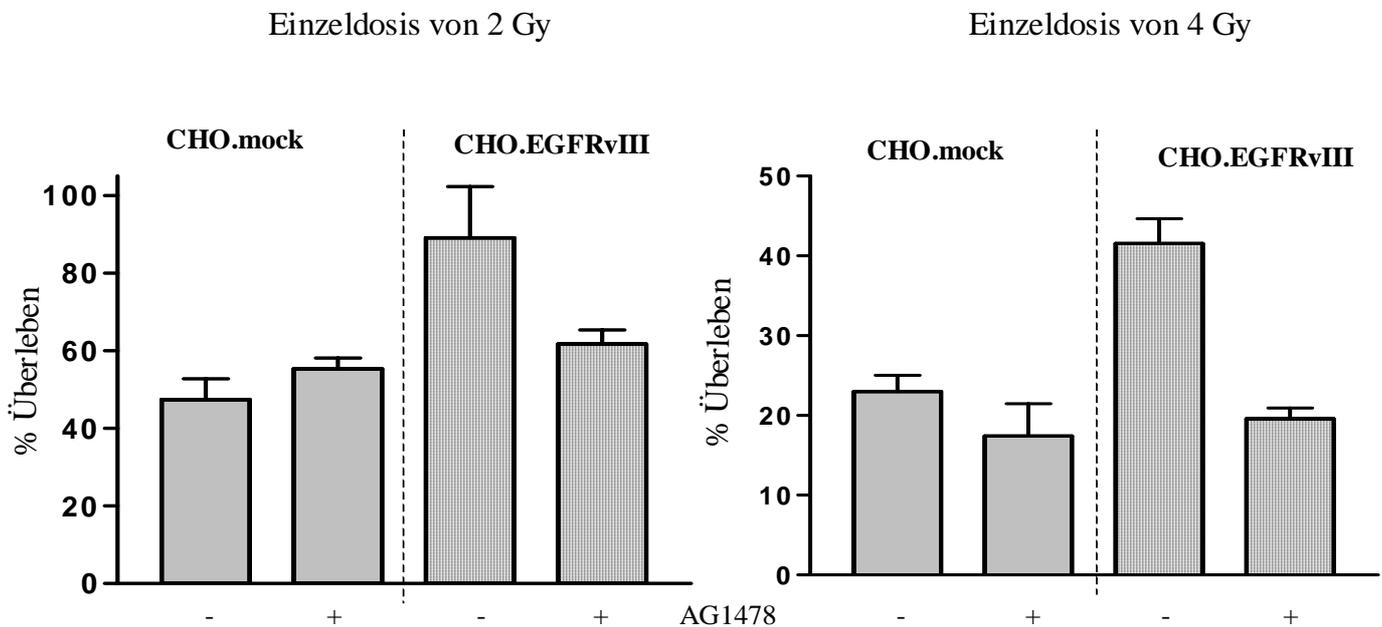


Abbildung 26: EGFRvIII vermittelte Modulation der Strahlenempfindlichkeit in CHO.EGFRvIII- Zellen. Klonogene Überlebensraten für CHO.mock oder CHO.EGFRvIII Zellen nach Einzeitbestrahlung mit 2 oder 4 Gy mit und ohne pharmakologische Hemmung von EGFRvIII durch AG1478. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus vier Experimenten

Bestrahlung. EGFRvIII vermittelte eine stärkere zytoprotektive Antwort, als dies bislang für EGFR-wt gezeigt werden konnte (Lammering et al., 2001).

6.6 Strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII *in vivo*

Nachdem in dem transienten Transfektions- Zellsystem der CHO- Zellen die Bedeutung der Expression von EGFRvIII für die zytoprotektive Antwort der Zellen nach einer Bestrahlung nachgewiesen worden war, wurde an Xeno-Transplantat- Tumoren untersucht, ob die natürlich vorkommenden EGFRvIII Moleküle *in vivo* ebenfalls durch

ionisierende Bestrahlung aktiviert werden. Diese Aktivierung der Rezeptoren ist nach den beschriebenen Ergebnissen die Voraussetzung für die EGFRvIII vermittelte zytoprotektive Antwort der Zelle auf eine Bestrahlung. Wie bereits dargestellt wurde, induziert die Bestrahlung von Tumoren mit einer Dosis von 4 Gy eine unmittelbare Aktivierung von EGFRwt mit einem Maximum nach 10 Minuten. Deshalb wurde für die *in vivo* Analysen zur strahlen- induzierten Aktivierung von EGFRvIII ebenfalls der Zeitpunkt von 10 Minuten nach der Bestrahlung gewählt. MDA-MB-231 Xeno-

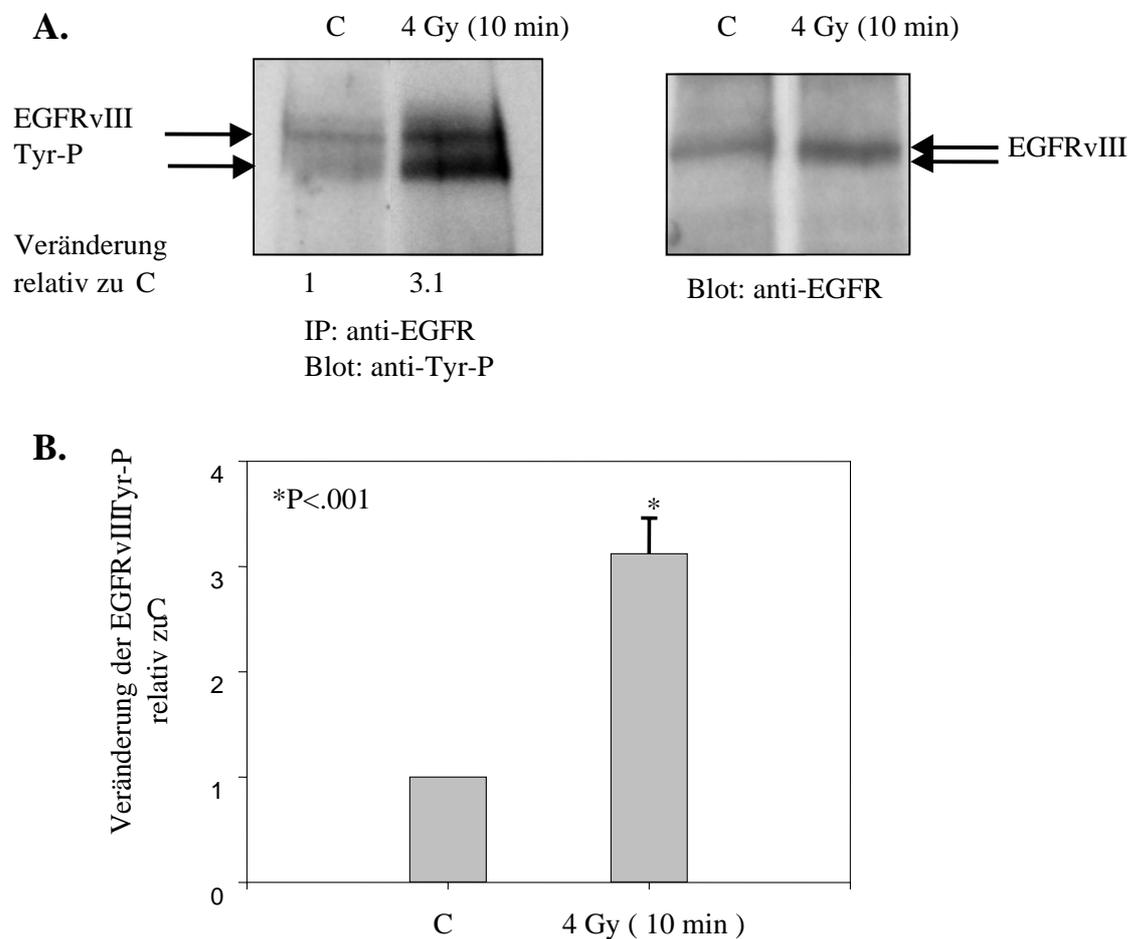


Abbildung 27: Strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII in Xeno-Transplantat-Tumoren von MDA-MB-231 Zellen **A:** repräsentative Analyse der EGFRvIII Tyr-P Niveaus *in vivo* vor und 10 Min nach einer Tumorbestrahlung mit einer Einzeitdosis von 4 Gy. **B:** statistische Auswertung der strahlen- induzierten Veränderung der EGFR Tyr-P relativ zur Kontrolle vor der Bestrahlung für drei unabhängige Experimente.

Transplantat- Tumoren mit einem Durchmesser von 8 bis 10 mm wurden mit 4 Gy bestrahlt und 10 Minuten später für die immunchemische Analyse entnommen und weiterbearbeitet (Kap 3.3.3). Wie in Abbildung 27 dargestellt ist, ergab die densitometrische Quantifizierung der Tyr-P des immunpräzipitierten EGFRvIII einen signifikanten 3,1 fachen Anstieg nach 4 Gy ($p < 0,001$), während die Proteinexpression sowohl für EGFRvIII als auch für EGFRwt unverändert blieb. Somit führt die Bestrahlung von Tumoren neben der beschriebenen Aktivierung des EGFRwt (Lammering et al, 2001) auch zu einer etwa 3-fachen Aktivierung des EGFRvIII. Daher erweisen sich sowohl EGFRwt als auch EGFRvIII als wichtige Modulatoren der zellulären Strahlenantwort in Xeno- Transplantat-Tumoren *in vivo*.

6.7 Diskussion

Die Expression mutierter Formen des EGF- Rezeptors wurde mit der malignen Progression verschiedener humaner Tumoren in Zusammenhang gebracht (Wong et al., 1992; Ekstrand et al., 1994). Frühere Berichte deuteten daraufhin, daß EGFRvIII in einer Vielzahl humaner Tumoren nachweisbar ist (Moscatello et al., 1995). Wir untersuchten daher drei Tumor- Phänotypen auf ihre Expression von EGFRvIII. Alle zeigten eine Expression dieser weit verbreiteten EGFRvIII Form (Abb. 20). Dies bestätigt die hohe Prävalenz dieser EGFR Varianz in verschiedenen humanen Tumoren (Moscatello et al., 1995). EGFRvIII stellt damit ein wichtiges Molekül für mechanistische Untersuchungen zur Rolle dieses Onkoproteins (Moscatello et al., 1996; CHU et al., 1997; Ekstrand et al., 1994) und somit ein attraktives Ziel für biologisch basierte Therapien dar (Wong et al., 1992).

Die vorgelegten Ergebnisse ermöglichen einen neuen Einblick in die biologischen Funktionen des EGFRvIII Moleküls. Studien zur funktionellen Bedeutung dieser natürlich vorkommenden Variante des EGFR waren bislang selten, da die *in vivo* Expression des EGFRvIII in spontanen oder humanen Xeno- Transplantat- Tumoren bei einer Aussaat der Zellen *in vitro* verloren geht (Lammering et al., 2001; Bigner et al., 1990). In Übereinstimmung mit diesem in der Literatur beschriebenen Phänomen ließ sich auch in unseren Untersuchungen eine rasche Herunterregulation der EGFRvIII Expression in *ex vivo* / *in vitro* Tumorzellkulturen sogar innerhalb von 24 Stunden feststellen (Abb. 20). Vorhergehende Studien haben beschrieben, daß die Amplifikation und das „Rearrangement“ des EGFR Gens, welches für die mutierten EGF-Rezeptoren in Gliom- Xeno- Transplantaten verantwortlich gemacht wird, verloren gingen, wenn die Tumorzellen *in vitro* kultiviert wurden (Bigner et al., 1990). Zusammenfassend läßt sich über die Ursache für diesen *in vitro* Verlust der EGFRvIII Expression nur spekulieren. Wahrscheinlich beeinflussen selektive Bedingungen *in vitro* die Expression von EGFRvIII. Dies könnte auf posttranslationaler Ebene reguliert sein.

Unsere Studien zur Funktion des EGFRvIII wurden daher mit Hilfe eines transient transfizierten CHO- Zellsystems durchgeführt (Ekstrand et al., 1994). Hiermit wurde eine hohe Transfektionseffizienz erreicht. Auch war die Möglichkeit der kontrollierten Expression von EGFRwt und EGFRvIII gegeben. Wir untersuchten daraufhin die Rolle von EGFRvIII relativ zu EGFRwt in CHO- Zellen, um unser Verständnis der Tumorzellantwort auf ionisierende Bestrahlung zu erweitern. In Ergänzung zu bisherigen Studien, welche eher die Rolle von EGFRvIII als Onkoprotein zum Ziel hatten (Batra et al., 1995; Ekstrand et al. 1994; Huang et al., 1997; Nagane et al., 1996;

Nishikawa et al., 1994), ermöglichten unsere Untersuchungen, die Beteiligung von EGFRvIII bei zellulären Antworten auf genotoxischen Streß, wie beispielsweise Bestrahlung, zu definieren. Die Ergebnisse identifizierten EGFRvIII als ein wichtiges zelluläres Antwortmolekül, welches nicht durch EGF (Batra et al., 1995), jedoch durch Bestrahlung in stärkerer Form aktiviert wird, als es für EGFRwt feststellbar war (Abb. 22,23). Da diese intensivierete EGFRvIII Antwort auch als amplifiziertes Signal auf nachgeschalteter Ebene der zytoplasmatischen MAPK und PI3 Kinase (Akt) nachweisbar ist (Abb. 23,24; Montgomery et al., 1995), ist anzunehmen, daß EGFRvIII nach Bestrahlung ein stärkeres zytoprotektives Signal aussendet, als es dies bislang für EGFRwt beschrieben worden ist (Kapitel 4,5; Contessa et al., 1999; Lammering et al., 2001). Weil diese zytoprotektiven Antworten der EGFR/MAPK Kaskade mit einer erhöhten Radioprotektion korrelierten (Kapitel 4.5) und in Anwesenheit von EGFRvIII auch für die CHO.EGFRvIII- Zellen nachweisbar sind (Abb. 26), ergibt sich durch Ausschaltung der EGFRvIII Funktion eine weitere Erhöhung der intrinsischen Strahlensensibilität der Tumorzelle. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, daß auch in unseren Xeno-Transplantat- Tumoranalysen EGFRvIII als ein wichtiger Modulator der zellulären Strahlenantwort identifiziert wurde, da die EGFRvIII Tyr-P durch Bestrahlung im Mittel auf das Dreifache erhöht wurde (Abb. 27).

Die Bestrahlung der CHO- Zellen ergab eine Aktivierung sowohl für EGFRwt als auch für EGFRvIII. Hierbei fiel die Aktivierung von EGFRvIII mit 4,3 signifikant höher aus als für EGFRwt. Die fundamentalen Unterschiede in der Rezeptorantwort wurden bei der Behandlung der Zellen mit EGF deutlich. Während EGF für EGFRwt eine 3,3 fache Aktivierung induzierte, ließ sich für EGFRvIII, wahrscheinlich bedingt durch Deletionen in der EGF bindenden extrazellulären COOH- terminalen Domäne, keine Erhöhung der

Tyr-P feststellen (Wong et al., 1992). Nach den Erkenntnissen früherer Untersuchungen wurde die relative Bedeutung der strahlen-induzierten Antwort sowohl von EGFRwt als auch EGFRvIII nach Behandlung der Zellen mit AG1478 studiert, da hierdurch die Aktivität einer Vielzahl verschiedener EGFR- Spezies komplett ausgeschaltet und somit auch eine Signalweiterleitung blockiert werden kann (Han et al., 1996, Schmidt-Ullrich et al., 1997; Abb. 13, 21).

Vorhergehende Untersuchungen hatten belegt, daß die strahlen-induzierte Aktivierung von EGFR über den MAPK- Signalweg weitergeleitet wird (Contessa et al, 1999; Lammering et al., 2001). CHO.EGFRvIII Zellen produzierten eine wenigstens 2-fach höhere strahlen- induzierte Aktivierung von MAPK als CHO.EGFRwt Zellen (Abb. 23,24). Die starke Abhängigkeit der MAPK- Aktivierung von der EGFR/EGFRvIII Tyr-P in transfizierten CHO- Zellen wurde durch eine nahezu komplette Hemmung der MAPK nach AG1478 Behandlung unterstrichen. Dies war bereits vorher für EGFRvIII transifizierte NIH3T3 und U87MG Zellen beschrieben worden (Moscatello et al., 1995; Montgomery et al., 1995; Han et al., 1996). Da pro-proliferative Antworten auf ionisierende Bestrahlung dominant den MAPK- Signalweg betreffen, ist anzunehmen, daß durch EGFRvIII eine stärkere pro-proliferative Antwort signalisiert wird als durch EGFRwt. Daneben induziert der PI3 Kinase- Signalweg eine anti-apoptotische Wirkung. Für diesen Signalweg wurde bei den EGFRvIII exprimierenden Zellen auch eine strahlen-induzierte Aktivierung festgestellt (Abb. 25). Detaillierte Studien zur Rolle der PI3- Kinase und ihrer Abhängigkeit von strahlen- induzierter EGFR- Aktivierung bekräftigen ihre Bedeutung bei der zellulären Strahlenantwort (Contessa et al., 2002).

Obwohl die Aktivierung von MAPK und PI3K bereits eine verminderte Strahlenempfindlichkeit der Zelle erwarten ließ, sollte die Beteiligung des EGFRvIII an der zellulären Strahlenresistenz mit Hilfe des Koloniebildungstests quantifiziert werden. Die Expression von EGFRvIII erhöhte dosisabhängig die Überlebensfraktion der CHO-Zellen. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy erhöhte sich die Überlebensrate von 50 bis 85% auf das 1,7-fache. Dieser Effekt wurde durch eine pharmakologische Hemmung des Rezeptors mit AG1478 aufgehoben. Der Überlebensvorteil der EGFRvIII exprimierenden CHO-Zellen erreichte sogar eine Zunahme der relativen Strahlenresistenz um das 2,5-fache nach Bestrahlung mit 4 Gy. Diese Ergebnisse liefern den unmittelbaren Beweis dafür, dass eine strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII-Rezeptoren über eine sekundäre Stimulierung der MAPK/PI3K-Kaskaden ein starkes zytoprotektives Signal mit erhöhter Strahlenresistenz durch erhöhte Proliferation und Reparatur vermittelt (Contessa et al., 1999; Lammering et al., 2001; Reardon et al., 1999). Anhand von Studien zum p185neu (ErbB2) liegt die Vermutung nahe, daß die Bedeutung der ErbB-Rezeptoren auf die zelluläre Strahlensensitivität nicht nur auf EGFR und seine mutierten Varianten begrenzt sind (O'Rourke et al., 1997; O'Rourke et al., 1998).

Zusammenfassend belegen die dargestellten Ergebnisse die Bedeutung der von vielen humanen Tumoren *in vivo* exprimierten mutierten Form EGFRvIII für die Strahlenantwort der Tumorzelle. Aufgrund der konstanten Aktivierung induziert EGFRvIII nach einer Bestrahlung wahrscheinlich ein größeres Aktivierungssignal als für EGFRwt beschrieben. Daher ist für EGFRvIII anzunehmen, daß es eine noch stärkere zytoprotektive Antwort auf eine Bestrahlung vermittelt als EGFRwt mit amplifizierten Aktivierungen der nachgeschalteten Effektoren MAPK und PI3K. Die Ausschaltung der

EGFRvIII- Funktion stellt somit ein weiteres wichtiges Ziel zur Modulation der Erhöhung der zellularen Strahlensensibilität dar und bedarf deshalb einer genaueren therapeutischen Evaluation.

7. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONELLEN HEMMUNG DES EGFRvIII DURCH ADENOVIRALE EXPRESSION DES DOMINANT-NEGATIVEN EGFR-CD533

7.1 Modulation der EGFRvIII- Aktivität durch Expression des dominant negativen EGFR-CD533

Nachdem die Bedeutung von EGFRvIII für die Vermittlung einer relativen Zytoprotektion der Tumorzelle nachweisen wurde, war zu untersuchen, ob diese Funktion des EGFRvIII durch eine Expression des dominant negativen EGFR-CD533 moduliert werden kann. Für diese Studien der Interaktion von EGFRvIII und EGFR-CD533 wählten wir adenovirale Vektoren, welche die Expression eines oder beider Rezeptoren in der malignen Gliomzell- Linie U-373 MG *in vitro* erlaubten. Diese Zell-Linie wurde gewählt, weil sie *in vivo* eine signifikante Menge an endogenem EGFRvIII exprimiert (Abb. 20). Des weiteren stellt sie ein physiologisches Modell dar, um die Funktion des EGFRvIII zu untersuchen, da U-373 MG Zellen ebenfalls endogenes EGFRwt und andere ErbB- Moleküle exprimieren (Abb. 7).

In der Western Blot Analyse von U-373 MG Zellen, welche mit zunehmenden MOI's des Ad-EGFRvIII mit oder ohne Co- Transduktion des Ad-EGFR-CD533 (konstant 3 MOI) transduziert wurden, zeigte sich, daß die Co- Expression von EGFR-CD533 die Proteinhöhe des EGFRvIII nicht beeinflußt (Abb. 28 A). Die Co- Expression hemmte nicht nur die Tyr-P des EGFRwt (Abb. 16C), sondern reduzierte auch das Tyr-P Niveau des EGFRvIII um 88% (Abb. 28 B). Die Behandlung der Zellen mit EGF hatte bei Co- Expression des EGFR-CD533 keine Erhöhung der Tyr-P für EGFRwt oder EGFRvIII

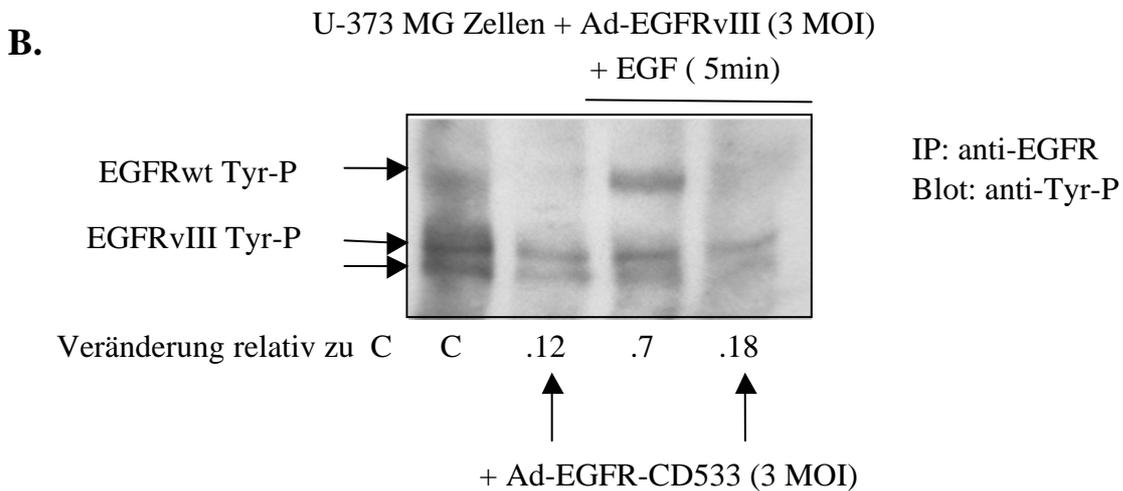
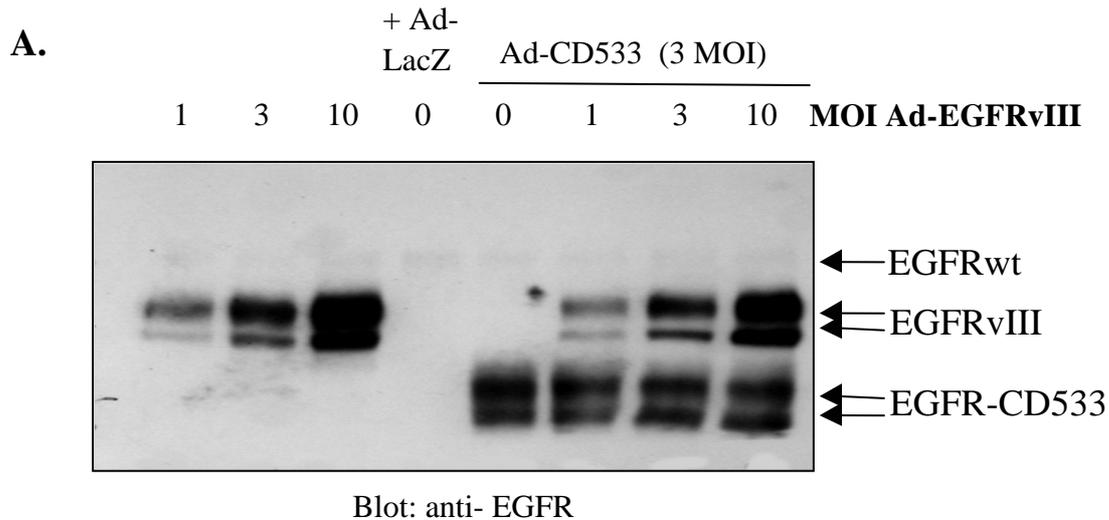


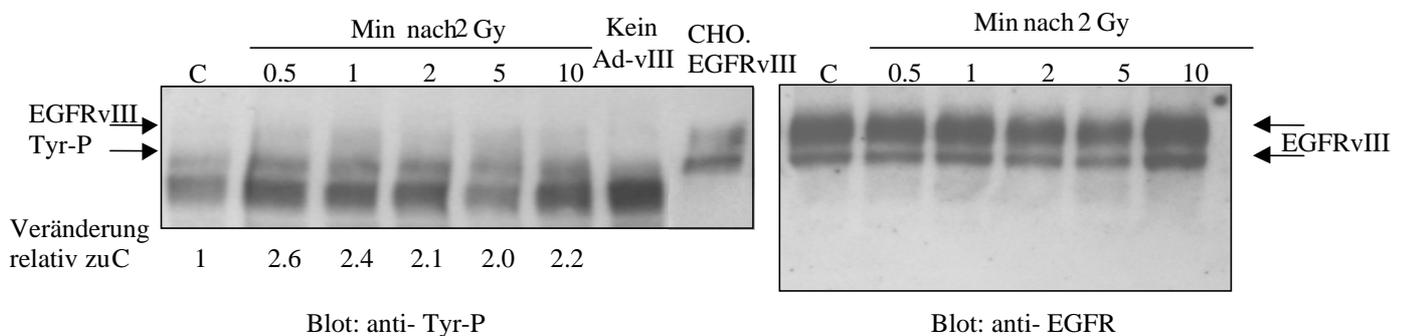
Abbildung 28: Protein Expression, Tyr-P Niveaus nach Ad- vermittelter Expression von EGFRvIII und EGFR-CD533 in U-373 MG Zellen. **A:** Ad vermittelte Expression von EGFRvIII mit und ohne Co- Expression von EGFR-CD533. Die Ad- EGFRvIII vermittelte Expression des EGFRvIII Proteins bei MOI's von 1,3 und 10 ist mit und ohne Co- Expression von EGFR-CD533 bei einem MOI von 3 des Ad-EGFR-CD533 dargestellt. **B:** Modulation der EGFRvIII Tyr-P durch kombinierte Expression von EGFR-CD533 mit und ohne EGF- Behandlung. Die EGF- Behandlung mit 10 ng/ml wurde 48 Stunden nach der Transfektion der Zellen über 5 Minuten durchgeführt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem anti- EGFR mAb. Protein- und Tyr-P Niveaus wurden mit dem Western Blot gemessen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

zur Folge (Abb. 28 B). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität des EGFRvIII durch andere ErbB- Rezeptoren wie EGFR-CD533 moduliert werden kann.

7.2 Blockierung der strahlen- induzierten Aktivierung von EGFRvIII durch Expression von EGFR-CD533

Um die Frage zu beantworten, ob die Modulation der Aktivität des EGFRvIII durch EGFR-CD533 auch für die strahlen- induzierte Aktivierung des EGFRvIII zutrifft, untersuchten wir das Aktivierungsprofil des adenoviral exprimierten EGFRvIII nach Bestrahlung der U-373 MG Zellen mit 2 Gy. Wie in Abbildung 29 A gezeigt ist, wurde

A. U-373 MG Zellen+ Ad-EGFRvIII (3 MOI)



B. U-373 MG Zellen+ Ad-EGFRvIII (3 MOI) + Ad-EGFR-CD533 (3 MOI)

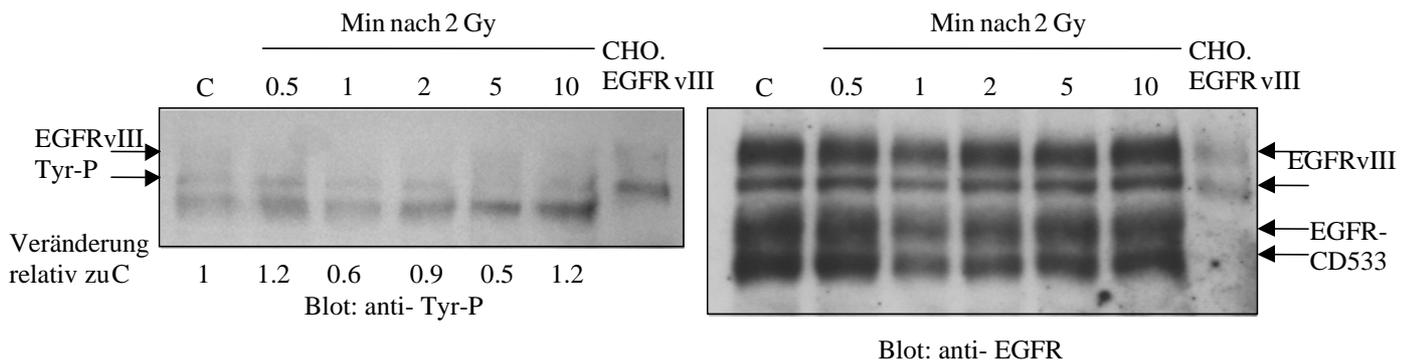


Abbildung 29: Funktionelle Konsequenz der EGFR-CD533 Expression auf die strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII in U-373 MG Zellen. **A:** strahlen-induzierte Aktivierung von EGFRvIII in Ad- EGFRvIII transduzierten U-373 MG Zellen nach 2 Gy. **B:** Modulation der strahlen-induzierten Aktivierung des EGFRvIII nach Co- Expression von EGFR-CD533. U-373 MG Zellen wurden mit Ad- EGFRvIII (3 MOI) allein oder gemeinsam mit Ad-EGFR-CD533 transduziert. Die Tyr-P Niveaus wurden nach Bestrahlung im Western Blot gemessen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

für die adenoviral vermittelte Expression des exogenen EGFRvIII ebenfalls eine strahlen- induzierte Aktivierung festgestellt. Die Erhöhung der Tyr-P für EGFRvIII erreichte nach Bestrahlung mit 2 Gy die 2,6- fache Aktivierung innerhalb einer halben Minute und blieb für mindestens 10 Minuten erhöht. Die gleichzeitige Co-Expression von EGFR-CD533 eliminierte demgegenüber die strahlen-induzierte Aktivierung des EGFRvIII nahezu vollständig (Abb. 29 B). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des dominant-negativen EGFR-CD533 Rezeptors als Antagonist des ErbB Rezeptor Netzwerkes, einschließlich der natürlichen Variante EGFRvIII.

7.3 Hemmung der EGFRvIII vermittelten zytoprotektiven Antwort auf Bestrahlung durch Expression von EGFR-CD533

Im Folgenden gingen wir der Frage nach, ob die funktionelle Hemmung des EGFRvIII durch Co-Expression des dominant-negativen EGFR-CD533 auch zu einer Hemmung der EGFRvIII vermittelten zytoprotektiven Antwort führt, welche bereits für CHO.EGFRvIII Zellen beschrieben wurde (Abb. 26). In diesen Experimenten wurden die U-373 MG Zellen unter mock- Bedingungen mit Ad-EGFRvIII oder dem Kontrollvektor Ad-*LacZ* mit 3 MOI transduziert. In weiteren parallel durchgeführten Experimenten wurden diese drei Gruppen zusätzlich mit Ad-EGFR-CD533 (3 MOI) entsprechend den in Abbildung 28 dargestellten Bedingungen und Expressionsniveaus co- transduziert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 oder 6 Gy bestrahlt, um klonogene Überlebensraten zu bestimmen, die mit denen für CHO- Zellen (Abb. 30) vergleichbar waren. Wie bereits für CHO.EGFRvIII beschrieben (Abb. 26), führte die Anwesenheit des EGFRvIII in den U-373 MG- Zellen zu einer signifikant höheren Überlebensrate von 75% nach 4 Gy und 50% nach 6 Gy ($p < 0,001$; $p = 0,003$). Im Gegensatz dazu ergab die Bestrahlung der mock- oder Ad-*LacZ* transduzierten Zellen

vergleichbare Überlebensraten von 46% bzw. 38% nach 4 Gy und von 32% bzw. 30% nach 6 Gy (Abb. 30). Die Co-Expression von EGFR-CD533 eliminierte den EGFRvIII vermittelten Überlebensvorteil der U-373 MG- Zellen vollständig und führte zu vergleichbaren Überlebensraten für alle drei Gruppen (Abb. 30). Die Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung des EGFRvIII durch dominant- negatives EGFR-

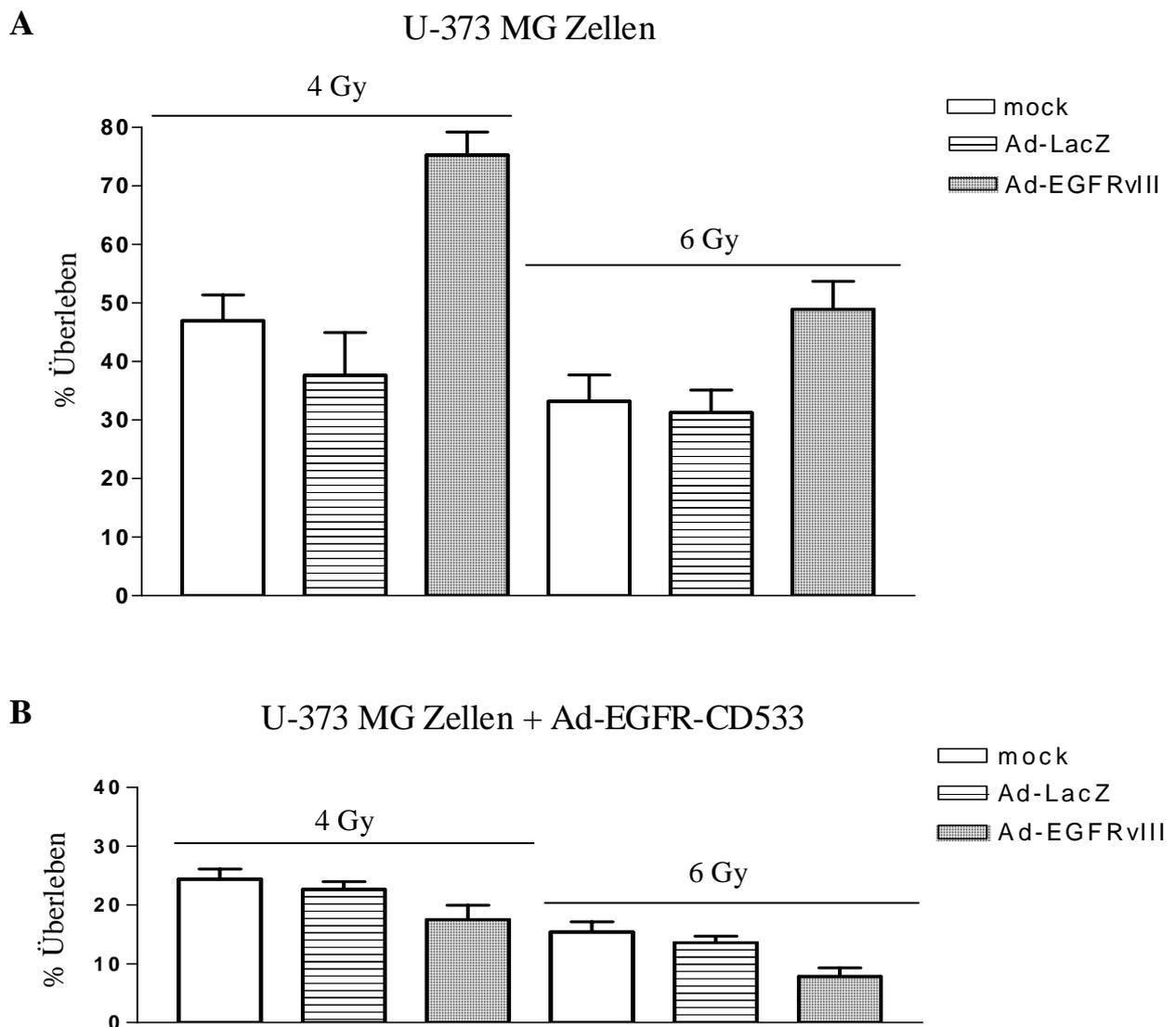


Abbildung 30: Modulation der Strahlenempfindlichkeit von EGFRvIII exprimierenden U-373 MG Zellen durch Co- Expression von EGFR-CD533. **A:** Klonogene Überlebensraten mock-, kontroll- (AdLacZ) oder Ad- EGFRvIII transduzierter U-373 MG Zellen nach Einzeitbestrahlung mit 4 oder 6 Gy. **B:** Klonogene Überlebensraten der Gruppen aus A, jedoch bei zusätzlicher Co-Tansduktion von Ad-EGFR-CD533. Die U-373 MG- Zellen wurden 48 Stunden nach der Transduktion mit 4 oder 6 Gy bestrahlt und 24 Stunden später für den klonogenen Überlebenstest ausgesät. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

CD533 vermochte der EGFRvIII vermittelten zytoprotektiven Antwort effektiv entgegenzuwirken. Die funktionellen Eigenschaften von EGFRvIII konnten durch die Interaktion mit anderen ErbB- Rezeptoren wie EGFR-CD533 effektiv moduliert werden.

7.4 Funktionelle Hemmung des EGFRvIII *in vivo* durch adenovirale Expression von EGFR-CD533

Nachdem in den vorhergehenden *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen wurde, daß die Expression des EGFR-CD533 neben der funktionellen Hemmung des EGFRwt auch zu einer effektiven funktionellen Hemmung des EGFRvIII führt, wurden weitere Studien an Xeno- Transplantat- Tumoren durchgeführt. Wir untersuchten, ob die Expression von EGFR-CD533 *in vivo* neben der beschriebenen Reduktion der strahlen-induzierten Aktivierung des EGFRwt (Abb. 16 C) auch zu einer Modulation der strahlen-induzierten Aktivierung des EGFRvIII führt (Abb. 27). Hierzu wurden wiederum MDA-EGFR-CD533 Xeno-Transplantat- Tumoren verwendet, da in diesen Tumoren nach Induktion des Doxycyclin- induzierbaren Promotors durch intraperitoneale Injektionen von Doxycyclin eine vollständige Expression von EGFR-CD533 vorausgesetzt werden kann und somit funktionelle Effekte der EGFR-CD533 besser quantifiziert werden können. Tumoren von 8 bis 10 mm Durchmesser wurden mit 8 intraperitonealen Injektionen von je 300µg (1µg/µl) behandelt. Die densitometrische Quantifizierung des immunpräzipitierten EGFRwt und EGFRvIII ergab eine Verminderung des basalen Tyr-P von EGFRvIII bei Expression des EGFR-CD533 um 85% (Abb. 31 A), während die Tyr-P von EGFRwt unter die Nachweisgrenze absank. Die Immunblots von EGFR zeigten eine Expression des EGFR-CD533 in den mit Dox behandelten Tumoren und wiesen eine ähnliche Protein- Expression von EGFRwt und EGFRvIII in den verglichenen Tumorgruppen auf (Abb. 31 A). Die Expression von EGFR-CD533

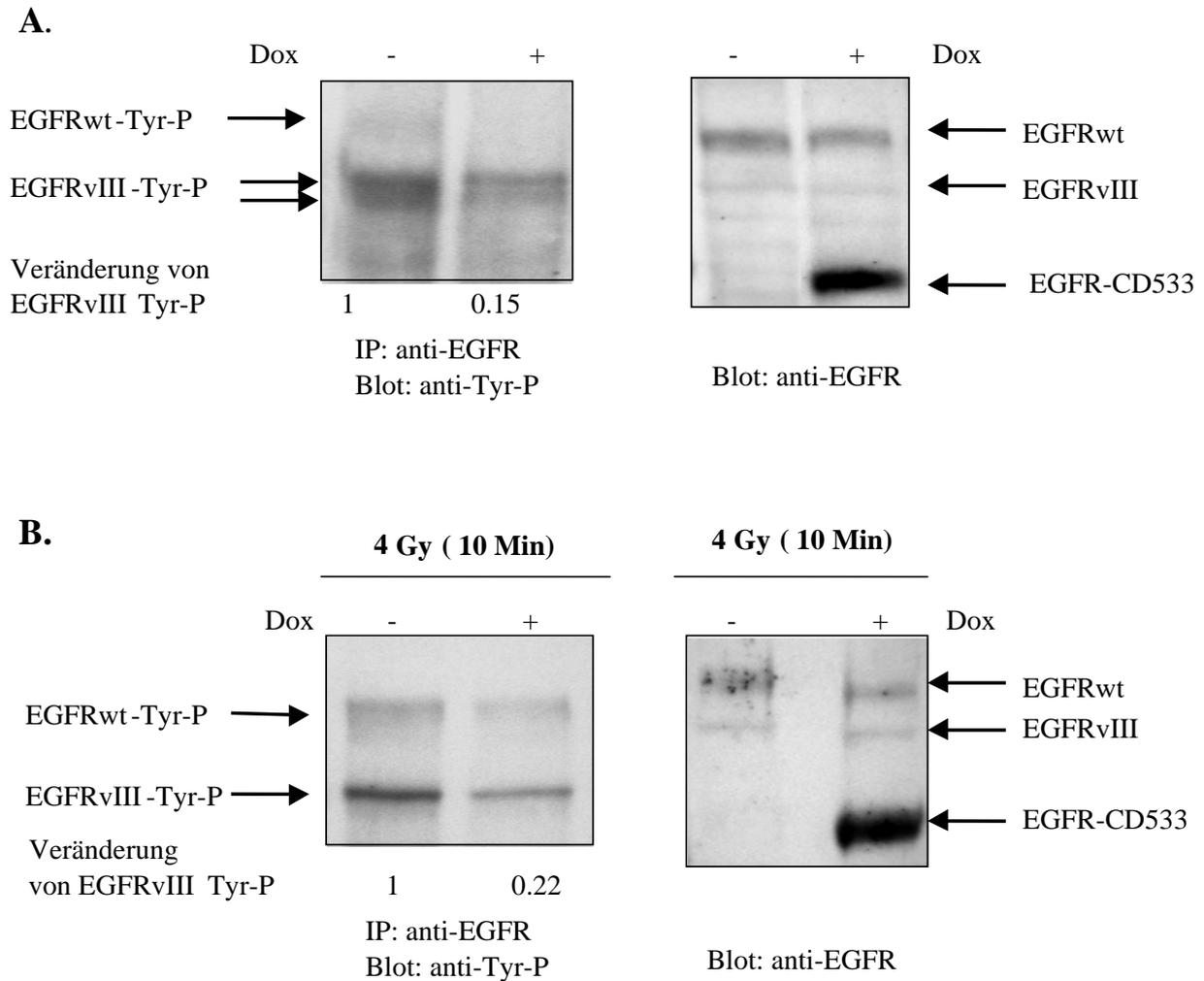


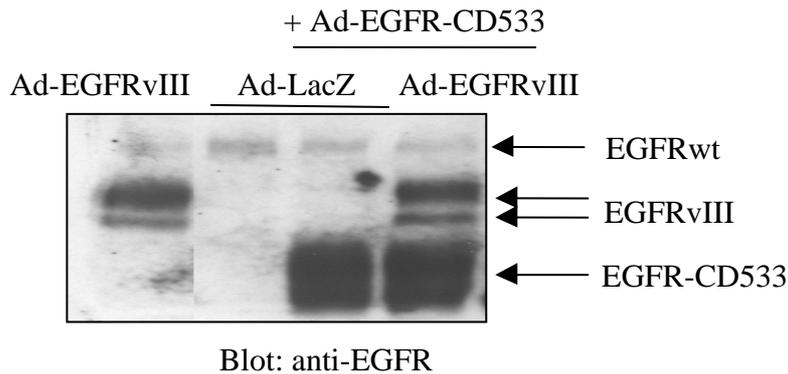
Abbildung 31: Effekte der EGFR-CD533 Expression auf die basale Tyr-P und die strahleninduzierte Aktivierung von EGFRvIII in Xeno- Transplantat- Tumoren von Mamma- karzinomen. A: Effekt der Doxycyclin- induzierbaren Expression von EGFR-CD533 in MDA-CD533 Tumoren. **B:** Effekt der Doxycyclin- induzierbaren Expression von EGFR-CD533 auf die strahlen- induzierbare Aktivierung von EGFRvIII in MDA-CD533 Tumoren. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

reduzierte ebenfalls die Tyr-P von EGFRvIII und EGFRwt in bestrahlten Tumoren. Es ergab sich eine signifikante Reduktion von 78% ($p < 0,001$) für EGFRvIII und eine nahezu 3-fache Reduktion der Tyr-P für EGFRwt (Abb. 31 B). Diese Ergebnisse belegen, daß die EGFRvIII Aktivität *in vivo* durch EGFR-CD533 moduliert werden kann.

7.5 Die Expression von EGFR-CD533 hemmt die tumorspezifische Aktivität von EGFRvIII in Xeno-Transplantat- Tumoren

Neben der durch EGFRvIII vermittelten zellulären Zytoprotektion nach Bestrahlung vermag die konstante Aktivität des EGFRvIII auch eine erhöhte Tumoraktivität in

A.



B.

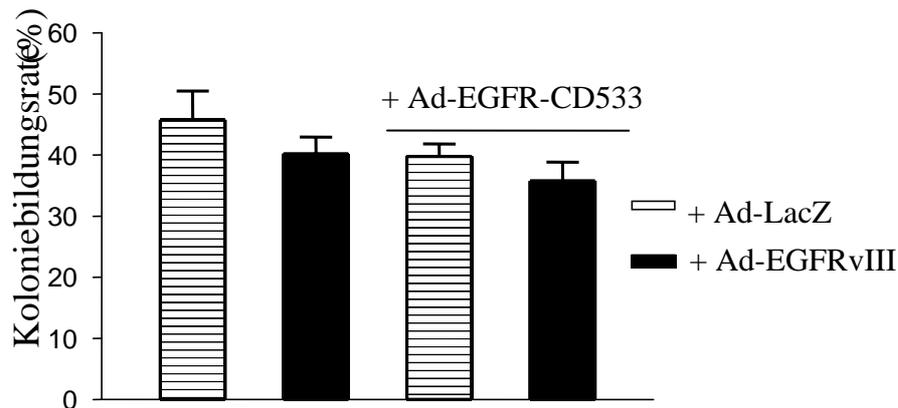
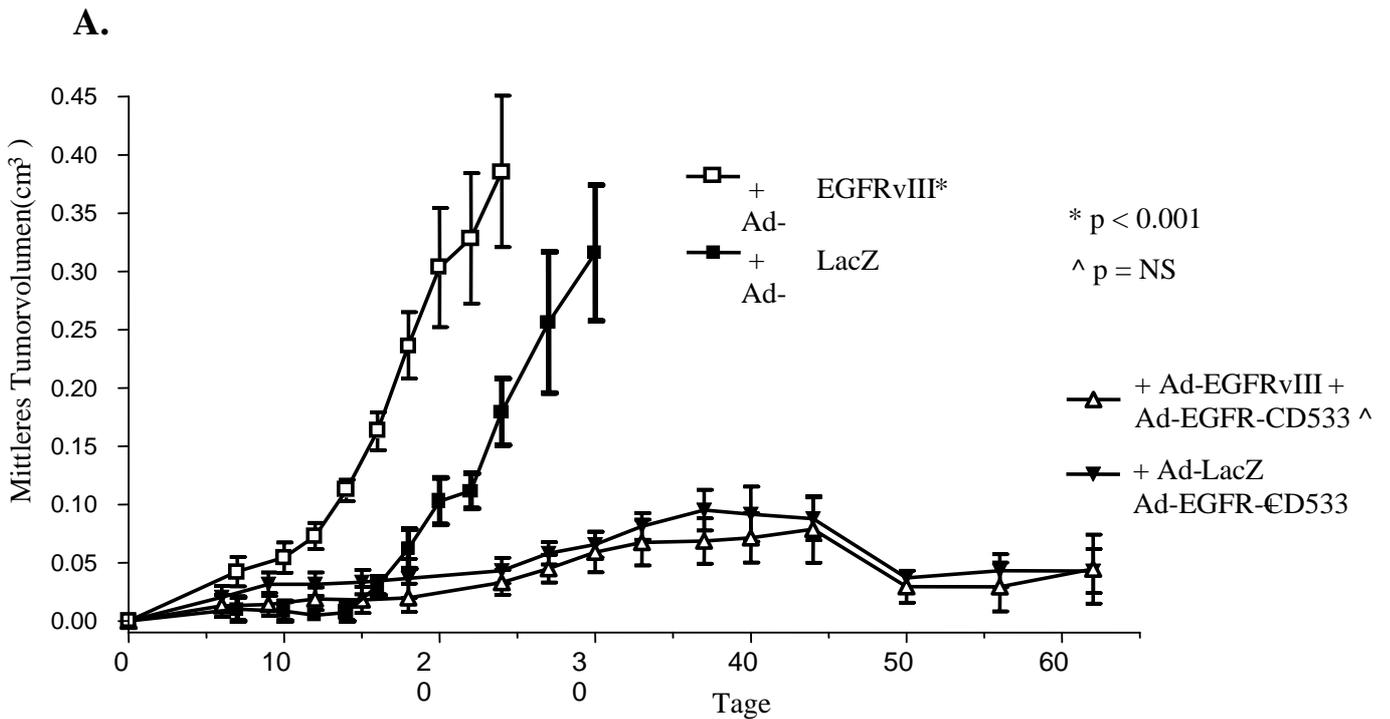


Abbildung 32: Protein- Expression und klonogenes Überleben bei U-373 MG- Zellen nach Transduktion von Ad-EGFRvIII und Ad-LacZ mit und ohne Co- Transduktion von Ad-EGFR-CD533. A: Expressionsniveaus von EGFRwt, EGFRvIII und EGFR-CD533 im Western Blot nach Transduktion mit Ad-EGFRvIII oder Ad-LacZ allein oder in Co-Tansduktion mit Ad-EGFR-CD533 bei einem MOI von jeweils 3. B: Klonogene Überlebensraten der in A beschriebenen Gruppen ohne Bestrahlung zur Überprüfung der Toxizität nach adenoviraler Co- Transduktion.

malignen Gliomzellen zu induzieren, welche den EGFRvIII- Rezeptor exprimieren (Huang et al., 1997). Wir erweiterten unsere Studien zur Interaktion von EGFRvIII und EGFR-CD533 daher auf Untersuchungen zum Tumorwachstum unter Bedingungen der

Expression von EGFRvIII allein und in Kombination mit EGFR-CD533. Hierzu wurden U-373 MG- Zellen *in vitro* mit 3 MOI des Ad-EGFRvIII oder Ad-*LacZ* sowie jeweils in zwei weiteren Gruppen mit simultaner Co- Transduktion von 3 MOI des Ad-EGFR-CD533 prä-transduziert. Nach 48 Stunden wurden $0,8 \times 10^6$ dieser einzeln oder doppelt transduzierten Zellen bei einer Transduktionsrate von mehr als 80% subkutan in die rechte Hinterpfote der Mäuse injiziert. Unabhängige Immunblots der *in vitro* Zellen zum Zeitpunkt der Injektion ergaben eine gleich starke adenovirale Expression des EGFRvIII mit und ohne Co-Expression von EGFR-CD533 (Abb. 32). Die Expressionsstärke des EGFR-wt- Proteins erwies sich von der simultanen adenoviralen Expression von EGFRvIII und von EGFR-CD533 unbeeinflusst (Abb. 32 A). Kolonietests für die vier unterschiedlich transduzierten Zellgruppen, welche zum Zeitpunkt der subkutanen Injektion der Zellen durchgeführt wurden, ergaben vergleichbare Angehraten (plating efficiency) von 35 bis 45% (Abb. 32 B). Dies entspricht einem nur geringfügigen Unterschied in der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen.

Für die U-373 MG Zellen, welche exogenes adenovirales EGFRvIII exprimierten, zeigte sich ein hoch signifikant verstärktes Tumorwachstum ($p < 0,001$; F-Test) mit einer Wachstumszeit von nur 20 Tagen bis zu einem Volumen von $0,3 \text{ cm}^3$ gegenüber 30 Tagen für die mit *LacZ* transduzierten Zellen (Abb. 33 A). U-373 MG- Zellen, welche neben EGFRvIII simultan adenovirales EGFR-CD533 exprimierten, verloren diese Fähigkeit vollständig. Es kam innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 65 Tagen zu keinem nennenswerten Tumorwachstum (Abb. 33 A). Die Expression des EGFR-CD533 in den mit *LacZ* transduzierten Zellen beeinflusste das Tumorwachstum in identischer Weise. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Hemmung der endogenen EGFR-wt- und EGFRvIII- Tyrosinkinase- Aktivität durch EGFR-CD533 mit dem



B.

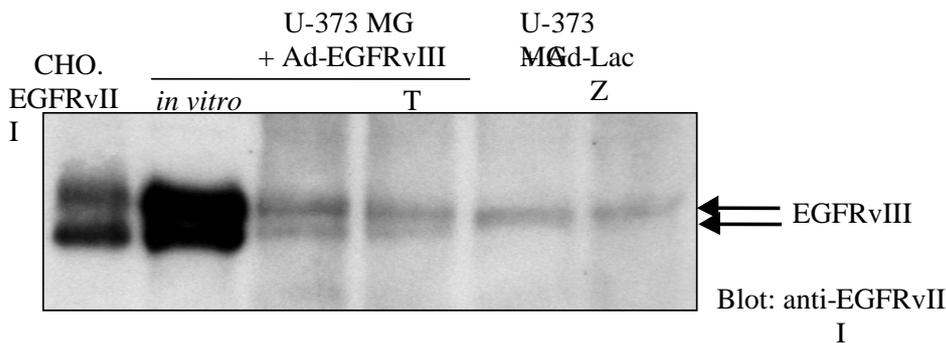


Abbildung 33: Einfluß der Expression von EGFRvIII sowie der Co-Expression von EGFR-CD533 auf das Tumorwachstum von U-373 MG- Zellen. A: Tumorwachstum von Ad-EGFRvIII oder Ad-LacZ allein oder in Kombination mit Ad-EGFR-CD533 transduzierten U-373 MG Zellen. 8 x 10⁶ Zellen wurden zunächst *in vitro* transduziert und 48 Stunden später subkutan in die rechte Hinterpfote der Nacktmäuse inokuliert. Dargestellt sind die mittleren Tumorumvolumina von jeweils 5 Tieren pro Gruppe. B: Western Blot Analyse der EGFRvIII Expression von 4 repräsentativen Tumoren 23 und 30 Tage nach der Inokulation der transduzierten Zellen; NS= nicht signifikant.

Tumorwachstum interferiert. Diese Schlußfolgerung wird durch immun-chemische Analysen von zwei etablierten Tumoren aus U-373 MG Zellen bestärkt, welche zuvor *in vitro* mit Ad-EGFRvIII oder Ad-LacZ transduziert worden waren. Bei diesen fand sich sowohl eine endogene als auch eine exogene Expression von EGFRvIII (Abb. 33 B).

Die Tumoren wurden erst 23 beziehungsweise 30 Tage nach Inokulation der prä-transduzierten Zellen entfernt und belegen somit ein zeitlich verlängertes Intervall der Trans-Gen Expression trotz der zahlreichen Zellteilungen in diesem Zeitintervall. Zusammenfassend führt die Expression von EGFR-CD533 im Tumor zu einem dominant negativen EGFRvIII Phänotyp. Hierdurch kann die EGFRvIII vermittelte tumorproliferative Aktivität gehemmt werden.

7.6 Strahlensensibilisierung von EGFRvIII exprimierenden U-373 MG-Tumoren nach adenoviraler Transduktion von EGFR-CD533

Abschließend zu den Studien der Interaktion von EGFRvIII und EGFR-CD533 sollten auch die U-373 MG- Xeno-Transplantat- Tumoren unter Bedingungen, zu denen signifikante Mengen an endogenem EGFRvIII exprimiert werden (Abb. 20 C), auf eine strahlen-sensibilisierende Wirkung der exogenen Expression von EGFR-CD533 untersucht werden. Hierzu wurde erneut die Tumorstadiumsverzögerung analysiert. Unbestrahlte und unbehandelte U-373 MG Tumoren erreichten innerhalb von 14 Tagen zwei Tumorverdopplungszeiten (Abb. 34). Diese Wachstumsgeschwindigkeit wurde durch die intratumorale Infusion von Ad-*LacZ* nicht beeinflusst. Die intratumorale Infusion des Ad-*LacZ* ergab exzellente Transduktionsraten von 75 ± 5 % im Tumor. Demgegenüber führte die Infusion von Ad-EGFR-CD533 allein zu einer grenzwertig signifikanten Tumorstadiumsverzögerung mit einer Vervierfachung des Tumorstadiumsvolumens innerhalb von 21 Tagen ($p=0,07$; F-Test). Die alleinige Bestrahlung der mit Ad-*LacZ* infundierten Tumoren mit 3 Fraktionen von je 3 Gy verzögerte das Tumorstadiumwachstum signifikant auf eine Tumorstadiumvolumen- Vervierfachungszeit von 33 Tagen ($p=0,023$; F-Test). Die Bestrahlung von Tumoren, die mit Ad-EGFR-CD533 infundiert

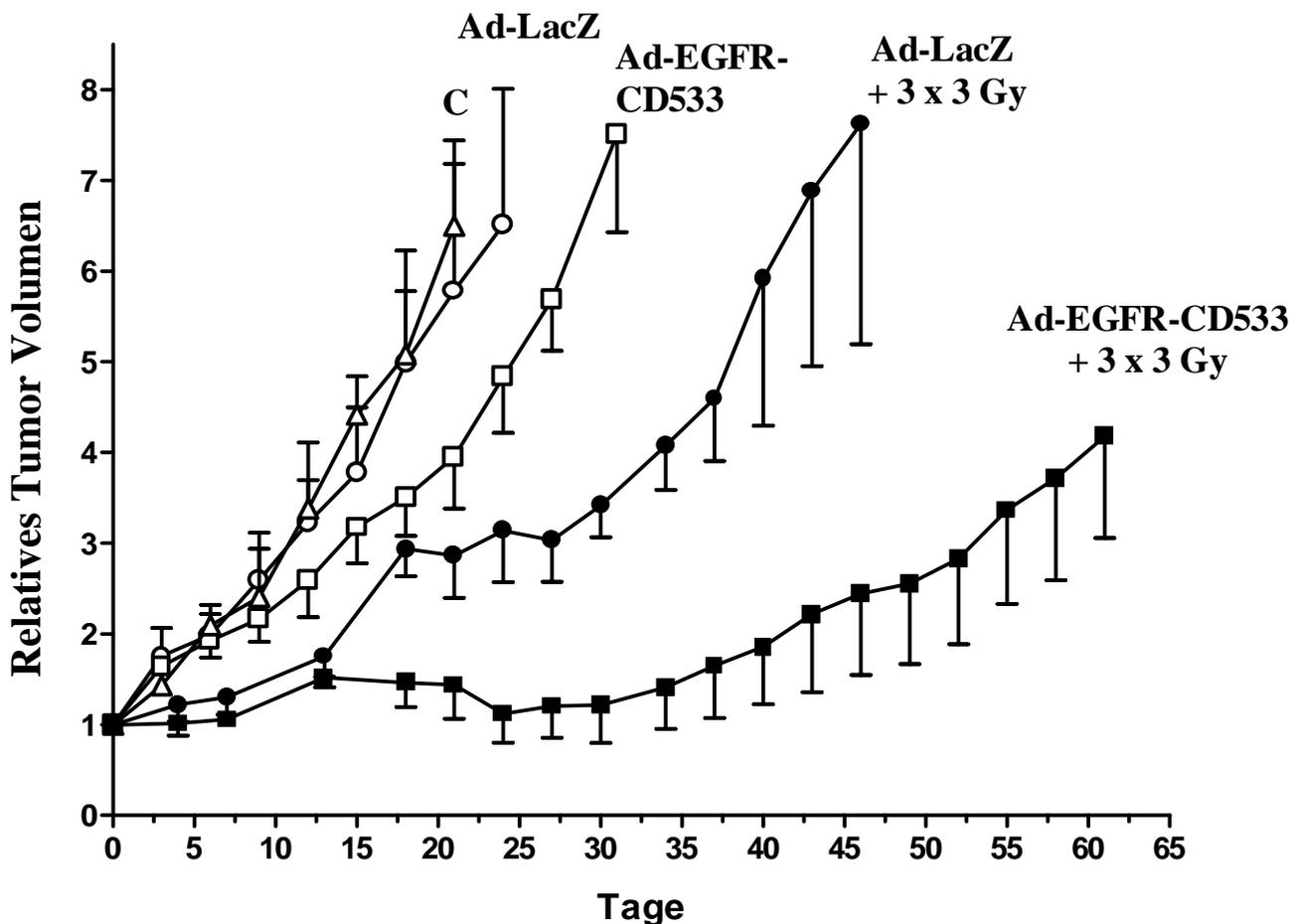


Abbildung 34: Modulation der Strahlenempfindlichkeit etablierter Xeno- Transplantat U-373 MG- Tumoren durch intratumorale Infusion von Ad-EGFR-CD533. U-373 MG Tumoren von 8-10 mm im größten Durchmesser wurden mit Hilfe der 2 x 6 Nadeltechnik intratumoral mit Ad-LacZ oder Ad-EGFR-CD533 infundiert und im weiteren Wachstumsverhalten verfolgt oder 2 Tage nach der letzten Infusion zusätzlich mit 3 x 3 Gy bestrahlt. Das Tumorzvolumen 2 Tage nach der letzten Infusion wurde als Referenzvolumen an Tag 0 definiert. Alle Tumorzvolumina entsprechen relativen Veränderungen bezogen auf das Referenzvolumen. Es wurden 4 –5 Tiere pro Gruppe verwendet. Der Kurvenverlauf C stellt eine Kontrollgruppe ohne intratumorale Infusion von Adenoviren und ohne Bestrahlung dar.

worden waren, ergab eine signifikante supra-additive Wachstumsverzögerung ($p < 0,001$; F-Test). Unter diesen Bedingungen erreichten die Tumoren erst nach 60 Tagen eine Vervielfachung des Tumorzvolumens.

Diese Ergebnisse belegen die synergistische Wirkung von EGFR-CD533 und Bestrahlung. Da die Tumoren während der Analyse der Tumorzvolumensverzögerung

endogenes EGFRvIII und exogenes EGFR-CD533 exprimieren, ist anzunehmen, daß die *in vivo* Expression des endogenen EGFRvIII durch die Expression von dominant-negativem EGFR-CD533 neutralisiert wurde.

7.7 Diskussion

Während die Expression von EGFRwt und EGFRvIII in CHO Zellen hilfreich war, um die Rolle dieser Rezeptoren in der zellulären Strahlenantwort zu definieren, waren zusätzlich die Effekte der EGFRvIII Expression in autokrin wachstumsregulierten humanen Tumorzellen zu charakterisieren. Aufgrund der möglichen therapeutischen Bedeutung wählten wir die U-373 MG- Zellen und transduzierten sie mit den adenviralen Vektoren Ad-EGFRvIII und Ad-EGFR-CD533, um kontrollierbare Expressionsniveaus beider Rezeptoren zu erzielen. Diese Zellen wurden ausgewählt, um zwei wichtige Aspekte der EGFR- Biologie zu untersuchen. Zum einen sollte die Wirkung des EGFRvIII auf die Strahlensensitivität der malignen Gliomzellen studiert werden, welche physiologischerweise EGFRwt und andere ErbB- Rezeptoren co-exprimieren. Zellen, die EGFRvIII vor dem Hintergrund der physiologischen Expression anderer ErbB- Rezeptoren exprimieren, reflektieren eher die Strahlenantworten *in vivo*, zumal U-373 MG Zellen, wenn sie als Xeno- Transplantat- Tumoren wachsen, signifikante Mengen an EGFRvIII exprimieren und die ErbB- Rezeptor- Expressionsprofile vieler anderer maligner Gliome *in vivo* reflektieren (Ekstrand et al., 1994, Frederick et al., 2000, Moscatello et al., 1995). Ein weiterer Aspekt war die Untersuchung zur Co-Expression des konstant aktiven EGFRvIII und des dominant-negativen EGFR-CD533. Zellen mit einer Co-Expression dieser beiden Rezeptoren erlaubten neue funktionelle Studien zur bislang beschriebenen verminderten Fähigkeit

von EGFRvIII, mit anderen ErbB- Rezeptoren zu interagieren (Chu et al., 1997; O'Rourke et al., 1998).

Die Transduktion der Zellen mit EGFR-CD533 bestätigte die zuvor demonstrierten hemmenden Effekte von EGFR-CD533 auf die Aktivitäten von EGFRwt und alle anderen ErbB- Rezeptoren (Contessa et al., 1999; Lammering et al., 2001; Reardon et al., 1999). Unter der Annahme gleichwertiger Proteinmengen an EGFRvIII und EGFR-CD533 erwiesen sich die Interaktionen dieser beiden Proteine als relativ effizient (Abb. 28), verglichen mit früheren Untersuchungen der stabil transfizierten MDA-CD533-Zellen (Reardon et al., 1999; Contessa et al., 1999). Die zytoprotektive Wirkung von EGFRvIII in U-373 MG- Zellen nach ionisierender Bestrahlung bestätigte die Ergebnisse, welche zuvor für CHO- Zellen beschrieben worden waren. Die Co-Expression von EGFR-CD533 bewirkte eine 3,5 fache Erhöhung der Strahlensensibilität der EGFRvIII exprimierenden U-373 MG- Zellen nach einer Einzeldosis von 4 Gy und einen mehr als 5- fachen Effekt nach 6 Gy, so daß auch hier eine Dosisabhängigkeit der Strahlen-sensibilisierung vorliegt (Abb. 30).

Die Erkenntnis, daß dominant- negatives EGFR-CD533 die basale und strahlen-induzierte Tyr-P von EGFRwt und EGFRvIII zu reduzieren vermag (Abb. 28,29), deutet darauf hin, daß die Überexpression von EGFR-CD533 die Homodimer- Formation von EGFRwt und EGFRvIII reduziert und die Bildung eines EGFR-wt- EGFRvIII heterodimeren Komplexes unterbindet, zumal beide endogene Rezeptoren zur Heterodimerisierung fähig sind (Lemmon und Schlessinger, 1994). Diese Ergebnisse und die Beobachtung, daß die EGFRvIII Aktivität durch ionisierende Bestrahlung *in vivo* konstant induzierbar ist, führen zu dem Rückschluß, daß die Mechanismen der

Aktivierung des EGFRvIII Rezeptors *in vivo* auf einer Liganden- unabhängigen Dimerisierung durch erhöhte Affinität der Rezeptoren zueinander beruhen. Die Überexpression von EGFR-CD533 kann die Tyr-P des EGFRvIII auf ein basales Aktivitätsniveau zurückführen (Abb. 31 A). Sie bestätigt die konstante basale Aktivität der Tyrosinkinase ohne den Einfluß homodimerer Formationen.

Es wurde diskutiert, ob die tumorspezifische Aktivität des EGFRvIII von einer Dimerisierung (Chu et al., 1997) oder der Unfähigkeit zur Inaktivierung bestimmt ist (Moscatello et al., 1996). Wir haben nachgewiesen, daß die Ad-EGFRvIII Expression ein verstärktes Wachstum der subkutanen Tumorimplantate auslöst und dieses durch die Co-Expression des EGFR-CD533 mit einer sequenziellen vollständigen Wachstumshemmung komplett zu eliminieren war (Abb. 33). Dies bedeutet, daß die Dimerisierung, welche zu einem erhöhten Aktivitätsniveau führt (Huang et al., 1997), einen essentiellen Bestandteil der tumorspezifischen Wirkung des EGFRvIII ausmacht.

Schließlich wurde durch unsere Untersuchungen zur Tumorstillungsverzögerung durch Expression von exogenem EGFR-CD533 unter Bedingungen der physiologischen Expression von EGFRvIII in U-373 MG Xenograft Tumoren belegt, daß die *in vivo* Expression des endogenen EGFRvIII durch die Therapie mit Ad-EGFR-CD533 funktionell neutralisiert wird. Diese erweiterte therapeutische Wirkung des dominant-negativen EGFR-CD533 gilt möglicherweise nicht für den immuntherapeutischen Ansatz der EGFR- Blockade durch den monoklonalen Antikörper C225, welcher die EGF-Liganden Domäne des EGFR blockiert und dadurch das Rezeptorsignal hemmt. Weil C225 nur durch Bindung an die extrazelluläre Liganden- Bindungsstelle des EGFR wirkt, ist anzunehmen, daß es nur eine

geringfügige Wirkung gegen die auf der extrazellulären Domäne mutierten Varianten des EGFR, wie zum Beispiel EGFRvIII, entfalten kann. Hier ergibt sich neben der fehlenden Aktivität gegen andere ErbB- Rezeptoren ein weiterer Schwachpunkt in der therapeutischen Anwendung des C225.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die dominant-negative Form EGFR-CD533 die Funktion des EGFRvIII, eines Modulators der Tumorzell-Strahlenantwort und des Tumorwachstums, effektiv zu hemmen vermag. Die Untersuchungen zur Charakterisierung der Rezeptorinteraktionen wurden anhand simulierter *in vivo* Verhältnisse der EGFRvIII Expression mit humanen malignen U-373 MG Gliomzellen durchgeführt. Sowohl die Tyr-P des EGFRvIII, die strahlen-induzierte Aktivierung des EGFRvIII, als auch die durch EGFRvIII vermittelte Zytoprotektion nach Bestrahlung und weiterhin die tumorspezifische Aktivität konnten durch Protein-Protein Interaktionen des dominant-negativen EGFR-CD533 effektiv gehemmt werden. Somit erwies sich die Ausschaltung der EGFRvIII Funktion neben den ErbB- Molekülen als wichtiger Ansatzpunkt therapeutischer Modulation zur Erhöhung der Strahlenwirkung bei humanen Karzinomen und malignen Gliomen.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR und weitere ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle bei der neoplastischen Wachstumskontrolle vieler Karzinom- und Gliomzellen (Weinberg, 1989; Baselga und Mendelsohn, 1994; Tang et al., 1997; Schmidt-Ullrich et al., 2000). Diese erfolgt über die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen und die Stimulation nachgeschalteter Signaltransduktionswege (Schmidt-Ullrich et al., 2000). Wie auch für andere Wachstumsfaktor-Rezeptoren kann eine erhöhte EGFR-Expression Folge einer Genamplifikation, einer erhöhten Transkription, mRNA Translation oder Mutation sein. Hierdurch kommt es zu einem unreguliert erhöhten Rezeptorsignal. Für viele Karzinome und Gliome konnte eine erhöhte EGFR Aktivität mit einer neoplastischen Progression und einem vermehrten Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht werden (Moscatello et al., 1995; Moscatello et al., 1996).

Die Überexpression des EGFR in autokrin regulierten Karzinom – und Gliomzellen ist als Teil der neoplastischen Progression oft mit der Expression mutierter Formen assoziiert (Frederick et al., 2000; Huang et al., 1997; Moscatello et al., 1995; Nagane et al., 1996; Nishikawa et al., 1994). Die häufigste EGFR Mutation ist eine Variante mit der Bezeichnung EGFRvIII, welche durch eine Deletion der Exone 2-7 des EGFR Gens hervorgerufen wird (Huang et al., 1997). Diese führt zu einer konstant aktiven Tyrosinkinase, welche Liganden-unabhängig eine Zelltransformation verursachen kann (Moscatello et al., 1996; Wong et al., 1992). EGFRvIII ist nur auf der Zellmembran von Tumoren, nicht aber in Normalgeweben zu finden (Moscatello et al., 1995; Frederick et al., 2000). Eine weitere Besonderheit dieser EGFR Variante ergibt sich aus der

Beobachtung, daß der Rezeptor nur *in vivo* exprimiert und in Tumorzellen *in vitro* rasch herunterreguliert wird. Daher gibt es bislang erst sehr wenige Studien zur funktionellen Bedeutung des EGFRvIII.

In vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Bestrahlung von Tumorzellen zu einer unmittelbaren Aktivierung der ErbB – Rezeptor Familie führt und daß wiederholte Bestrahlungen mit 2 Gy eine erhöhte EGFR- Expression zur Folge haben (Schmidt-Ullrich et al. 1996; Contessa et al. 1999; Bowers et al., 2000; Schmidt-Ullrich et al., 1994). Diese strahlen- induzierte Aktivierung von EGFR war durch eine mehrfache Zunahme der Tyrosin- Phosphorylierung und eine nachgeschalteten Aktivierung existierender Signaltransduktionskaskaden der MAPK und PI3K definiert (Schmidt-Ullrich et al., 1996; Goldkorn et al., 1997; Kavanagh et al., 1995; Carter et al., 1998). Auf die strahlen-induzierte Aktivierung von EGFR folgt eine dosisabhängige proliferative Zellantwort, welche sowohl nach Einzeit- als auch nach wiederholten Bestrahlungen zu beobachten ist (Contessa et al., 1999; Reardon et al., 1999; Kavanagh et al., 1995). Hieraus läßt sich ableiten, daß die strahlen- induzierte Aktivierung von EGFR an den Mechanismen der akzelerierten Proliferation oder Repopulierung beteiligt ist. Diese zelluläre Proliferationsantwort führt bei wiederholten Bestrahlungen zu einer zunehmenden Erneuerung von Tumorklonen (Withers et al., 1988; Fowler, 1991). Es ist davon auszugehen, daß die steigende biosynthetische Aktivität dieser rasch proliferierenden Tumorzellen zu einer verbesserten Reparaturkapazität von DNA- Schäden führt. Da sowohl die strahlen- induzierte Proliferationsantwort als auch die verbesserte DNA- Reparaturkapazität den zytotoxischen Strahleneffekten entgegenwirken, haben wir diese als EGFR- vermittelte zytoprotektive Antwort einer Tumorzelle definiert. Aufgrund der besonderen Rolle von

EGFR bei dieser zytoprotektiven Antwort einer Tumorzelle auf eine Bestrahlung müßte somit die Ausschaltung der EGFR- Funktion die zytoprotektive Antwort verhindern und eine erhöhte Strahlensensibilität der Tumorzelle zur Folge haben.

Die vorliegende Arbeit wurde aus der Hypothese konzipiert, durch eine Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung des EGFR eine erhöhte Strahlensensibilisierung von Tumorzellen erzielen zu können. Dabei verwendeten wir zur Ausschaltung der EGFR- Funktion einen genetischen Ansatz. EGFR wurde mit Hilfe einer adenoviral- induzierten Überexpression einer dominant- negativen Variante des EGFR mit der Bezeichnung EGFR-CD533 funktionell gehemmt. EGFR-CD533 hat den Vorteil, daß es nicht nur EGFR, sondern die Funktion des gesamten ErbB- Rezeptor- Tyrosinkinase- Netzwerkes und außerdem die Funktion der natürlich vorkommenden mutierten EGFR- Spezies hemmt und aufhebt.

Zunächst war zu klären, ob die gentherapeutische Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung des EGFR durch dominant- negatives EGFR-CD533 als ein strategischer Ansatz zur Erhöhung der Strahlensensibilität an einem breiten Spektrum verschiedener Tumorzell- Linien mit unterschiedlichen Expressionsprofilen der ErbB- Rezeptor- Familie geeignet ist. Nachdem alle zu testenden Zell- Linien auf ihre ErbB- Rezeptor Expressionsprofile hin untersucht (Abb. 7) und die optimalen experimentellen Transduktionsbedingungen für den adenoviralen Gentransfer des dominant- negativen EGFR-CD533 definiert worden waren (Abb. 8), konnte nachgewiesen werden, daß die Überexpression des EGFR-CD533 für alle untersuchten Zell- Linien zu einer kompletten Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung des EGFR führt (Abb. 11). Auch für die nachgeschaltete zytoplasmatische pro-proliferative MAPK ließ sich eine

Hemmung der EGFR- vermittelten strahlen- induzierten Aktivierung feststellen (Abb. 12 und 13), und zwar nachhaltiger, als nach einer pharmakologischen Hemmung der EGFR Tyrosinkinase (Abb 13). Klonogene Überlebensanalysen aller untersuchten Zell-Linien ergaben bei Expression des EGFR-CD533 eine hoch signifikante Erhöhung der intrinsischen Strahlensensibilität, und zwar sowohl für Einzeit- als auch für fraktionierte Bestrahlungen (Abb. 14). Somit belegen diese Daten, daß alle untersuchten Zell- Linien mit Hilfe eines gentherapeutischen Ansatzes der adenoviralen Expression des EGFR-CD533 wirkungsvoll zu transduzieren sind, eine funktionelle Hemmung des EGFR auftrat und dies zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung führt.

Dieser gentherapeutische Ansatz wurde in weiterführenden Studien daraufhin untersucht, ob die beobachteten Wirkungsmechanismen *in vitro* denen *in vivo* entsprechen und ob der Anteil der mit dem Adenovirus EGFR-CD533 (Ad-EGFR-CD533) transduzierten Tumorzellen die Strahlensensibilität des Tumors zu beeinflussen vermag und somit die intratumorale Infusion von Ad-EGFR-CD533 als ein gentherapeutisches Verfahren zur Strahlensensibilisierung humaner Karzinome und maligner Gliome geeignet ist. Zunächst erreichten wir in Optimierungsstudien, die Transduktionsrate der Tumorzellen nach intratumoraler Applikation des adenoviralen Vektors auf eine über 40 %ige Transduktionsrate zu erhöhen (Abb. 15). Unter diesen Bedingungen zeigte sich bei MDA-MB-231 Xeno- Transplantat- Tumoren nach intratumoraler Infusion des Ad-EGFR-CD533 und anschließender fraktionierter Bestrahlung des Tumors mit 1.5 Gy an drei aufeinanderfolgenden Tagen in *ex vivo* klonogenen Überlebensanalysen ein gegenüber der Kontrolle signifikant um 46 % reduziertes Überleben der Tumorzellen (Abb. 17). Um die zugrundeliegenden Mechanismen der Strahlensensibilisierung in Tumorzellen nach Expression von EGFR-

CD533 auch *in vivo* untersuchen zu können, verwendeten wir stabil transduzierte MDA-EGFR-CD533 Tumoren, da nach intraperitonealer Verabreichung des Doxycyclin alle Tumorzellen EGFR-CD533 exprimieren. Hierbei konnte in einem Xeno- Transplantat-Tumor *in vivo* ebenfalls eine strahlen-induzierte Aktivierung von EGFR und eine effektive Hemmung dieser Aktivierung bei EGFR-CD533 Expression demonstriert werden (Abb. 15), so daß auch *in vivo* ein identischer Wirkungsmechanismus der durch EGFR-CD533 induzierten Strahlensensibilisierung der Tumorzellen anzunehmen ist. Wir erweiterten daraufhin unsere präklinischen Untersuchungen auf Wachstumsverzögerungsanalysen. Während sich bei A-431 Tumoren nach intratumoraler Applikation des Ad-EGFR-CD533 ohne Bestrahlung nur eine initiale Wachstums- Beeinträchtigung feststellen ließ (Abb.18 A), zeigte sich nach fraktionierter Bestrahlung eine signifikante Wachstumsverzögerung (Abb. 18 B). Eine vergleichbare Verzögerung nach Ad-EGFR-CD533- Gentherapie und Bestrahlung ergab sich auch für die MDA-MB-231 Tumoren (Abb. 19).

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit Untersuchungen zu modulierenden Effekten von EGFRvIII auf die akute zelluläre Strahlenantwort und mögliche Einflüsse auf das Überleben der Tumorzellen nach einer Bestrahlung. Da die Expression von EGFRvIII nur *in vivo* festzustellen ist (Abb. 20), wurde ein transient transfiziertes Zellsystem mit CHO Zellen entwickelt. Hierdurch wurden mechanistische Studien zur funktionellen Bedeutung von EGFRvIII *in vitro* möglich. Während erwartungsgemäß eine Behandlung der CHO.EGFRvIII Zellen mit EGF zu keiner Aktivierung des EGFRvIII führte (Abb. 22), induzierte die Bestrahlung mit 2 Gy eine sofortige Erhöhung der Tyrosin- Phosphorylierung bis zum 4,3- fachen des Ausgangswertes (Abb. 22). Untersuchungen zur Aktivität der zytoplasmatischen MAPK

und Akt haben belegt, daß diese strahlen- induzierte Aktivierung des EGFRvIII zu einer sofortigen nachgeschalteten Aktivierung der MAPK- und PI3K- Signaltransduktionskaskade führt (Abb. 23-25). Dabei erwies sich das strahlen- induzierte EGFRvIII- vermittelte Signal zur MAPK mit einer 8,5- fachen Erhöhung der MAPK- Aktivität als signifikant höher als dies für die EGFRwt- vermittelte MAPK Aktivierung (3,5- fach) unter identischen Bedingungen festzustellen war (Abb. 23). Diese strahlen- induzierte EGFRvIII Aktivierung führte zu einer effektiven Modulation der Strahlenempfindlichkeit der CHO Zellen (Abb. 26). Einzeitbestrahlungen der CHO.EGFRvIII Zellen mit 2 oder 4 Gy ergaben bei funktionell aktivem EGFRvIII eine signifikant erhöhte klonogene Überlebensrate verglichen mit Kontrollzellen und Zellen, bei denen EGFRvIII pharmakologisch inaktiviert worden war (Abb. 26). Es wurde in *in vitro* Untersuchungen gezeigt, daß EGFRvIII durch eine Bestrahlung aktiviert wird und hierdurch zu einer Aktivierung der MAPK- und PI3K- Signalkaskaden mit der Folge einer erhöhten Zytoprotektion kommt. Anschließend wurde an Xeno- Transplantat- Tumoren untersucht, ob die endogen vorkommenden EGFRvIII Moleküle ebenfalls durch eine Bestrahlung des Tumors aktiviert werden. Hierzu wurden MDA-MB-231 Tumoren mit 4 Gy bestrahlt und 10 Minuten später immunchemisch analysiert. Die Bestrahlung führte zu einer mehr als 3- fachen Erhöhung der Tyrosin- Phosphorylierung des EGFRvIII bei gleicher Proteinmenge in den vergleichbaren Tumorgruppen (Abb. 27).

Um der Frage nachgehen zu können, ob die adenovirale Expression von EGFR-CD533 die funktionelle Wirkung von EGFRvIII zu hemmen vermag, verwendeten wir adenovirale Vektoren, die eine Expression eines oder beider Rezeptoren in der Gliomzell- Linie U-373 MG *in vitro* erlaubten. Die gleichzeitige Co-Expression von

EGFR-CD533 führte zu einer vollständigen Hemmung der strahlen- induzierten EGFRvIII Aktivierung (Abb. 29) und zu einer Elimination des durch EGFRvIII vermittelten signifikant erhöhten Zellüberlebens nach 4 oder 6 Gy (Abb. 30). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von EGFR-CD533 als Antagonist des ErbB- Rezeptor Netzwerkes einschließlich des EGFRvIII. Weiterführende *in vivo* Untersuchungen konnten die Wirksamkeit der funktionellen Hemmung von EGFR-CD533 auch auf die endogen in Xeno- Transplantat Tumoren vorhandenen EGFRvIII Moleküle unter Beweis stellen (Abb. 31). Nicht nur die strahlen- induzierte Aktivierung des EGFRvIII, sondern auch die EGFRvIII vermittelte verstärkte Tumorstadiumsgeschwindigkeit ließ sich mit Hilfe der adenoviralen Co- Expression des EGFR-CD533 wirkungsvoll hemmen (Abb. 33), so daß von einer vollständigen funktionellen Hemmung des EGFRvIII bei gleichzeitiger Expression des EGFR-CD533 ausgegangen werden kann. Die funktionelle Hemmung des ErbB- Rezeptor Netzwerkes und auch der endogen exprimierten Variante EGFRvIII durch gentherapeutische intratumorale Applikation von Ad-EGFR-CD533 in Xeno- Transplantat- Tumoren führt nach fraktionierter Bestrahlung mit 3 x 3 Gy zu einer hoch signifikanten supra-additiven Wachstumsverzögerung der Tumoren (Abb. 34). Dies belegt die synergistische Wirkung von Ad-EGFR-CD533 und Bestrahlung und unterstreicht die strahlensensibilisierenden Effekte des EGFR-CD533 aufgrund der funktionellen Ausschaltung der ErbB- Rezeptoren und des EGFRvIII.

Zusammenfassend wurde erstmalig nachgewiesen, daß durch eine funktionelle Ausschaltung der ErbB- Rezeptor Tyrosinkinase mit Hilfe eines dominant- negativen EGF- Rezeptors bei einem breitem Spektrum verschiedener Tumorzellen eine signifikante Strahlensensibilisierung zu erreichen ist. Der zugrundeliegende

Mechanismus besteht in der Ausschaltung einer durch EGFR- bzw. die ErbB-Rezeptoren nach einer Bestrahlung aktivierten pro- proliferativen und zytoprotektiven Signalkaskade. Hierdurch kommt es infolge zunehmender biosynthetischer Aktivität dieser rasch proliferierenden Tumorzellen zu einer verbesserten Reparaturkapazität von DNA- Schäden, welche den toxischen Effekten der Bestrahlung entgegenwirken. Die gentherapeutische intratumorale Applikation des Ad-EGFR-CD533 bei Xenotransplantat- Tumoren erwies sich als eine wirkungsvolle Maßnahme zur Erhöhung der Strahlensensibilität humaner Karzinome und maligner Gliome vor einer fraktionierten Bestrahlung dieser Tumoren. Die zugrundeliegenden Mechanismen entsprechen hierbei den zuvor *in vitro* charakterisierten und definierten Prinzipien.

Daneben wurde nachgewiesen, daß die Expression der bei vielen Tumorentitäten natürlich vorkommenden mutierten EGFR Variante EGFRvIII zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate der Tumorzellen nach Bestrahlung führt. Zu erklären ist dies durch eine deutliche strahlen- induzierte Aktivierung des EGFRvIII. Hierdurch kommt es in noch stärkerem Maße als für EGFRwt zu einer Aktivierung der pro- proliferativen und anti- apoptotischen Signalkaskaden der MAPK und PI3K, welche letztlich eine zytoprotektive Antwort der Zelle induzieren. Es wurde weiterhin demonstriert, daß die gleichzeitige Expression von EGFR-CD533 die funktionellen Wirkungen des EGFRvIII vollständig zu eliminieren vermag und zwar sowohl die EGFRvIII vermittelte radioprotektive Antwort der Tumorzelle als auch die Beschleunigung des Tumorwachstums.

Unsere Daten belegen, daß die genetische Hemmung der strahlen- induzierten Aktivierung der ErbB- Rezeptor Tyrosinkinase sowie der natürlich mutierten Variante

EGFRvIII mittels EGFR-CD533 eine wirkungsvolle und breit anwendbare neue therapeutische Intervention zur Tumorzell- Strahlensensibilisierung darstellt. Sie sollte deswegen als eine vielversprechende gentherapeutische Innovation bei der Behandlung solider Tumoren weiterentwickelt werden.

9. LITERATURVERZEICHNIS

Ahonen M, Ala-Aho R, Baker AH, George SJ, Grenman R, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Antitumor activity and bystander effect of adenovirally delivered tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Mol Ther* 2002;5:705-15.

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

Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, Di Fiore PP, Kraus MH. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 1995;10:1813-1821.

Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, et al., Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 1995;10:1813-21.

Ang KK, Peters LJ. Concomitant boost radiotherapy in the treatment of head and neck cancers. *Semin Radiat Oncol* 1992;2:31-33.

Antonyak MA, Moscatello DK, Wong AJ. Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase by a mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1998;273:2817-22.

Balaban N, Moni J, Shannon M, Dang L, Murphy E, Goldkorn T. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptors sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:147-156.

Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ, Stewart M, Katsaros D, Sismondi P, Love S, Scott WN, Williams AR, Lessells AM, Macleod KG, Smyth JF, Miller WR. The prognostic value of the epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *Br J Cancer* 1996;73:301-306.

Baselga, J, Mendelsohn, J. The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:127-138.

Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, Zhu X, Humphrey PA, Friedman HS et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 1995;6:1251-1259.

Beckman MW, Niederacher D, Massenkeil G, Tutschek B, Beckmann A, Schenko G, Schnurch HG, Bender HG. Expression analyses of epidermal growth factor receptor and Her-2/neu: No advantage of prediction of recurrence or survival in breast cancer patients. *Oncology* 1996;53:441-447.

Bentzen SM, Thames HD. Clinical evidence for tumor clonogen regeneration: interpretations of the data. *Radiother Oncol* 1991;22:161-66.

Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Mark J, Friedman HS, Bigner DD. 1990. Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50:8017-22.

Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJ, Spain K. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:243-7.

Bowers G, Reardon D, Hewit TH, Dent, P, Mikkelsen RB, Valerie K, Lammering G, Amir C, Schmidt-Ullrich RK. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 2001; 20:1388-1397.

Brown JM, Lemmon MJ. Potentiation by the hypoxic cytotoxin SR 4233 of cell killing produced by fractionated irradiation of mouse tumor. *Cancer Res* 1990;50:7745-7749.

Brust D, Feden J, Farnsworth J, Amir C, Broaddus WC, Valerie K. Radiosensitization of rat glioma with bromodeoxycytidine and Adenovirus expressing HSV-TK delivered by slow positive pressure infusion. *Cancer Gene Ther* 2000;5:778-788.

Bucci B, D'Agnano I, Botti C, Mottolese M, Carico E, Zupi G, Vecchione A. EGF-R expression in ductal breast cancer: Proliferation and prognostic implications. *Anticancer Res* 1997;17:769-774.

Carter S, Auer KL, Reardon DB, Birrer M, Fisher PB, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen R, Dent P. Inhibition of the mitogen activated protein (MAP) kinase cascade potentiates cell killing by low dose ionizing radiation in A431 human squamous carcinoma cells. *Oncogene* 1998;16:2787-2796.

Chae HP, Jarvis LJ, Uckun FM. Role of tyrosine phosphorylation in radiation-induced activation of c-jun protooncogene in human lymphohematopoietic precursor cells. *Cancer Res* 1993;53:447-451.

Chow N-H, Liu H-S, Lee EI, Chang CJ, Chan SH, Cheng HL, Tzai TS, Lin JS. Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer. *Anticancer Res* 1997;17:1293-1296.

Chrysogelos SA, Dickson RB. EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:29-40.

Chu CT, Everiss KD, Wikstrand CJ, Batra SK, Kung HJ, Bigner DD. Receptor dimerization is not a factor in the signalling activity of a transforming variant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII). *Biochem J* 1997;324:855-61.

Contessa JN, Reardon DB, Todd D, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Bowers GD, Schmidt-Ullrich RK. The inducible expression of dominant negative epidermal growth factor receptor CD533 results in radiosensitization of human mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:405-411.

Contessa JN, Hampton J, Lammering G, Mikkelsen RB, Dent P, Valerie K, and Schmidt-Ullrich RK. Ionizing Radiation Activates Erb-B Receptor Dependent Akt and p70 S6 Kinase Signaling in Carcinoma Cells. *Oncogene* 2002;21:4032-41.

Denekamp J. Changes in the rate of repopulation during multi-fraction irradiation of mouse skin. *Br J Radiol* 1973;46:381-392.

Dent P, Grant S. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. *Clin Cancer Res* 2001;7:775-783.

Dent P, Lavoinne A, Nakielny S, Caudwell FB, Watt P, Cohen P. The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. *Nature* 1990;348:302-308.

Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H. Heterodimerization and functional interaction between EGF Receptor Family Members: A New Signaling Paradigm with Implications for Breast Cancer Research. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35:115-132.

Ekstrand AJ, James CD, Cavanee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 1991;51:2164-72.

Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, James CD. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 1994;9:2313-20.

Ennis BW, Lippmann ME, Dickson RB. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer Invest* 1991;9:553-562.

Etienne MC, Pivot X, Formento JL, Bensadoun RJ, Formento P, Dassonville O, Francoual M, Poissonnet G, Fontana X, Schnieder M, Demard F, Milano G. A multifactorial approach including tumoural epidermal growth factor receptor, p 53, thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase to predict treatment

outcome in head and neck cancer patients receiving 5-fluoruracil. *Br J Cancer* 1999;79:1864-1869.

Fertil B, Dertinger H, Courdi A, Malaise EP. Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res* 1984;99:73-84.

Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, Speiser P, Czerwenka K, Sevela P, Zeillinger R. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: Comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res* 1997;17:613-620.

Fowler JF. Rapid repopulation in radiotherapy; a debate on machansim. The phantom of tumor treatment – continually rapid proliferation unmasked. *Radiother Oncol* 1991;22:156-8.

Fowler JF, Lindstrom MH. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:457-467.

Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR, Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G, Ciardiello F. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res* 1998;4:241-249.

Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000; 60:1383-7.

Fujino S, Enokibori T, Tezuka N, Asada Y, Inoue S, Kato H, Mori A. A comparison of epidermal growth factor receptor levels and other prognostic parameters in non-small cell lung cancer *Eur L Cancer* 1996;32:2070-2074.

Gamett DC, Greene T, Wagreich AR, Kim HH, Koland JG, Cerione RA. Heregulin-stimulated signaling in rat pheochromocytoma cells. Evidence for ErbB3 interactions with Neu/ErbB2, p85. *J Biol Chem* 1995;270:19022-19027.

Goike HM, Asplund AC, Pettersson EH, Liu L, Ichimura K, Collins VP. Acquired rearrangement of an amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in a human glioblastoma xenograft. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:697-701.

Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Matsukuma K. EGF receptor phosphorylation is affected by ionizing radiation. *Biochim Biophys Acta* 1997;1358:289-99.

Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Twardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996;78:1284-1292.

Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Twardy DJ. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824-832.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO* 1997;16:1647-1655.

Gulliford TJ, Huang GC, Ouyang X, Epstein RJ. Reduced ability of transforming growth factor- α to induce EGF receptor heterodimerization and downregulation suggests a mechanism of oncogenic synergy with ErbB2. *Oncogene* 1997;15:2219-2223.

Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL III. Insect cell-expressed p180 erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8132-8136.

Hagan M, Wang L, Hanley JR, Park JS, Dent P. Ionizing radiation-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in DU145 prostate carcinoma cells: MAP kinase inhibition enhances radiation-induced cell killing and G2/M-phase arrest. *Radiat Res* 2000;153:371-83.

Han HS, Caday CG, Nanda A, Cavanee WK, Huang HJ. Tyrphostin AG 1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res* 1996;56:3859-61

Hemminki A, Alvarez RD. Adenoviruses in oncology: a viable option? *BioDrugs* 2002;16:77-87.

Ho KC, Lin PS. Safranin O counterstaining enhances the counting of β -galactosidase-expressing cells. *BioTechniques* 1997;23:642.

Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor with C225 modulates proliferation, apoptosis and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:1935-1940.

Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:2166-74.

Huang, HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, Huang CM, Gill GL, Wiley HS, Cavanee WK. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997;272:2927-35.

Kashles O, Yarden Y, Fisher R, Ullrich A, Schlessinger J. A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Mol Cell Biol* 1991;11:1454-1463.

Kavanagh BD, Lin PS, Chen P, Schmidt-Ullrich RK. Radiation-induced enhanced proliferation of human squamous cancer cells in vitro: A release from inhibition by epidermal growth factor. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1557-1562.

Kawasome H, Papst P, Webb S, Keller GM, Johnson GL, Gelfand EW, Terada N. Targeted disruption of p70 (s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5033-5038.

Khandelwal SR, Kavangh BD, Lin PS, Truong QT, Lu J, Abraham DJ, et al. RSR 13, an allosteric effector of haemoglobin, and carbogen radiosensitize FSaII and SCCVII tumours in C3H mice. *Br J Cancer* 1999;79:814-20.

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

Klijn JG, Look MP, Portengen H, Alexieva-Figusch J, van Putten WL, Foekens JA. The prognostic value of epidermal growth factor-related proteins and epidermal growth factor receptor in common epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1997;16:60-68.

Kuball J, Wen SF, Leissner J, Atkins D, Meinhardt P, Quijano E, Engler H, Hutchins B, Maneval DC, Grace MJ, Fritz MA, Storkel S, Thuroff JW, Huber C, Schuler M. Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation. *J Clin Oncol* 2002;20:957-65.

Lammering G, Lin PS, Contessa JN, Hampton JL, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. Adenovirus-mediated over-expression of dominant negative epidermal growth factor receptor-CD533 as a gene therapeutic approach radiosensitizes human carcinoma and malignant glioma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, 51:775-784.

Lammering G, Valerie K, Lin PS, Mikkelsen RB, Contessa JN, Feden JP, Farnsworth J, Dent P, Schmidt-Ullrich R. Radiosensitization of malignant glioma cells through over-expression of dominant-negative EGFR. *Clin Cancer Res* 2001, 7:682-90.

Lammering G, Hewit TH, Hawkins W, Contessa JN, Reardon DB, Lin PS, Valerie K, Dent P, Mikkelsen RB, Schmidt-Ullrich RK. Epidermal growth factor receptor as a genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:921-9.

Lee I, Kim JH, Levitt SH, Song CW. Increases in tumor response by pentoxifylline alone or in combination with nicotinamide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992, 22:425-9

Lemmon, MA and Schlessinger, J Trends Biochem Sci 1994;19:459-463.

Liu Y, Martinale JL, Gorospe M, Holbrook NJ. Regulation of p21 WAF1/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway. Cancer Res., 56: 31-35, 1996.

Lobenhofer EK, Huper G, Iglehart JD, Marks JR. Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis. Cell Growth Differ. 11: 99-110, 2000.

Mansbridge JN, Ausserer WA, Knapp MA, Sutherland RM. Adaptation of EGF receptor signal transduction to three-dimensional culture conditions: changes in surface receptor expression and protein tyrosine phosphorylation. J Cell Physiol 1994; 161:374-82.

Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, Benedetti-Panici P, Paludetti G, Scambia G, Manucuso S. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 1996;74:1253-1257.

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

Messa C, Russo F, Caruso MG, DiLeo A. EGF, TGF β a, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. Acta Oncol 1998;37:285-289.

Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. Clin Cancer Res 2000;6: 701-708.

Montgomery RB, Moscatello DK, Wong AJ, Cooper AJ, Stahl WL. Differential modulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase/ extracellular signal-related kinase kinase and MAP kinase activities by a mutant epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 1995;270:30562-6.

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emler DR, Montgomery RB, Wong AJ. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1998;273:200-6.

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL, Wong AJ. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995;55:5536-9.

Moscatello DK, Montgomery RB, Sundareshan P, McDanel H, Wong MY, Wong AJ. Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene* 1996;13:85-96.

Namba H, Iwadate Y, Kawamura K, Sakiyama S, Tagawa M. Efficiency of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase-mediated gene therapy is influenced by the expression of connexin 43 in the target cells. *Cancer Gene Ther* 2001;8:414-20.

Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, Huang HJ. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 1996;56:5079-86.

Neal DE, Sharples L, Smith K, Fennelly J, Hall RR, Harris AL. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990;65:1619-1625.

Nemunaitis F, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Blackburn A, Romel L, Randlev B, Kaye S, Kirn D. Phase II Trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:289-298.

Niikura H, Sasano H, Sato S, Yajima A. Expression of epidermal growth factor-related proteins and epidermal growth factor receptor in common epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1997;16:60-68.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7727-31.

O'Rourke DM, Qian DMX, Zhang HT, Davis JG, Nute E, Meinkoth J, Greene MIM. Trans receptor inhibition of human glioblastoma cells by erbB family ectodomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3250-5

Ogawa J, Iwazaki M, Inoue H, Koide S, Shohtsu A. Immunohistochemical study of glutathione-related enzymes and proliferative antigens in lung cancer. Relation to cisplatin-sensitivity. *Cancer* 1993;71:2204-2209.

O'Rourke D M, Nute EJ, Davis JG, Wu C, Lee A, Murali R, Zhang HT, Qian X, Kao CC, Greene, MI. Inhibition of a naturally occurring EGFR oncoprotein by the p185neu ectodomain: implications for subdomain contributions to receptor assembly. *Oncogene* 1998;16:1197-207.

O'Rourke, DM, Kao GD, Singh N, Park BW, Muschel RJ, Wu CJ, Greene MI. Conversion of a radioresistant phenotype to a more sensitive one by disabling erbB receptor signaling in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:10842-7.

Park BW, Zhang HT, Wu C, Berezov A, Zhang X, Dua R et al. Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables P185HER2/neu tyrosine kinases in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 2000;18:194-8.

Park JS, Carter S, Reardon DB, Schmidt-Ullrich RK, Fisher PB, Dent P. Roles for basal and stimulated p21 Cip-1/WAF1/MDA6 expression and MAP kinase signaling in radiation-induced cell cycle check-point control in carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 1999;10:4231-4246.

Pavelic K, Banjac Z, Pavelic J, Spaventi S. Evidence for a role of EGF receptor in the progression of human lung carcinoma. *Anticancer Res* 1993;13:1133-1137.

Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, Wongvipat PN, Slamon DJ. Monoclonal antibody to HER-2/neu receptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances

radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res* 1999; 59:1347-1355.

Pillai M, Jayaprakash PG, Nair M. Tumour-proliferative fraction and growth factor expression as markers of tumour response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124:456-461.

Powis G. Signalling pathways as targets for anticancer drug development. *Pharmacol Ther* 1994;62:57-95.

Prabhu SS, Broaddus WC, Gillies GT, Loudon WG, Chen ZJ, Smith B. Distribution of macro-molecular dyes in brain using positive pressure infusion: A model for direct controlled delivery of therapeutic agents. *Surgery and Neurology* 1998;50:367-75.

Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF, Giorgio NA, Mendelsohn J, Scher HI, et al. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996;19:419-27.

Qian W, LeVeae CM, Freeman JK, Dougall WC, Greene MI. Heterodimerization of EGFR and wild-type or kinase deficient Neu: a mechanism of inter-receptor kinase activation and trans-phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1500-1504.

Radinsky R, Risin S, Fan Z, Dong, Bielenberg, Bucana, Fidler. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells *Clin Cancer Res* 1995;1:19-31.

Rao GS, Murray S, Ethier SP. Radiosensitization of human breast cancer cells by a novel ErbB family receptor tyrosine kinase inhibitor. *Int J Radiat Onc Biol Phys* 2000;48:1519-1527.

Reardon DR, Contessa JN, Mikkelsen RB, Valerie K, Amir C, Dent P, Schmidt-Ullrich RK. Dominant negative EGFR-CD533 and inhibition of MAPK modify JNK1 activation and enhance radiation toxicity of human mammary carcinoma cells. *Oncogene* 1999;18:4756-4766.

Redemann N, Holzmann B, Rueden TV, Wagner EF, Schlessinger J, Ullrich A. Anti-oncogenic activity of signaling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Mol Cell Biol* 1992;12: 491-498.

Riese DJ II, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998;20:41-48.

Rieske P, Kordek R, Bartkowiak J, Debiec-Rychter M, Bienhat W, Liberski PP. A comparative study of epidermal growth factor receptor (EGFR) and MDM2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas. *Pol J Pathol* 1998;49:145-149.

Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, Orazem J, Zaman M, Hoda S, McIntosh J, Kurie J, Dmitrovsky E. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 1993;53:2379-2385.

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

Sale EM, Atkinson PP, Arnott CH, Chad JE, Sale GJ. Role of ERK1/ERK2 and p70S6K pathway in insulin signaling of protein synthesis. *FEBS Lett* 1999;446:122-126.

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.

Santini J, Formento J-L, Francoual M, Milano G, Schneider M, Dassonville O, Demard F. Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 1991;13:132-139.

Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 2000;153:245-257.

Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 1999;153:245-257.

Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Reardon DB, Bowers G, Lin PS. Molecular Mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. *Radiat Oncol Invest* 1999;7:321-330.

Schmidt-Ullrich RK, Johnson CR, Wazer DE, Masko G, Chasin WD, Karmody CS. Accelerated hyperfractionated irradiation for advanced carcinoma of the head and neck: Concomitant boost technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21:562-568.

Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997;15:1191-1197.

Schmidt-Ullrich RK, Valerie K, Fogleman PB, Walters J. Radiation-induced auto-phosphorylation of epidermal growth factor receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells. *Radiat Res* 1996;145:79-83.

Segatto O, Lonardo F, Wexler D, Fazioli F, Pierce JH, Bottaro DP, White MF, Di Fiore PP. The juxtamembrane regions of the epidermal growth factor receptor and gp185 erbB2 determine the specificity of signal transduction. *Mol Cell Biol* 1991;11:3191;3202.

Tang P, Steck PA, Yung WKA. The autocrine loop of TGF- α /EGFR and brain tumors. *J Neuro-Oncol* 1997;35:303-314.

Todd DG, Mikkelsen RB, Rorrer WK, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. Ionizing radiation stimulates existing signal transduction pathways involving the activation of epidermal growth factor receptor and ErbB 3, and changes of intracellular calcium in A431 human squamous carcinoma cells. *J Rec Signal Tran Res.* 1999; 19:885-908.

Torregrosa D, Bolufer P, Lluch A, Lopez JA, Barragan E, Ruiz A, Guillem, Munarriz B, Garcia Conde J. Prognostic significance of c-erbB-2/neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptors (ER) status. *Clinica Chimica Acta* 1997;262:99-119.

Turkeri LN, Erton ML, Cevik I, Akdas A. Impact of the expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor receptor on the prognosis of superficial bladder cancer. *Urology* 1998;51:645-649.

Uegaki K, Nio Y, Inoue Y, Minari Y, Sato Y, Song MM, Dong M, Tamura K. Clinicopathological significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997;17:3841-3848.

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

Valerie K, Brust D, Farnsworth J, Amir C, Taher M, Hershey C, Feden J. Improved radiosensitization of rat glioma cells with Adenovirus-expressed mutant HSV-TK in combination with acyclovir. *Cancer Gene Ther* 2000;6:879-84.

Valerie K. Viral Vectors for Gene Delivery. In: Wu-Pong, S, Rojanasakul, Y, editors. *Biopharmaceutical Drug Design and Development*. Humana Press, Inc; 1999. p. 69-142.

Veale D, Kerr N, Gibson GJ, et al. The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small-cell lung cancer to long term survival. *Anticancer Res* 1997;17:3841-3848.

Volm M, Rittgen W, Drings P. Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN, and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1998;77:1293-1296.

Walker RA, Dearing SJ. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:167-176.

Wang CC. Local control of oropharyngeal carcinoma after two accelerated hyperfractionation radiation therapy schemes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;14:1143-1146.

Weinberg, RA. *Oncogenes and the molecular origin of cancer*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; 54-62

Wells A. The epidermal growth factor receptor (EGFR) – a new target in cancer therapy. *Signal* 2000;1:4-11.

Westphal M, Meima L, Szonyi E, Lofgren J, Meissner H, Hamel W, et al. Heregulins and the ErbB-2/3/4 receptors in gliomas. *J Neurooncol* 1997;35:335-46.

Wilson WR, Pullen SM, Hogg A, Helsby NA, Hicks KO, Denny WA. Quantitation of bystander effects in nitroreductase suicide gene therapy using three-dimensional cell cultures. *Cancer Res* 2002;62:1425-32

Withers HR, Peters LJ, Taylor JM, Owen JB, Morrison WH, Schultheiss TE, Kean T, O'Sullivan B, van Dyk J, Gupta N, et al. Local control of carcinoma of the tonsil by radiation therapy: an analysis of patterns of fractionation in nine institutions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:549-562.

Withers HR, Taylor JMG, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 1988;27:131-146.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2965-9

Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MA, Buchler M, Begler HG, Korc M. Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res* 1993;13:565-569.

Yacoub A, Park JS, Qiao L, Dent P, Hagan MP. MAPK dependence of DNA damage repair: ionizing radiation and the induction of expression of the DNA repair genes

XRCC1 and ERCC1 in DU145 human prostate carcinoma cells in a MEK1/2 dependent fashion. *Int J Radiat Biol* 2001;77:1067-78.

Yoshida K, Hosoya Y, Sumi S, Honda M, Moriguchi H, Yano M, Ueda Y. Studies of the expression of epidermal growth factor receptor in human renal cell carcinoma: a comparison of immunohistochemical method versus ligand binding assay. *Oncology* 1997;54:220-225.

Zhang K, Sun J, Liu N, Wen D, Chang D, Thomason A, Yoshinaga SK. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem* 1996;271:3884-3890.

Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, Kolm P, El-Mahdi AM. Epidermal growth factor receptor: An independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1996;34:809-815.

10. DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. Gerd Schmitt, Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, danke ich herzlich für sein förderndes Interesse und die großzügige Unterstützung. Er hat mir auf seine Vermittlung und Initiative hin die Möglichkeit gegeben, zwei Jahre lang eigene Forschungsinteressen verfolgen zu können, mir anschließend eine sofortige Rückkehr an die Klinik ermöglicht und immer unterstützend und konstruktiv zur Seite gestanden.

Herrn Prof. Dr. Rupert Schmidt-Ullrich, M.D., Direktor des Department of Radiation Oncology am Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA, bin ich sehr zu Dank verpflichtet. Er ermöglichte mir, in der molekularbiologischen Sektion in seinem Forschungslabor an seinen Forschungsprojekten mitarbeiten und forschen zu dürfen, gab mir großzügige Unterstützung und Förderung bei der Realisierung der Projekte und ermöglichte mir neben der experimentellen Arbeit die regelmäßige klinische Hospitierung in der Radiologisch- Onkologischen Klinik.

Den Herrn Professoren Peck-Sun Lin, Ph.D., Kristoffer Valerie, Ph.D., Paul Dent Ph.D., und Ross Mikkelsen, Ph.D., Molekularbiologische Sektion des Dept. of Radiation Oncology, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA bin ich für die regen und hilfreichen Diskussionen, die vielen Ratschläge, Hilfestellungen und konstruktiven Kritiken sehr verbunden.

Meinem Kollegen Herrn Priv.- Doz. Dr. Karl Axel Hartmann möchte ich für die Unterstützung bei meinen Forschungsaktivitäten, den Hilfestellungen, Ermunterungen und der Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn danken.

Den Mitarbeitern am Department of Radiation Oncology, Medical College of Virginia, Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA gilt mein Dank für die herzliche Gastfreundschaft und die aufgeschlossene, stets hilfsbereite und fördernde freundliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin, Frau Judith Möller und meinem Sohn Tobias für das Verständnis und die Rücksichtnahme während der Zeit der experimentellen Forschungsarbeiten und der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ferner möchte ich allen danken, die durch praktische Hilfen bei den Versuchen, ihre Anregungen und ihre Diskussionen diese Arbeit erleichtert haben.

Die Arbeit wurde durch ein Forschungsstipendium der Dr. Mildred Scheel Stiftung der Deutschen Krebshilfe für Dr. Guido Lammering und zwei US- amerikanische Forschungsförderungen der „USPHS Grants PO1 CA72955“ und „R01 CA65896“ für Rupert Schmidt-Ullrich, M.D. unterstützt und ermöglicht.

11. Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
Ad-EGFR-CD533	Adenovirus, welches das EGFR-CD533 Gen transduziert
Ad-LacZ	Adenovirus, welches das LacZ Gen transduziert
C	Kontrolle
C225	monoklonaler Antikörper gegen EGFR
CA	Karzinom
CHO	Chinesische Hamster Ovar Zelllinie
CHO.EGFRwt	CHO Zellen, transient transfiziert mit einem EGFR- wt Plasmid
CHO.EGFRvIII	CHO Zellen, transient transfiziert mit einem EGFRvIII Plasmid
CHO.mock	CHO Zellen, mock transfiziert
D	Mittlere Inaktivierungsdosis
D ₃₇	Strahlendosis für eine Zell- Überlebensrate von 37%
DER	Dosisverstärkungsfaktor
Dox	Doxycyclin
EGFRwt	EGFR Wildtyp
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGFR-CD533	dominant- negatives EGFR
EGFRvIII	Natürliche Variante des EGFR, Deletion von 5 Exonen des EGFR Gens
FBS	Fetales Rinder Serum
Gy	Gray
IR	Ionisierende Bestrahlung
MAB	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase

MBP	Myelin Basis Protein
Min	Minuten
mock-	„Schein“- Behandlung
MOI	multiplicity of infection
NSCLC	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
NS	Nicht signifikant
P	p- Wert
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pfu	plaque forming unit
PI3K	PI-3-Kinase
PKC	Protein Kinase C
PLC γ	Phospholipase γ
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
Tyr-P	Tyrosin Phosphorylierung